

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ
الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي
أَنْزَلَ هَذِهِ السُّورَةَ
وَهُوَ أَعْلَمُ بِمَا
يُخْفَى

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگی، به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است. به پاس قلب های بزرگشان که فریاد رس است و سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید و به پاس محبت های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند.

تقدیم به

پدر و مادر عزیزم که به من چگونه زیستن را آموختند

و

استاد بزرگوارم جناب آقای دکتر ساجدی به پاس زحمات بی دریغ، تلاش های بی وقفه و راهنمایی های ارزشمندشان

حمد و سپاس بیکران یگانه مهربانی را که به قلم قداست و به انسان کرامت بخشید و او را به زیور علم و معرفت بیاراست. سر بر آستان معبودی می ستایم که به من این توانایی را داد که به سهم خود گامی در راه علم و معرفت بردارم. حال که به لطف پروردگار متعال نگارش رساله خود را به اتمام رسانیده ام بر خود لازم می دانم از تمام بزرگوارانی که مرا در طول این تحقیق یاری کردند تشکر و قدردانی نمایم.

در ابتدا بر خود لازم می دانم که از استاد ارجمندم جناب دکتر رضا حسن ساجدی به واسطه مداومت راهنمایی های خردمندانه و زحمات صادقانه ایشان، کمال قدردانی را در به انجام رساندن این پروژه داشته باشم. از جناب آقای دکتر تقدیر مشاور عزیزم در انجام این پروژه و از سروران ارجمندم سرکار خانم دکتر سریری و سرکار خانم دکتر لیلا حسنی که در سمت اساتید ممتحن زحمت مطالعه پایان نامه را تقبل نمودند کمال سپاس گذاری را دارم. همچنین از سرکار خانم دکتر لیلا حسنی که امکان انجام بخشی از این تحقیق را در بخش تحصیلات تکمیلی دانشکده علوم پایه زنجان فراهم آوردند کمال تشکر را دارم. از جناب آقای دکتر اصغری نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سپاسگذارم. از دانشجویان بزرگوار دوره دکتری جناب آقای محمد رضا آقامعالی و جناب آقای دکتر وهب جعفریان بخاطر کمک ها و راهنمایی های بی دریغشان در طول این دوره بی نهایت سپاس گذارم. همچنین بر خود لازم می دانم قدردانی خود را نسبت به کمک ها و همراهی دوست عزیزم سرکار خانم شیرین شاهنگیان که در تمامی مراحل انجام این تحقیق همراه من بود ابراز دارم. از جناب آقای گلوانی جهت مساعدت ویژه ایشان در تهیه سیستم از مرکز تحقیقات آرتمیا در ارومیه سپاسگذارم. از پدر و مادر بزرگوaram که با صبر و پشتیبانی همیشگی خود در تمامی دوران زندگی ام امید موفقیت را در من زنده نگاه داشتند سپاسگذارم. همچنین مایلم حق شناسی خود را به دوستان عزیزم بویژه لیلا گلعلی زاده، فاطمه شعبانی، لعیلا هدایی، سمیرا نصرالهی، مریم ملا کریمی، سروناز شیرزاد، عطیه مهدوی، مریم میایی، نرگس یوسفی، رضوان شاه محمدی، پریچهر زمانی، افسانه گودرزی و آقایان محمد امین کریمی و محمد طاهری ابراز دارم.

در پایان برای همگان از خداوند بزرگ قدرت و موفقیت بیشتر را مسئلت می کنم.



دانشکده علوم پایه

گروه زیست‌شناسی

(گرایش بیوشیمی)

پایان‌نامه کارشناسی ارشد

بررسی نقش سیستمین‌ها و الیگومریزاسیون در ساختار و عمل آرتمین

از:

بیبا صدق شیجانی

استاد راهنما:

دکتر رضا حسن ساجدی

استاد مشاور:

دکتر مجید تقدیر

تیر 1389

بررسی نقش سیستمین ها و الیگومریزاسیون در ساختار و عمل آرتمین

بیبا مصدق

چکیده

جنین های سیستمی آرتمیا اورمیا از مقاومترین موجودات یوکاریوتی نسبت به استرس های شدید محیطی می باشند. بخشی از این مقاومت ناشی از وجود مقادیر بالای پروتئین استرسی آرتمین می باشد. آرتمین یک پروتئین 27 کیلودالتونی مقاوم به حرارت و غنی از سیستمین است. فراوانی سیستمین ها و آرایش فضایی درون مولکولی آنها موید این نظر است که آرتمین سیستم ها را در مقابل تخریب اکسیداتیو حفاظت می کند و عملکرد آن وابسته به وضعیت ردوکس سلول است. در این مطالعه پس از تخلیص آرتمین از سیستم، خصوصیات ساختاری و عملکردی آن مورد مطالعه قرار گرفت. پایداری حرارتی بالای این پروتئین امکان تخلیص آن به روش رسوب دهی با آمونیوم سولفات، اتکوباسیون در 70 درجه سانتیگراد به مدت 14 دقیقه و نهایتاً کروماتوگرافی تعویض یونی را برای ما فراهم کرد. آنالیز-SDS PAGE در شرایط احیایی و غیراحیایی نشان می دهد آرتمین تخلیص شده عمدتاً به صورت الیگومر همراه با مقدار اندکی مونومر می باشد. تعداد گروه های تیول آزاد و پیوندهای دی سولفید آرتمین به روش اسپکتروسکوپی Ellman محاسبه شد. نتایج بیانگر وجود 9 گروه تیول آزاد (7 گروه پوشیده و 2 گروه سطحی) و تنها یک سیستمین درگیر در پیوند دی سولفید، در هر مونومر آرتمین بود. داده های این بخش با نتایج آنالیزهای تنوری بر روی مدل ساختار سه بعدی آرتمین مطابقت داشت. براساس این مطالعات حداقل تعداد گروه های SH-سطحی آرتمین سه عدد بود. همچنین ظهور یک بند اضافی 50kDa در SDS-PAGE غیراحیایی بیانگر وجود پیوند دی سولفید بین مولکولی بود که احتمال می رود بین هر دو مونومر مجاور در الیگومر آرتمین موجود باشد. میزان بازیابی فعالیت آنزیم HRP در حضور چپرون احیاء شده (توسط DTE و GSH/GSSG) بررسی شد. نتایج نشان داد که اعمال شرایط احیایی توانایی چپرونی آرتمین را کاهش می دهد. آرتمین در *E. coli* سویه BL21(DE3) بعنوان پروتئین نو ترکیب بیان و با روش کروماتوگرافی تمایلی با خلوص بالا تخلیص شد. پس از تائید بیان آرتمین توسط SDS-PAGE و بلا تیگ، پروتئین نو ترکیب تحت شرایط احیایی Refold شده و کلیه سیستمین های موجود در آن توسط یدواستامید بلوک شدند. تاثیر پروتئین نو ترکیب Refold شده و بلوک شده بر روی بازیابی فعالیت آنزیمی کربنیک انهدراز دنا توره بررسی شد. نتایج بیانگر کاهش فعالیت چپرونی پروتئین آلکیله شده بود. مطالعات فلورسانس ذاتی پروتئین تحت شرایط احیایی نشان دهنده تغییر در ساختار سوم آرتمین بود. پارامترهای ترمودینامیکی آرتمین احیاء شده در حضور دنا تورات از نتایج حاصل از فلورسانس استخراج شد و مشخص گردید که میزان پایداری پروتئین احیاء شده نسبت به شرایط native تفاوت اندکی نشان می دهد.

صفحه	عنوان
د	چکیده فارسی
ذ	چکیده انگلیسی
فصل اول: مقدمه و تئوری	
2	1-1-1-1 چپرون های مولکولی
2	1-1-1-1 پروتئین های شوک حرارتی
4	HSP60 (GroEL) و HSP70 (DnaK) 1-1-1-1
4	HSP70 /HSP40 پروتئین های خانواده 1-1-1-1-1
7	HSP60/HSP10 پروتئین های خانواده 2-1-1-1-1
10	HSP90 پروتئین های خانواده 3-1-1-1-1
12	4-1-1-1-1 پروتئین های شوک حرارتی کوچک (sHSPs)
13	2-1-1-1 الیگومریزاسیون پروتئین های شوک حرارتی
16	3-1-1-1 چپرون های وابسته به ردوکس در شبکه اندوپلاسمی و پری پلاسم باکتری
17	HSP33 1-3-1-1
18	1-3-1-1 کنترل ردوکس بر القای بیان چپرون ها
19	2-1-2-1 آرتیمیا
19	1-2-1-2 رده بندی جانوری
20	2-2-1-2 مقاومت آرتیمیا به استرس
20	3-2-1-2 پروتئین های استرسی ویژه در آرتیمیا
20	1-3-2-2 پروتئین استرسی p26
21	1-1-3-2-2 مقایسه p26 در گونه های مختلف آرتیمیا
23	2-1-3-2-2 مقایسه p26 و سایر پروتئین های α -کریستالین
23	3-1-3-2-2 عملکرد p26
26	4-1-3-2-1 مهاجرت p26
26	2-3-2-1 پروتئین استرسی ArHsp21
27	3-3-2-1 پروتئین استرسی ArHsp22
29	1-3-3-2-1 عملکرد ArHsp22
30	4-3-2-1 پروتئین استرسی p8
31	5-3-2-1 پروتئین استرسی آرتیمین
34	1-5-3-2-1 عملکرد آرتیمین
37	3-1 پیوندهای دی سولفید در پروتئین ها

37	1-3-1 روش های آنالیز پیوند دی سولفیدی
38	1-1-3-1 تعیین جفت سیستئین های درگیر در پیوند دی سولفیدی به روش peptide mapping
40	2-1-3-1 شمارش پیوندهای دی سولفید به روش رنگ سنجی
41	3-1-3-1 محاسبه تعداد پیوندهای دی سولفیدی از طریق فلورسانس
42	4-1 در این تحقیق

فصل دوم: مواد و روش ها

44	1-2- مواد و تجهیزات
44	1-1-2 دستگاهها
44	2-1-2 مواد شیمیایی
45	2-2 استخراج و تخلیص آرتمین از آرتمیا اورمیا
46	3-2 سدیم دودسیل سولفات - پلی اکریلامید ژل الکتروفورز
47	1-3-2 رنگ آمیزی کوماسی بلو
47	2-3-2 رنگ آمیزی نترات نقره
48	4-2 بررسی توانایی اتصال آرتمین به اسید نوکلئیک
48	1-4-2 الکتروفورز بر روی ژل آگارز به روش تداخل ناحیه ای
50	5-2 محیط های کشت باکتریایی
50	6-2 بیان آرتمین
50	7-2 تهیه محتوای سلولی از باکتری ها
51	8-2 تخلیص پروتئین نو ترکیب
51	9-2 ایمونوبلاتینگ
52	10-2 سنجش غلظت پروتئین ها به روش Bradford
53	11-2 احیای پیوندهای دی سولفید در حضور احیا کننده
53	12-2 تا خوردگی مجدد آرتمین نو ترکیب
54	13-2 Modify نمودن آرتمین نو ترکیب
54	14-2 بررسی فعالیت چپرونی آرتمین Refold شده و Modify شده
54	1-14-2 تعیین فعالیت آنزیم کربنیک انهدراز (CA)
55	2-14-2 تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز تریپچه کوهی (HRP)
55	3-14-2 غیرطبیعی شدن HRP و CA
56	4-14-2 تا خوردگی مجدد CA دناتوره در حضور آرتمین نو ترکیب Refold شده و Modify شده
56	5-14-2 تا خوردگی مجدد HRP دناتوره در حضور آرتمین تحت شرایط احیایی

56	15-2 مطالعات فلورسانس ذاتی
57	16-2 تعیین تعداد گروه های SH-آزاد و تخمین تعداد پیوندهای S-S در آرتمین
57	1-16-2 تعیین تعداد گروه های SH-آزاد سطحی
57	2-16-2 تعیین SH-کل
58	17-2 بررسی سطوح در دسترس آمینواسیدهای سیستمین در آرتمین
58	18-2 محاسبه پارامترهای ترمودینامیکی آرتمین

فصل سوم: نتایج

60	1-3 استخراج و تخلیص آرتمین از آرتمیا اورمیانا
61	2-3 آرتمین در شرایط احیایی و غیراحیایی
62	3-3 بررسی خاصیت اتصال آرتمین به اسیدهای نوکلئیک
62	4-3 بیان و تخلیص پروتئین نو ترکیب
63	5-3 ایمونوبلاتینگ
64	6-3 بررسی حالت الیگومری آرتمین Modify شده و Refold شده
65	7-3 اثر آرتمین نو ترکیب Refold شده و آلکیله شده بر روی تاخوردگی مجدد کربنیک انهدراز
66	8-3 اثر آرتمین احیاء شده بر روی تاخوردگی مجدد پراکسیداز تریچه کوهی
67	9-3 بررسی طیف فلورسانس ذاتی پروتئین در شرایط احیایی و غیراحیایی
67	10-3 بررسی پایداری آرتمین در شرایط احیایی و غیر احیایی در غلظت های مختلف دناتورانت
69	11-3 پارامترهای ترمودینامیکی آرتمین
69	12-3 تعیین تعداد گروه های SH-آزاد در آرتمین
70	13-3 تعیین سطوح در دسترس سیستمین ها

فصل چهارم: بحث

74	1-4 بررسی وضعیت پیوندهای دی سولفید در الیگومر آرتمین استخراج شده از سیستم
75	2-4 بررسی توانایی اتصال آرتمین به اسیدهای نوکلئیک
76	3-4 اثر پیوندهای دی سولفید در ساختار و عملکرد آرتمین
79	4-4 پایداری آرتمین
80	5-4 وضعیت سیستمین ها در آرتمین
82	6-4 پیشنهادات
84	منابع

پیوست

فهرست شکل ها

صفحه	فهرست
5	شکل 1-1 مدل فضاپرکن DnaK و دمین های اختصاصی DnaK, DnaJ و GrpE
6	شکل 2-1 سیستم چپرونی HSP70/HSP40 و DnaK/DnaJ
8	شکل 3-1 چپرونین GroEL-GroES
9	شکل 4-1 مکانیسم دو مرحله ای اتصال - رهاسازی سیستم چپرونی GroEL
11	شکل 5-1 سیستم چپرونی Hsp90
13	شکل 6-1 توالی آمینواسیدی دمین α - کریستالین در موجودات مختلف
14	شکل 7-1 ساختار کریستالوگرافی شده Hsp16.5
15	شکل 8-1 مسیرهای فرضی تجمع کمپلکس های α -HSP
17	شکل 9-1 تاثیر PDI بر روی افزایش میزان بقای سلول های ترانسفورم شده
18	شکل 10-1 حالت های منومر و دایمر HSP33 تحت شرایط احیایی و غیراحیایی
19	شکل 11-1 آرتمیا
21	شکل 12-1 میزان mRNA و زمان ظهور و ناپدید شدن آن در تمایز جنین تخمگذار و تمایز جنین تخمگذار - زنده زا
22	شکل 13-1 درخت فیلوژنیک گونه های مختلف آرتمیا و ساختار سوم پیشگویی شده p26 گونه های مختلف آرتمیا
24	شکل 14-1 سینتیک غیرفعال شدن آنزیم سترات سینتاز در حضور و عدم حضور پروتئین p26
25	شکل 15-1 افزایش میزان بقای سلول های پستاندار ترانسفورم شده با ژن p26
26	شکل 16-1 نقل و انتقالات درون سلولی پروتئین p26 در حضور و عدم حضور استرس های محیطی
28	شکل 17-1 توالی های آمینواسیدی p26, ArHsp21 و ArHsp22 با استفاده از Clustal W
29	شکل 18-1 آنالیز SDS-PAGE عصاره باکتریایی ترانسفورم شده و ترانسفورم نشده با HSP های آرتمیا
30	شکل 19-1 اثر ArHSP21 و ArHSP22 بر روی تجمع حرارتی پرتئین های دیگر
31	شکل 20-1 cDNA کامل و میزان mRNA درون سلولی p8 5 زوز بعد از لقاح
33	شکل 21-1 ساختار دوم و سوم پیشبینی شده بر اساس H-Frritin انسان و تصویر میکروسکوپ الکترونی آرتمین
34	شکل 22-1 ساختار سه بعدی فریتین، آرتمین قبل و بعد از پروسه دینامیک مولکولی
35	شکل 23-1 آنالیز mRNA آرتمین تحت استرس حرارتی توسط اسپکتروسکوپی و SDS-PAGE
36	شکل 24-1 تجمع القاء شده توسط حرارت سترات سینتاز توسط آرتمین در یک رفتار وابسته به غلظت
36	شکل 25-1 اثر آرتمین روی سلول های پستانداران طی استرس حرارتی. سلول های بیان کننده آرتمین
38	شکل 26-1 تصویر شماتیک پروتئینی حاوی یک پیوند دی سولفید و سه جایگاه برش پروتئولیتیک
39	شکل 27-1 کروماتوگرام HPLC قطعات پپتیدی حاصل از آلکیلاسیون و پروتئولیز تحت شرایط احیایی و غیراحیایی
40	شکل 28-1 مراحل اجرای الکتروفورز قطری
41	شکل 29-1 تعیین میزان پروتئین های دارای پیوند دی سولفیدی به روش نشانگذاری فلورسانس

- 61 شکل 1-3 کروماتوگرام مربوط به ستون کروماتوگرافی Q-sepharose و SDS-PAGE مربوط به تخلیص پروتئین
- 61 شکل 2-3 SDS-PSGE آرتمین تحت شرایط احیایی و غیراحیایی
- 62 شکل 3-3 ZIGE به منظور بررسی اتصال آرتمین به DNA تک رشته ای
- 63 شکل 4-3 SDS-PAGE پروتئین نوترکیب خالص شده
- 64 شکل 5-3 بلا تینگ نقطه ای نمونه های مختلف پروتئین آرتمین
- 64 شکل 6-3 آنالیز SDS-PAGE پروتئین نوترکیب modify شده و Refold شده
- 65 شکل 7-3 غلظت های مختلف آرتمین نوترکیب روی بازیابی فعالیت آنزیم کربنیک انهدراز دنا توره در حین تا خوردگی
- 66 شکل 8-3 اثر غلظت های مختلف آرتمین تخلیص شده از سیست بر بازیابی فعالیت آنزیم پراکسیداز دنا توره در حین تا خوردگی
- 67 شکل 9-3 طیف های فلورسانس ذاتی آرتمین در شرایط غیراحیایی و احیایی
- 68 شکل 10-3 طیف های فلورسانس ذاتی آرتمین در غلظت های افزایش یابنده دنا تورات در عدم حضور احیا کننده و در حضور احیا کننده
- 69 شکل 11-3 تغییرات طول موج نشر بیشینه نسبت به غلظت دنا تورات
- 70 شکل 12-3 نمایش سیستین های موجود در توالی آرتمین
- 71 شکل 13-3 نمایش سیستین های سطحی آرتمین در دو مدل قبل و بعد از پروسه دینامیک مولکولی

فهرست جدول ها

صفحه	فهرست
4	جدول 1-1 طبقه بندی پروتئین های شوک حرارتی
34	جدول 2-1 مقایسه ساختار دوم حاصل از داده های طیف CD با مدل های اولیه و ریفاین شده آرتمین
52	جدول 1-2 تهیه استانداردهای پروتئینی به منظور تعیین غلظت نمونه های مجهول
54	جدول 2-2 مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تعیین فعالیت آنزیم کربنیک انهدراز
55	جدول 3-2 مواد و مقادیر مورد نیاز جهت تعیین فعالیت آنزیم پراکسیداز تربچه کوهی
69	جدول 1-3 تغییرات انرژی آزاد در نتیجه احیای آرتمین
70	جدول 2-3 گروه های SH-آزاد آرتمین در حضور و عدم حضور 8 M اوره
71	جدول 3-3 سطوح در دسترس رزیدوهای سیستین آرتمین در دو حالت قبل و بعد از MD

فصل اول : مقدمه و تئوری

1-1-1-1 چپرون های مولکولی¹

دانش ما درباره تاخوردگی² پروتئین در 30 سال گذشته افزایش یافته است. در گذشته نظریه تاخوردگی خودبخودی پروتئین ها مطرح بود، اما ضمن آشکار شدن نقش چپرون های مولکولی در تاخوردگی صحیح بسیاری از پروتئین ها در سلول های زنده، این نگاه سنتی منسوخ گردید [1-2]. چپرون ها خانواده ای از پروتئین های سلولی اند که در تاخوردگی صحیح سایر پروتئین ها و نیز تجمع³ آنها به ساختار های الیگومری نقش دارند. این دسته از پروتئین ها فعالیت خود را از طریق میانکنش گذرا با پروتئین های دیگر ایفا نموده و بدین ترتیب از تشکیل حد واسط های ناصحیح که منجر به تجمع نامطلوب پروتئین ها می گردند، جلوگیری می کنند. به نظر می رسد چپرون ها به سطوح هیدروفوب در دسترس پروتئین که در حالت تاخوردگی در داخل قرار می گیرند متصل می شوند. رهایی سوبسترای پروتئینی از چپرون اغلب با هیدرولیز ATP همراه است که پیش برنده تاخوردگی به حالت طبیعی است. اتصال و رهاسازی مکرر ممکن است جهت تاخوردگی صحیح ضروری باشد. یکی از حیاتی ترین فرایندها در تولید پروتئین ها تبدیل توالی خطی پروتئین ها به ساختار سه بعدی تاخوردگی صحیح آنهاست. به محض اینکه یک زنجیره پلی پپتیدی نوظهور از ریوزوم رها می شود مستعد تاخوردگی ناصحیح و بدنال آن تجمع است. اگرچه ممکن است بسیاری از پروتئین ها بطور خودبه خود فولد شوند اما آغاز تاخوردگی اغلب پروتئین های سلولی نیازمند همکاری چپرون هاست [3-8].

1-1-1-1 پروتئین های شوک حرارتی⁴

پروتئین های شوک حرارتی (HSP) خانواده ای از پروتئین های حفاظت شده اند که بیان آنها در سلول، در پاسخ به شرایط سخت افزایش می یابد. به دلیل ساخت ویژه، بیشتر آنها بطور دائم بیان شده و دارای عملکرد می باشند. پروتئین های شوک حرارتی در

1- Molecular chaperones
2- Folding
3- Aggregation
4- Heat shock proteins

تسهیل سنتز و تاخوردگی پروتئین‌ها در داخل سلول، همچنین در فرایندهای تجمع¹، ترشح² و انتقال پروتئین‌ها، تجزیه پروتئین و تنظیم فاکتورهای رونویسی و پروتئین‌کینازها نقش ایفا می‌کنند. پروتئین‌های شوک حرارتی همچنین در ارتباط با هسته، اسکلت سلولی و غشاها می‌باشند و به عنوان یک چپرون مولکولی با اتصال به پروتئین‌های نیمه دنا توره، از تجمع برگشت ناپذیر پروتئین‌ها طی استرس پیشگیری می‌کنند. بسیاری از HSP ها در ایفای نقش چپرونی خود، مراحل ابتدایی تاخوردگی و تجمع سایر پروتئین‌های سلولی را تسهیل می‌کنند. افزایش مقادیر سلولی پروتئین‌های شوک حرارتی در مقابل استرس در همئوستاز سلولی اهمیت بسزایی دارد. تغییر در بیان پروتئین‌های شوک حرارتی توسط دسته‌ای از فاکتورهای رونویسی تحت عنوان فاکتورهای شوک حرارتی³ (HSFs) کنترل می‌شود. افزایش دما، قرار گرفتن سلول در معرض فلزات مختلف، آنالوگ‌های آمینواسیدی، کمبود اکسیژن و شرایط بسیاری که موجب کاهش سطح ATP سلولی می‌شوند، همه و همه موجب افزایش بیان پروتئین‌های شوک حرارتی می‌شوند [9-11].

مطالعات کریستالوگرافی، جهش‌های site-directed، بررسی‌های بیوفیزیکی، مطالعات عملکردی و کشف رابطه بین HSP های جهش یافته و بیماری‌ها، نقش و ساختار HSP ها را در سلول بیش از پیش روشن ساخته است [12].

این دسته از پروتئین‌ها به چند گروه تقسیم می‌شوند (جدول 1-1): پروتئین‌های شوک حرارتی HSP60,70,90,100 و پروتئین‌های شوک حرارتی کوچک α -کریستالین. sHSP ها یک خط دفاعی اولیه در برابر استرس می‌باشند که این وظیفه را با اتصال به پروتئین‌های دنا توره، ممانعت از دنا توراسیون برگشت ناپذیر، تسهیل تاخوردگی مجدد⁴ آنها و نیز همکاری با سایر چپرون‌های ملکولی ایفا می‌کنند. بر خلاف سایر چپرون‌ها، این پروتئین‌ها جهت عملکرد خود نیازی به ATP ندارند [13].

1- Assembly
2-Secretion
3-Heat Shoch Factors
4-Refolding

جدول 1-1 طبقه بندی پروتئین های شوک حرارتی [13]

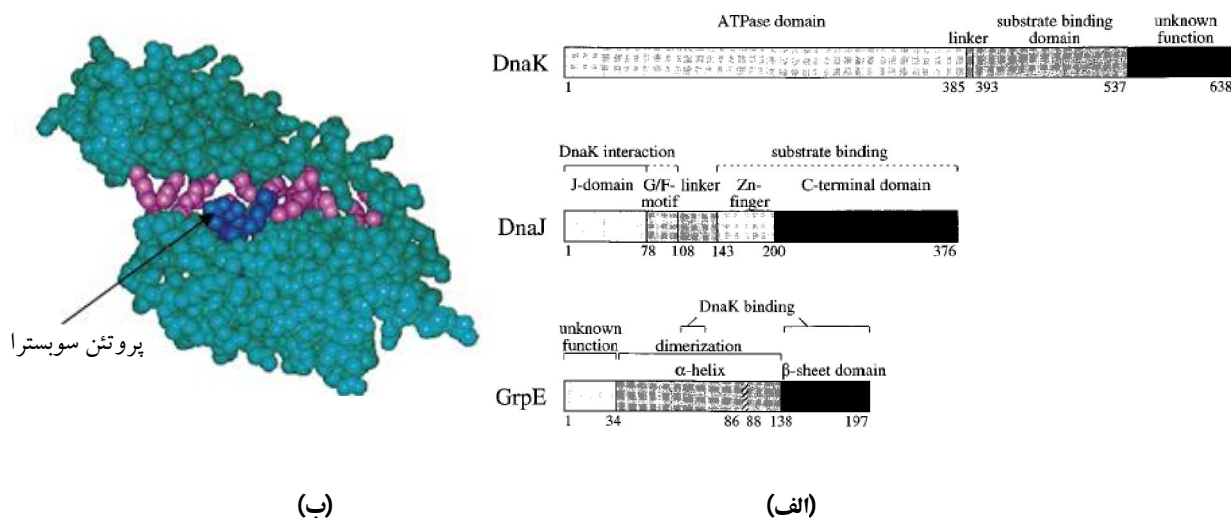
Approximate molecular weight	Prokaryotic proteins	Eukaryotic proteins
10 kDa	GroES	HSP10
Small HSPs, 15-30 kDa	GrpE, IbpAB, HSP17	α A,B-crystallin HSP25/27, HSPB family
40 kDa	DnaJ	HSP40
60 kDa	GroEL, 60 kDa antigen	HSP60 TCP1
70 kDa	DnaK	The HSPA group of HSPs including HSP71, HSC70, HSP72, Grp78 (BiP), HSX70 found only in primates
90 kDa	HtpG	The HSPC group of HSPs including HSP90, Grp94
100 kDa	ClpB, ClpA, ClpX	HSP104, HSP110

1-1-1-1 Hsp60 (GroEL) و Hsp70 (DnaK)

HSP60 و HSP70 دو خانواده چپرونی شناخته شده می باشند که بیشترین اطلاعات چپرونی در مورد آنها در دست است. GroEL و DnaK به ترتیب معادل های باکتریایی این دو پروتئین می باشند. مقدار بسیار فراوان این پروتئین ها در سلول بیانگر نقش مهم آنها می باشد [14].

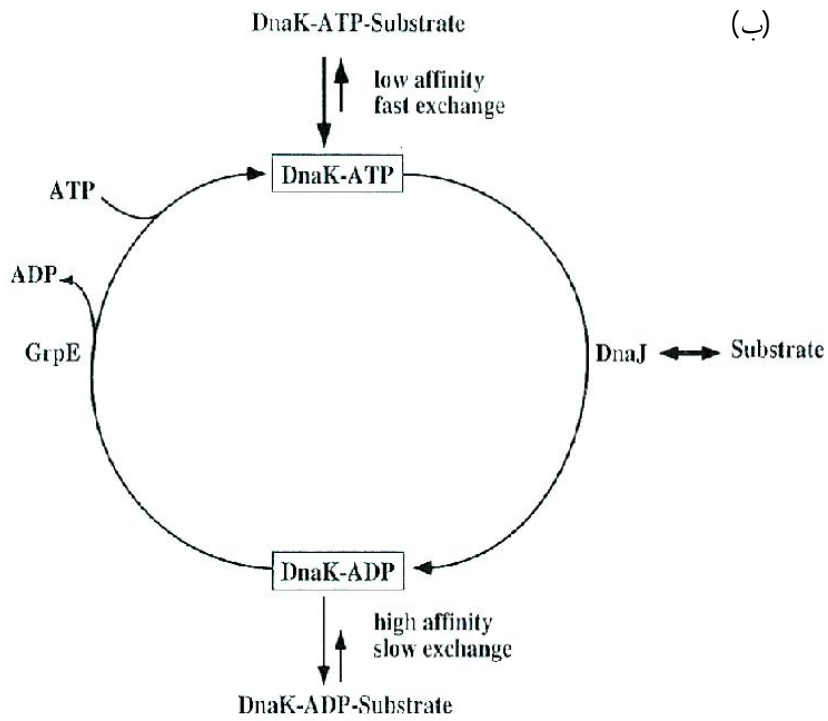
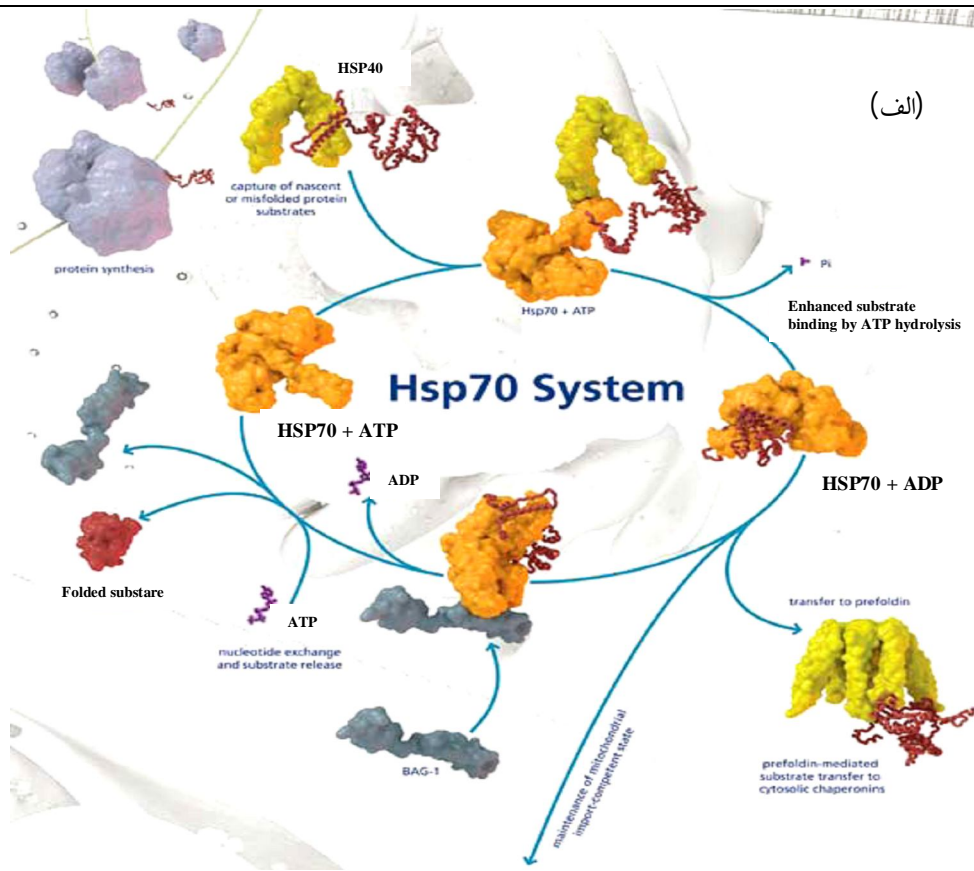
1-1-1-1-1 پروتئین های خانواده Hsp70 /Hsp40

خانواده پروتئینی HSP70 از بزرگترین خانواده های پروتئین های شوک حرارتی هستند. در مقایسه با DnaK باکتریایی، در یوکاریوتها اعضای مختلف این خانواده پروتئینی تحت عنوان HSP70 در اندامک های درون سلولی مختلف بیان و توزیع می شوند که البته خواص ساختاری و بیوشیمیایی مشترکی نشان نمی دهند. پروتئین های خانواده HSP70 دارای بخش های عملکردی مشابهی می باشند: یک دمین ATPase 44 کیلوالتونی در انتهای N- ترمینال و یک ناحیه 25 کیلوالتونی در انتهای C- ترمینال که از دو بخش تشکیل شده است. یک بخش 15 کیلوالتونی حفاظت شده که مسئول اتصال به سوبسترا می باشد و یک بخش 10 کیلوالتونی با حفظ شدگی کمتر در انتهای کربوکسیل پروتئین (شکل 1-1).



شکل 1-1 (الف) دامین های اختصاصی DnaK، DnaJ، GrpE و DnaK: رزیدوهای 386-392 ناحیه اتصال بین دامین ATPase و دامین اتصال به سوبسترا را تشکیل می دهند. رزیدوهای 86-88 تشکیل دهنده انتهای هلیکس N-ترمینال در GrpE منومری که با DnaK میان کنش می دهد. (ب) اتصال پروتئین سوبسترا به DnaK در مدل فضاپرکن [14].

به نظر می رسد کل اعضای خانواده به ATP متصل شده و آن را هیدرولیز می کنند و با پروتئین های در حال تاخوردگی میان کنش می دهند. میان کنش چپرون های HSP70 با پروتئین های تاخوردگی با همراهی ATP و تعدادی از co-chaperone ها می باشد. چرخه واکنش DnaK/DnaJ/GrpE یا همتای یوکاریوتی آنها HSP70/HSP40/BAG-1 به خوبی شناخته شده است. DnaK یا HSP70 در جایگاه باز یا نقطه اتصال به ATP، پروتئین سوبسترا را شناخته و به توالی های آمینواسیدی هیدروفوب یا فاقد ساختار در آن متصل می شوند. اتصال DnaK به سوبسترای پروتئینی موجب هیدرولیز ATP به ADP و تغییرات ساختاری در چپرون شده، و در نهایت به شکل ساختاری بسته اتصال محکمی با سوبسترا برقرار می کند. جابجایی مجدد ADP با ATP، DnaK را به وضعیت اول بازگردانده که آن را جهت شروع چرخه بعدی آماده می کند. این چرخه چپرونی DnaK بین دو حالت بسته و باز، توسط پروتئین یاریگر DnaJ و GrpE در پروکاریوتها و Hsp40 و BAG-1 در یوکاریوتها تنظیم می شود (شکل 1-2). پروتئین های یاریگر DnaJ یا HSP40 اتصال سوبسترا و نیز هیدرولیز ATP را توسط DnaK تسهیل می کنند. پروتئین GrpE تبادل نوکلئوتیدی لازم جهت شروع چرخه جدید را تسهیل می کند. از طریق تکرار اتصال و رهاسازی پروتئین-سوبسترا، ماشین چپرونی DnaK از تاخوردگی پروتئین های نابالغ و تجمع آنها پیشگیری کرده و بدین وسیله تاخوردگی صحیح پروتئین ها در سلول را تضمین می کند [15-18].

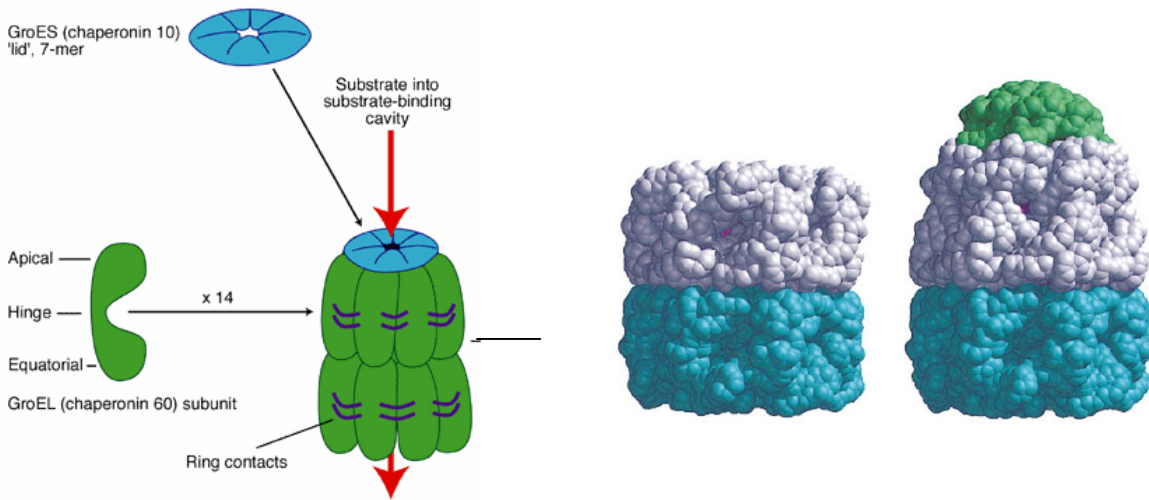


شکل 2-1 (الف) سیستم چپرونی HSP70/HSP40، (ب) DnaK/DnaJ [14]

1-1-1-2 پروتئین های خانواده HSP60 /HSP10

پروتئین های شوک حرارتی 60 کیلودالتنی، در یوکاریوت ها (HSP60) و باکتریها (GroEL)، مانند چپرون های HSP70 در فرایند تاخوردگی پروتئین شرکت می کنند و تحت عنوان سیستم چپرونین¹ شناخته می شوند. پروتئین GroEL در باکتری به شکل قفس و بصورت الیگومری با 14 زیرواحد 57/5 کیلودالتونی می باشد. مونومرهای پروتئینی به صورت دو حلقه 7 تایی و به صورت پشت به پشت، ساختار سیلندری شکلی را به وجود می آورند. کل ساختار یک استوانه توخالی با دیواره ضخیم ایجاد می کند که حدود 150 Å طول و 140 Å قطر دارد و شامل یک حفره مرکزی است. حفره مذکور قابلیت پذیرش سوبستراهای پروتئینی تا وزن مولکولی 60 کیلودالتون را داراست. هر زیرواحد دارای 574 آمینواسید بوده و سه دمین مجزا دارد. دمین استوایی² که بزرگترین دمین بوده و ساختار غالب آن به صورت α -هلیکس می باشد دارای جایگاه اتصال ATP و نیز مسئول اتصال زیرواحدهای پروتئین به یکدیگر است. دمین انعطاف پذیر راسی³ غنی از آمینواسیدهای هیدروفوب می باشد و جایگاه میان کنش با سوبسترای پروتئینی و پروتئین کمکی⁴ GroES است. دمین سوم بصورت یک لولا، پل ارتباطی دو بخش قبلی بوده و موجب انتقال اثرات آلوستریکی می گردد. این دومین حد واسط⁵ در مسیر شعاعی 25 \AA گسترش یافته و در نتیجه موجب افزایش قطر داخلی حفره در حد 90 \AA می شود. GroES بعنوان چپرون همراه، یک پروتئین گنبدی شکل⁶ تشکیل شده از 7 زیرواحد 10 کیلودالتونی است که با اتصال نامتقارن (اتصال به یک سمت) یا متقارن (اتصال از دو سمت) به بخش راسی مونومرهای GroEL، سبب هماهنگی و تعاون میان هیدرولیز ATP و تاخوردگی تسهیل شده پلی پپتید نانخورده هدف می گردد (شکل 1-3) [19-21].

-
- 1- Chaperonines
 - 2- Equatorial domain
 - 3- Flexible apical domain
 - 4-Co-chaperone
 - 5- Intermediate domain
 - 6- Dome- like



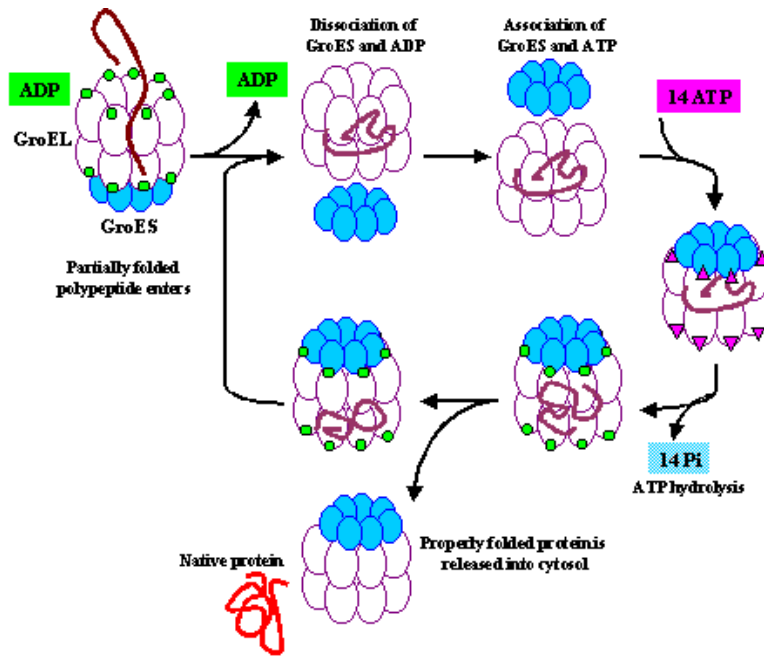
شکل 1-3 چپرونین GroEL-GroES

در عدم حضور ATP، در حاشیه داخلی و رو به حفره ی بخش رأسی زیرواحدهای GroEL، سطوح هیدروفوبی در دسترس قرار می گیرد که به نواحی هیدروفوب و غیرقطبی پلی پپتیدهای تازه سنتز شده و نیز حد واسط های تاخوردگی متصل می شوند. بخش شناساگر در نواحی یاد شده اختصاصی عمل نکرده و قادر است به مناطق هیدروفوب طیف وسیعی از سوبستراهای پلی پپتیدی متصل گردد. حدواسط مستعد تجمع¹ بصورت ایزوله و بدور از عوامل مزاحم محیطی و در وضعیت تجمع نیافته²، درون حفره مرکزی توقیف شده و در نهایت متحمل تاخوردگی صحیح گردد. حجم محدود حفره ی مذکور مجوز ورود بیش از یک رشته ی پلی پپتیدی را نداده و بدین سان میانکنش های بین ملکولی ناخواسته و احتمال تولید توده های غیرفعال پروتئینی به حداقل می رسد. هر چند در مواردی نسبت 1:1 بین سوبسترای پروتئینی و ماشین چپرونی با ورود همزمان دو رشته ی پلی پپتیدی به حفره ی مرکزی چپرون نقض شده است. مکانیسم عمل سیستم بدینگونه است: ابتدا هفت مولکول ATP و سوبسترای پروتئینی که بطور ناصحیح تاخورده است به GroEL متصل می شود. سوبسترا از طریق گروه های هیدروفوب در دسترس خود به بسته های هیدروفوبی دمین رأسی GroEL مرتبط است. سپس با اتصال سیس GroES (GroES و سوبسترا در یک سمت) یک تغییر کونفورماسیونی در حلقه ایجاد می شود که بموجب آن، حلقه سیس عریض تر و طولیتر شده و حجم آن به بیش از دو برابر می رسد، بطور همزمان نیز

1- Aggregation- prone intermediate

2- Non- aggregate

بسته های هیدروفوبیک را به داخل GroEL می راند که منجر به جدایی سوبسترا از محل اتصالش می شود (شکل 4-1). اینک پروتئین در محفظه ای بزرگ و بسته شروع به تا خوردن می کند. حفره محیطی برای سوبسترای پروتئینی فراهم می کند تا مانع تجمع غیراختصاصی آن با سایر پروتئین های غلط تاخورد شده شود. هیدرولیز ATP با القاء تغییر ساختاری دیگری در زیرواحدهای چپرونین، رها سازی سریع GroES و سوبسترای پروتئینی تاخورد شده یا مستعد تا خوردگی صحیح را موجب می گردد. علاوه بر اثبات اثرات آلوستریکی GroES ضمن اتصال ترانس، نقش دخالت مستقیم این پروتئین در القاء تا خوردگی پروتئین هدف بدلیل وجود گزارش هایی مبنی بر اتصال سپس آن به GroEL نیز مطرح شده است. به نظر می رسد سیستم چپرونی GroE با یک یا چند دوره اتصال و رهاسازی راه را برای کسب ساختار سه بعدی صحیح سوبسترای پروتئینی هموار می کند (شکل 4-1) [22-24].



شکل 4-1 مکانیسم دو مرحله ای اتصال- رهاسازی سیستم چپرونی GroEL

هر سیکل به طور متوسط 15 الی 20 ثانیه به طول می انجامد که برابر سرعت ترجمه یک پلی پپتید بر روی سیستم ریبوزومی است. پروتئین های کوچکتر در یک سیکل و انواع بزرگتر طی چندین دوره ی اتصال و رهاسازی، فرم طبیعی خود را باز می یابند. دو

مدل برای فعالیت چپرونی GroE مطرح شده است. نقطه اشتراک در هر دو مدل این است که پروتئین های تاخوردده یا به غلط تاخوردده توسط نواحی هیدروفوب در دسترس تشخیص داده شده و به نواحی هیدروفوب داخل حفره GroEL متصل می شوند. در مدل اول، عملکرد حفره دناتوره کردن حدواسط های غیرمطلوب و رهاسازی آن به محیط اطراف جهت انجام تاخوردگی خودبخودی¹ است. در مدل دیگر این سیستم با اتصال به سطوح هیدروفوب پروتئین هدف و فراهم آوردن محیط ایزوله جهت جلوگیری یا مهار تجمع و تسهیل تاخوردگی پروتئین هدف عمل می کند. اما در اغلب گزارشات مربوط به تاخوردگی اشاره شده است که GroEL از طریق اتصال و رهاسازی پیاپی سوبسترا، تاخوردگی آن را تسهیل می کند که به این حالت اتصال تکرارشونده² اطلاق می شود. با وجود موفقیت در استخراج و خالص سازی ماشین چپرونی GroEL، استفاده از آن را بدلیل قیمت بالا، غلظت بالای مورد نیاز، ناپایداری با توجه به طبیعت پروتئینی، وابستگی به ATP و GroEL، در *in-vitro* و نیز صنعت بعنوان عامل کمک کننده تاخوردگی³ محدود کرده است. همچنین مشخص شده است که ناحیه رأسی GroEL به خودی خود و بدون نیاز به ATP و GroES و با وجود فقدان حفره مرکزی و با توجه به ساده بودن مکانیسم در مقایسه با مجموعه ی کامل GroE، بصورت یک مینی چپرون⁴ نسبتاً موفق عمل می کند. مشاهده شده است که خاصیت هیدروفوبیسته سطحی در پروتئین هایی نظیر کریستالین، توبولین و کارژین نوعی خاصیت شبه چپرونی را برای آنها به ارمغان آورده است [24-29].

1-1-1-1-3 پروتئین های خانواده HSP90

این خانواده پروتئینی تقریباً 1% پروتئین های سلولی را در سلول های غیراسترسی تشکیل می دهد و از بزرگترین خانواده های چپرونی شناخته شده می باشند. پروتئین های این خانواده چپرونی نقش مهمی در مسیرهای چندگانه انتقال سیگنال⁵ ایفا می کنند. حضور همولوگ باکتریایی این پروتئین، یعنی خانواده پروتئینی HtpG جهت حیات سلول ضروری نیست، اما پروتئین HSP90 در بقای سلول یوکاریوتی نقش حیاتی دارد. برخلاف سایر پروتئین های شوک حرارتی که نقش چپرونی خود را روی طیف وسیعی از سوبستراهای پروتئینی ایفا می کنند، HSP90 دارای ویژگی سوبسترایبی است. به عنوان مثال HSP90 با انواعی از پروتئین کینازها و فاکتورهای رونویسی درگیر در رشد و تکامل سلول میان کنش می دهند. HSP90 دارای دو جایگاه چپرونی است که یکی از آنها غیر وابسته به ATP است. با این وجود مانند بسیاری از پروتئین های شوک حرارتی، در بخشی از چرخه چپرونی خود

1- Spontaneous folding

2- Iterative annealing

3- Folding aid

4- Mini-chaperone

5- Multiple signal transduction