ژنتیک نوین
دوره یازدهم، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵
صفحه ۱۸۳-۱۷۳

مدل‌سازی نرم‌افزاری پروتئین تنش گرمایی۷۰ (HSP70) طیور

Software modeling of heat-shock protein 70 (HSP70) of poultry

الهام رضوان‌نژاد*[۱]، مجتبی مرتضوی[۱]، علی ریاحی مدوار[۱]

۱- استادیاران، پژوهشگاه علوم وتکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی وفناوری پیشرفته کرمان

Rezvannejad E[1*], Mortazavi M[1], Riahi Medvar A[1]

1- Assistant Professors, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: Rezvannejad2002@yahoo.com

(تاریخ دریافت: ۹۳/۹/۲- تاریخ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲۵)

چکیده

پروتئین‌های تنش گرمایی (HSP) فراوان‌ترین پروتئین‌های داخل سلولی هستند. سنتز آن‌ها به سرعت توسط عوامل تنش‌زای مختلف از جمله درجه حرارت، محرومیت از گلوکز و عفونت‌ها افزایش می‌یابد. این پروتئین‌ها نقش مهمی در زنده مانی سلول‌ها تحت شرایط تنش و پایداری شرایط داخلی سلول (هوموستازی) بازی می‌کنند. از آن‌جا که ساختار کریستالوگرافی این پروتئین در طیورکه خسارات زیادی از تنش گرمایی می‌بینند، گزارش نشده است، مدل‌سازی ساختار HSP70 در طیور می‌تواند زمینه تشخیص مکانیسم عمل این پروتئین در مقابل تنش‌های محیطی را فراهم نموده و هزینه‌های مربوط به تنش‌های محیطی را کاهش دهد. به همین منظور در تحقیق حاضر مدل‌سازی ساختار سه بعدی پروتئین HSP70 در طیور گونه *gallus Gallus* برای شناسایی دمین‌های ساختاری و جایگاه‌های ویژه آن انجام گرفته است. مدل‌سازی سه بعدی به روش همولوژی مدلینگ و با استفاده از الگوی مناسب با میزان شباهت بالا که از پایگاه داده PBD تهیه شده بود (HSP70*Homo sapiens* و HSC70 *Bovine*) و به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی I-TASSER و Swiss Model انجام شد. به‌منظور ارزیابی و مطالعه ساختاری مدل ساخته شده از نرم‌افزارSPDBV استفاده شد. همچنین نمودارهای راماچاندران نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند. ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها براساس پارامترهای C-score، TM-score و RMSD انجام شد که نشان داد مدل پیشنهادی برای HSP70 طیور دارای کیفیت و پایداری مناسبی می‌باشد. در مجموع مدل‌سازی HSP70 طیور اولین مرحله در شناسایی ساختار پروتئینی این چاپرون می‌باشد که با توجه به شباهت بالای توالی اسید آمینه‌ای این چاپرون با چاپرون‌های تعیین ساختار شده می‌توان در آنالیزها و طراحی‌های بعدی از این مدل‌ها با ضریب اطمینان بالا استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی

پروتئین تنش گرمایی۷۰
تنش گرمایی
چاپرون
طیور
مدل‌سازی

مقدمه

هوموستازی توانایی یک سیستم باز در تنظیم محیط داخلی برای حفظ شرایط پایدار با استفاده از تعادل پویای چندگانه می‌باشد که با مکانیسم‌های تنظیمی مرتبط می‌باشد. در تمام موجودات زنده، خواه جانداران تک یاخته‌ای یا چند یاخته‌ای، هوموستازی وجود دارد. برای حفظ تعادل پویا و انجام موثر عملکردهای خاص، یک سیستم باید اختلال را شناسایی و به آن پاسخ دهد. پس از تشخیص اختلال معمولا سیستم‌های بیولوژیکی از طریق خودتنظیمی منفی به آن پاسخ می‌دهند، به این معنی که با کاهش یا افزایش فعالیت هر اندام یا سیستم، شرایط ثابت می‌شود. پروتئین‌های تنش گرمایی (HSPs[1])، نوعی از پروتئین‌های سلولی هستند که در شرایط نرمال محیطی در درون سلول وجود داشته اما سطح بیان آن‌ها زمانی که سلول در شرایط تنش یا شوک قرار می‌گیرد افزایش می‌یابد (Robert 2003). دلیل نامیدن این نوع پروتئین‌ها به پروتئین‌های تنش گرمایی از آنجا ناشی می‌شود که این پروتئین‌ها برای نگهداری هوموستازی[2] در سلول ضروری بوده و به زنده مانی سلول در زمان تنش کمک می‌کنند (Feder and Hofman 1999; Serensen et al. 2003; Sikora and Grzesiuk 2007). مطالعات مختلفی که بر روی موجودات متفاوت و الگوی بیان این پروتئین‌ها تحت شرایط تنش انجام شده‌است، نشان می‌دهد که پاسخ به تنش گرمایی محدود به برخی از موجودات نبوده و گستره وسیعی از حیات از *E.coli* تا *Homo sapiens* را در برگرفته است (Schlesinger 1986). همچنین ثابت شده که علاوه بر شرایط تنش گرمایی، فاکتورهای متعدد محیطی و فیزیکی نیز در افزیش HSPهای سلول نقش دارند (Tomanek 2002). از جمله تنش‌های 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 تنش‌های داخلی اشاره نمود (Feder and Hofmann 1999; Diamante et al. 2001). علاوه بر این، شرایط آب و هوایی و وضعیت ژئوگرافی نیز نقش مهمی در میزان بیان پروتئین‌های تنش گرمایی در یک موجود زنده بازی می کنند (Feder 1999).

پروتئین‌های تنش گرمایی در اندازه‌هایی از ۲۷ تا۱۱۰ کیلو دالتون وجود دارند و بر اساس وزن ملکولی و عملکردشان به پنج گروه تقسیم می‌شوند (Moseley 1997). این پروتئین‌ها شامل HSP با وزن ملکولی پایین، HSP60، HSP70، HSP90 وHSP با وزن ملکولی بالا هستند (Joe et al. 2000). گروه پروتئین‌های تنش گرمایی با وزن ملکولی پایین، یک خانواده بزرگ از چاپرون‌ها[3] هستند و دارای یک زنجیره ثابت در انتهای کربوکسیل خود می‌باشند که از ۹۰ اسیدآمینه تشکیل شده و به عنوان زنجیره α-کریستال نام‌گذاری شده است (Basha et al. 2006). این دسته از HSPها، در هر دو گروه سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت دارای وزن ملکولی ۱۵ تا۴۲ کیلودالتون هستند (Sun et al. 2002).

پروتئین‌های شوک گرمایی۶۰ اولین گروه از پروتئین‌های تنش گرمایی هستند که بنام چاپرون‌های ملکولی نامیده شده‌اند و نقش آن‌ها به کمک مطالعات ژنتیکی و بیوشیمیایی ثابت شده‌است. پروتئین HSP60 در سلول در شرایط نرمال وجود دارد اما سطح بیان آن در شرایط تنش گرمایی افزایش می‌یابد. هم‌چنین این پروتئین در بسیاری از فرآیندهای سلولی و فولدینگ[4] پروتئین‌ها نقش اصلی را دارد (Vierling 1991). علاوه بر این، این چاپرون‌های پروتئینی یک توالی نشانگر پیشرفته جهت مطالعه ژنوم میتوکندریایی هستند (Karlin and Brocchieri 2000). گروه پروتئین‌های HSP70 (۶۸-۷۳kDa) بین همه گونه‌های موجودات زنده به میزان بالایی حفاظت شده و مشابه است (Gupta and Singh 1994; Krebs and Bettencourt 1999; Renner Renner and Waters 2007). این چاپرون نقش مهمی در فولدینگ پپتیدهای تازه سنتز شده و محافظت از سلول‌های تحت شرایط تنش دارد. همچنین در انتقال پروتئین بین سلول‌ها و مرگ سلولی نقش اصلی را به عهده دارد (Hohfeld et al. 2001; Shaner and Morano 2007). در یوکاریوت‌ها حداقل سه نوع HSP70 وجود دارد که هر کدام از آن‌ها در سه بخش متفاوت سلول شامل:

[1] Heat-shock proteins
[2] Homeostasis
[3] chaperon
[4] Folding

سیتوپلاسم، میتوکندری و شبکه آندوپلاسمی وجود دارند (Renner and Waters 2007). تنظیمات خانواده HSP70 تحت تاثیر تنش گرمایی، مواد شیمیایی سمی و فلزات سنگین مانند آرسنیک، کادمیوم، مس و غیره می‌باشد (Gehrmann et al. 2008). خانواده پروتئین‌های HSP90 (۸۵-۹۰kDa) چاپرون‌های ملکولی ضروری هستند که نقش مهمی در انتقال پیام، کنترل سیکل سلولی، مدیریت تنش، فولدینگ و انتقال پروتئین‌ها دارند. این پروتئین‌ها در یک شکل در همه موجودات وجود دارند که نشان‌دهنده این است که این نوع پروتئین قدیمی و محافظت شده می‌باشد (Chen et al. 2006).

در شرایط تنش گرمایی که یکی از مهم‌ترین مشکلات در طیور می‌باشد، عوارض رفتاری و فیزیولوژیکی مختلفی بروز می‌کند (Altan et al. 2003). این نوع از تنش بر روی میزان مصرف خوراک، نرخ رشد، شبکه عصبی، عملکرد سیستم ایمنی و همچنین نرخ مرگ و میر طیور نیز تاثیر منفی دارد (Smith 1993). زمانی که موجودات زنده در شرایط تنش گرمایی قرار می‌گیرند، سنتز اکثر پروتئین‌ها به تاخیر می‌افتد اما پروتئین‌های تنش گرمایی به‌طورسریع سنتز می‌شوند (Al-Aqil and Zulkifli 2009). از بین انواع پروتئین‌های تنش گرمایی، HSP70 یکی از مهم‌ترین خانواده‌های پروتئینی محافظت شده می‌باشد که به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است (Deane and Woo 2005; Ming et al. 2010). اما از آنجاکه تا کنون ساختار سه بعدی کریستالوگرافی پروتئین HSP70 در طیور مشخص نشده‌است و با توجه به اهمیت این پروتئین در محافظت از سلول در برابر تنش‌های محیطی، تعیین ساختار سه بعدی آن از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تحقیق حاضر به منظورمدل‌سازی ساختار سه بعدی پروتئین HSP70 در گونه *Gallus gallus* برای شناسایی دمین‌های ساختاری و جایگاه‌های ویژه آن انجام گرفته و انتظار می‌رود این اطلاعات زمینه شناسایی جایگاه‌های اتصال با یون‌ها جهت مهار و یا افزایش فعالیت این چاپرون را در آینده فراهم نماید. دیگر اهمیت تعیین ساختار HSP70 در طیور این است که می‌تواند زمینه تشخیص مکانیسم عمل این پروتئین در مقابل تنش‌های محیطی را فراهم کرده و هزینه‌های مربوط مبارزه با تنش‌های محیطی را کاهش دهد.

مواد و روش‌ها

تهیه توالی HSP70 طیور

در ابتدا مطالعاتی در بانک اطلاعاتی PDB انجام گرفت که نشان داد تاکنون هیچ مدل ساختاری از پروتئین HSP70 طیور گزارش نشده‌است و ساختار کریستالی این پروتئین تا کنون تعیین نشده است. لذا به‌منظور تعیین مدل ساختاری این پروتئین، در ابتدا لازم بود که توالی اسید آمینه این پروتئین تهیه می‌شد. بدین منظور، توالی پروتئینی HSP70 طیور (با کد شناسایی NP_001006686.1 و با نام heatshock70kDaprotein [*Gallus gallus*]) از پایگاه داده بیوتکنولوژی (NCBI) به فرمت fasta تهیه شد.

آنالیز توالی و تهیه مدل

توالی تهیه شده از طریق ابزار Blast در پایگاه داده PDB آنالیز شد و از این طریق الگوی مناسبی با شباهت قابل قبول و همچنین E-Vlue پایین بدست آمد. در مرحله اول پروتئین HSP70 (DOI:10.2210/pdb4fsv/pdb) انسانی انتخاب شد، اما مطالعه ساختار کریستال شده این پروتئین نشان می‌دهد که ساختار کریستالوگرافی شده این پروتئین کامل نبوده و تنها تا اسید آمینه شماره ۳۸۷ این ساختار کریستال شده‌است. با توجه به این‌که پروتئین HSP *Gallus gallus* حدود ٦٣٤ اسید آمینه دارد استفاده از این ساختار در مدل‌سازی اطلاعات ناقصی به ما می‌داد. از طرفی آنالیز بیشتر توالی مورد نظر، نشان دهنده شباهت توالی پروتئین HSP70 *Gallus gallus* با توالی HSC70 *bovine* (DOI:10.2210/pdb4fl9/pdb) بود. آنالیز ساختار HSC70 *bovine* نیز نشان داد که ساختار کریستاله این پروتئین تنها تا اسیدآمینه شماره ٥٥٤ تعیین شده‌است. در نتیجه مدل‌سازی پروتئین HSP70 *Gallus gallus* بدون پیشنهاد اولیه الگو برای مدل‌کردن نیز انجام شد.

مدل‌سازی

مدل‌سازی به روش همولوژی مدلینگ و به کمک پایگاه‌های اطلاعاتی I-TASSER و Swiss Model (Schwede et al. 2003; Yang 2008) انجام شد. به‌منظور آنالیز جامع ساختاری، مدل-سازی در این دو پایگاه اطلاعاتی انجام شد. ساختار ایجاد شده بایستی حداقل انرژی را در وضعیت تمام اتم‌های خود داشته باشد. در پایگاه اطلاعاتی I-TASSER ابتدا یک هم‌ترازی صورت

می‌گیرد. این هم‌ترازی به کمک آنالیز توالی اولیه دربرنامه‌های MUSTER، FFAS-3D، SPARKS-X، HHSEARCH2، HHSEARCHI، Neff-PPAS، HHSEARCH، pGenTHREADER، wdPPAS و cdPPAS انجام می‌شود. خروجی این ده برنامه به‌صورت 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 ترازی در این ده برنامه، پنج مدل پیش‌بینی می‌کند. ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها براساس پارامترهای C-score می‌باشد. مدل‌سازی ساختار در I-TASSER براساس ارزیابی کیفی موضعی ساختار (structurelocalquality) و بتا فاکتور (β-factor) نرمالایز شده، می‌باشد. کیفیت موضعی ساختار مدل‌سازی شده به Z-score و بتا فاکتور (β-factor) نرمالایز شده بستگی دارد. به میزان انحراف فاصله بین یک رزیجیو[1] 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 ساختاری محاسبه می‌شود. بهترین مدل از بین این پنج مدل براساس این پارامترها انتخاب شد. در پایگاه اطلاعاتی Swiss Model نیز سه مدل پیشنهاد شد که ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها براساس پارامترهای GMQE وQMEAN4 می‌باشد و بهترین مدل از بین این ۳ مدل براساس این پارامترها انتخاب شد. تابعQMEAN4 یک تابع حسابی مرکب برای ارزیابی کیفیت global و local ساختار مدل‌سازی‌شده می‌باشد. تابعQMEAN4 شامل چهار توصیف ساختاری پتانسیل زاویه چرخش، پتانسیل فاصله اتم‌ها، اثر متقابل کربن بتا و پتانسیل حلال پوشی می‌باشد. GMQE[2] یک ارزیابی کیفی است که خصوصیات هم‌ترازی مدل–الگو را ترکیب می‌کند. به‌منظور ارزیابی و مطالعه ساختاری مدل ساخته‌شده از نرم‌افزار SPDBV (http://spdbv.vital-it.ch/) استفاده شد. همچنین نمودارهای راماچاندران نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گرفتند.

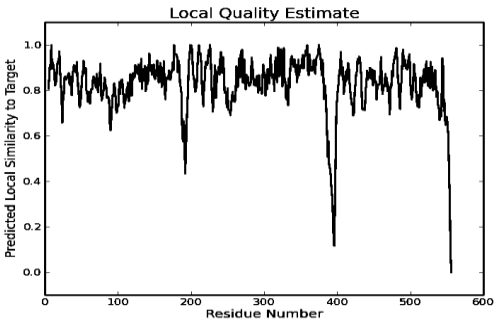
[1] Residue
[2] Global Model Quality Estimation

نتایج

همانطور که گفته شد، مدل‌سازی ساختار سه بعدی HSP70 طیور با استفاده از دو پایگاه اطلاعاتی I-TASSER و Swiss Model انجام شد. فرایند مدل‌سازی در Swiss Model بر اساس انتخاب یک الگوی با شباهت بالا با پروتئین هدف انجام می‌شود. الگوی منتخب در Swiss Model پروتئین bovine HSC70 (4fl9.1.A) می‌باشد که دارای ٦٣٩ اسیدآمینه است و در سال ۲۰۱۲ با قدرت تفکیک ۱/۸ آنگستروم کریستالوگرافی شده‌است (Vogel et al. 2006). از آنجاکه میزان شباهت الگو با پروتئین هدف بسیار زیاد است، لذا این احتمال را ایجاد می‌کند که مزیتی در مدل‌سازی برای آن وجود ندارد. اما باید خاطر نشان کرد که با توجه به اهمیت این پروتئین در شرایط تنش و درگیر بودن آن در بسیاری از شرایط نامساعد محیطی اولین قدم در انجام مطالعات بعدی جهت طراحی لیگاندهای فعال‌کننده یا مهارکننده در شرایط تنش، قطعاً مدل‌سازی این پروتئین می‌باشد. میزان هم‌سانی زنجیره اسید آمینه HSP طیور با HSC70 گاوی و دیگر خصوصیات این مدل-سازی در جدول ۱ نشان داده شده‌است (جدول ۱). نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی ساختار و میزان Z-score در مورد تابع حسابی مرکب QMEAN4، تمامی اتم‌ها، کربن بتا، حلالیت و زوایای چرخشی در شکل ۱ نشان داده شده‌است. لازم به ذکر است که با توجه به این‌که تنها ۵۵۳ رزیجیو از پروتئین bovine HSC70 (4fl9.1.A) در ساختار کریستال شده پروتئین HSC70 گاوی وارد شده‌اند در نتیجه فقط تا اسید آمینه شماره ٥٥٦ از پروتئین HSP طیور با HSC70 گاوی هم‌ردیف شد و مدل‌سازی انجام شد و برای حدود ۸۰ رزیجیو فرایند مدل‌سازی انجام نشد. شکل ۲ تصویر ساختار مدل شده را نشان می‌دهد. هرچند ممکن است که عدم وجود این قسمت از پروتئین هدف در مدل نهایی ساخته‌شده اشکالی ایجاد نکند اما به‌منظور آنالیز جامع ساختاری و دست‌یابی به یک مدل که طول بیش‌تری از توالی این را پوشش دهد، فرایند مدل‌سازی در پایگاه اطلاعاتی I-TASSER نیز انجام شد. مدل‌سازی ساختار در I-TASSER براساس ارزیابی کیفی موضعی ساختار و بتا فاکتور نرمالایز شده، می‌باشد.

جدول ۱- میزان هم‌سانی زنجیره اسید آمینهHSP70 طیور با HSC70 گاوی

Template	Seq Identity	Oligo-state	Found by	Method	Resolution	Seq Similarity	Range	Coverage	Description
4f19.1.A	۸۹/۸۶	monomer	BLAST	X - ray	۱/۹۰A	۰/۵۷	۵-۵۵۶	۰/۸۷	Heat shock cognate protein 71kDa

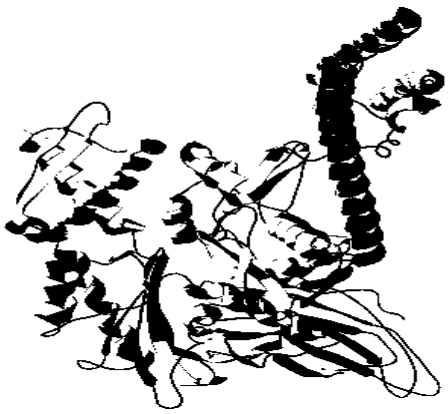


شکل ۱- نمودارهای ارزیابی کیفی موضعی ساختار و نمودار Z-score

در پایگاه اطلاعاتی I-TASSER به کمک آنالیز توالی اولیه در ده برنامه پایه‌ای این پایگاه ابتدا یک هم ترازی صورت می‌گیرد. سپس I-TASSER به کمک خروجی این ده برنامه و ده ساختار ایجاد شده، چند مدل پیش‌بینی می‌کند. شکل ۳ تصویر ساختار مدل شده را نشان می‌دهد. ساختار مدل‌سازی شده در I-TASSER از ٦٣٣ رزیجیو تشکیل شده و تقریباً تمامی ساختار را پوشش می‌دهد. در مدل ارائه شده درصد ساختارهای ثانویه پیش-بینی شده به‌صورت شکل ٤ می‌باشد. پیش‌بینی I-TASSER در مورد ساختارهای ثانویه آلفا هلیکس در شکل ٤ به‌صورت H قرمز رنگ، در مورد صفحات بتا به‌صورت S آبی رنگ و نواحی راندوم کویل به‌صورت C نمایش داده شده است.

در مدل ارائه شده در I-TASSER میزان بتا فاکتور (β-factor) ۹ نرمالایز شده پیش‌بینی شده برای توالی کامل این پروتئین به-صورت شکل ۵ می‌باشد. رزیجیوهایی با بتا فاکتور بالاتر از ۲ از پایداری کم‌تری در آزمایشات ساختاری برخور دارند. همانطورکه مشاهده می‌شود تعداد اندکی از رزیجیوها دارای بتا فاکتور بالاتر از ۲ بوده و درصد بالایی از رزیجیوها بتا فاکتور آن‌ها در این مدل منفی بوده و این ضریب اطمینان بالایی برای مدل ساخته شده فراهم می‌کند (شکل۵). ارزیابی کیفیت ساختاری این مدل‌ها براساس پارامترهای C-score، TM-score و RMSD می‌باشد.

شکل ۲- ساختار مدل‌سازی شده HSP70 طیور در Swiss Model.



شکل۳- ساختار مدل‌سازی شده HSP70 طیور در I-TASSER

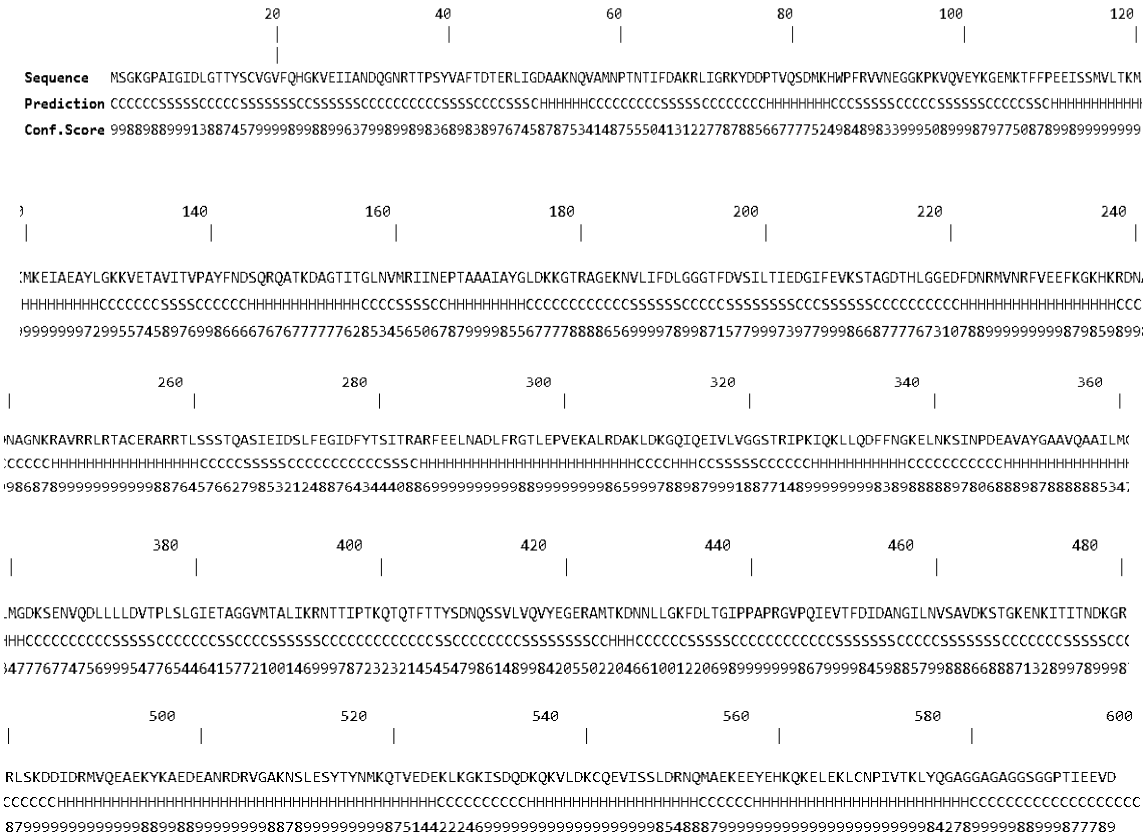
درصد این پارامترهای برای مدل ساخته شده به‌صورت زیر می‌باشد.

C-score=0.14 (Read more about C-score)
Estimated TM-score = 0.73±0.11
Estimated RMSD = 7.5±4.3Å

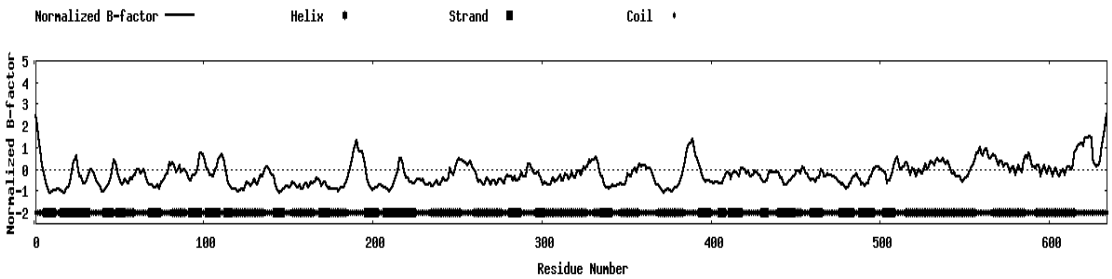
میزان C-score بین ۵- تا ۲+ بوده و میزان بالاتر آن نشان دهنده ضریب اطمینان بالاتر مدل ساخته شده می‌باشد. در مدل ساخته شده در I-TASSER از ٦٣٦ رزیجیو استفاده شده و در (شکل۳) نشان داده شده‌است.

بحث

پیشگویی ساختار سوم بعضی از پروتئین‌ها که ساختار کریستال آن‌ها تعیین نشده‌است مزایای زیادی دارد. به‌عنوان مثال، اگر پروتئینی نقش حیاتی در مسیرهای شناخته شده داشته باشد یا نقش آن در مکانیسم بروز یک بیماری و یا در شرایط خاص معلوم باشد، پیشگویی ساختار آن از طریق ابزار شبیه‌سازی برای طراحی دارو یا محرک فعال‌سازی و یا مهار یک پروتئین خاص در یک بیماری و یا شرایط خاص با شبیه‌سازی ساختار سوم آن پروتئین مقرون به صرفه می‌باشد. در شرایط تنش‌های محیطی مانند تنش‌های فیزیکی وشیمیایی و تابش، موادسمی، آلودگی‌های ویروسی، اتانول، آرسنیک، تزریق اکسیژن بعد از کمبود اکسیژن یا انتقال میزان سنتز پروتئین‌های تنش گرمایی که پروتئین‌های تنش نیز خوانده می‌شوند، افزایش می‌یابد. افزایش این پروتئین‌ها از سلول‌ها در برابر تنش مازاد محافظت می‌کند. پروتئین‌های تنش گرمایی علاوه براین‌که باعث می‌شوند سلول‌ها در مقابل عوامل مضرمحافظت شوند، منجر می‌شوند سلول‌ها در برابر آپاپتوزیس نیز مقاوم‌تر شوند مهم‌ترین آن‌ها HSP70 می‌باشد که گفته می‌شود، سلول‌ها را در برابر لیزشدن توسط اثر سمی NO نیز محافظت می‌کند. پیش‌گویی ساختار HSP70 در طیور می‌تواند اولین قدم در جهت بدست آوردن اطلاعات در مورد خواص ساختاری این پروتئین به منظور افزایش فعالیت آن در شرایط تنش محیطی باشد. پروتئین HSP70 یک پروتئین دو دمینی وابسته به ATP می‌باشد. این پروتئین دارای یک دمین در انتهای آمینی با فعالیت ATPase بوده که ATP را به‌ADP و فسفات تجزیه می‌کند (Nollen et al. 2001)، و یک دمین در انتهای کربوکسیلی آن با فعالیت اتصال به سوبسترا می‌باشد. سوبسترای HSP70 پپتیدهای هیدروفوب می‌باشند. دمین به دو زیر دمین I و II تقسیم می‌شود که ATP به شکاف بین این دو زیر دمین متصل می‌شود. با هیدرولیز ATP به کمک چاپرون کمکی HSP40 دو دمین HSP70 از هم دور می‌شوند (Guzhova et al. 2005). در این هیدرولیز رزیجیوی آرژنین ۱۷۳ و تیروزین ۳۷۱ و ایزولوسین ۱۸۱ از HSP70 نقش دارند (Chou et al. 2003; Jiang et al. 2007). با توجه به این‌که بسیاری از اطلاعات ساختاری از مدل‌سازی HSP70 انسانی وHSP70 گاوی به دست آمده‌است و با توجه به تشابه بالای توالی دو پروتئین HSP70 طیور و HSP70 گاوی می‌توان دمین‌هایی مشابهی را برای HSP70 طیور در نظر گرفته و مشابه آن ساختارها را در HSP70 طیور پیش‌بینی نمود. رزیجیوهای درگیر در فرایند هیدرولیز ATP را می‌توان با استفاده از مطالعات Blast و آنالیز دقیق مدل شناسایی نمود. ساختار HSP70 انسانی قبلا مدل‌سازی شده‌است (Chernorizov and Svedas 2010). هر چند ساختار کریستال بخشی از HSP70 انسانی تعیین شده بود اما به منظور درک بهتر مدل‌سازی از تصویری که قبلاً تهیه شده بود استفاده شد. شکل ٦ مقایسه ساختارHSP را در این دو گونه نشان می‌دهد. در این شکل ساختار دمین N-ترمینال HSP70 انسانی با ساختار HSP70 طیور که در Swiss Model و I-TASSER مدل‌سازی شده‌است را مشاهده می‌کنید (شکل٦). با هیدرولیز ATP، دمین اتصال به سوبسترا از حالت بسته به حالت باز تغییر شکل می‌دهد در حالی‌که کلاهک آلفا هلیکسی در دسترس بودن آن را برای جایگاه‌های هیدروفوبی پپتیدهای هدف تنظیم می‌کند (Zhu et al. 1996). همانطور که اشاره شد دمین C-ترمینال از یک زیر دمین صفحات بتا (βSBD) و یک کلاهک آلفا هلیکسی (αSBD) تشکیل شده‌است (Jiang *et al*. 2007). مقایسه ساختار دمین C-ترمینال HSP70 انسانی با ساختار HSP70 طیور که در Swiss Model مدل‌سازی شده‌است نشان می‌دهد که بخش کلاهک آلفا هلیکسی HSP70 طیور در Swiss Model مدل‌سازی نشده و در ساختار نهایی وارد نشده‌است.



شکل ٤- پیش‌بینی درصد ساختارهای ثانویه آلفا هلیکس، صفحات بتا و راندوم کویلدرI-TASSER.

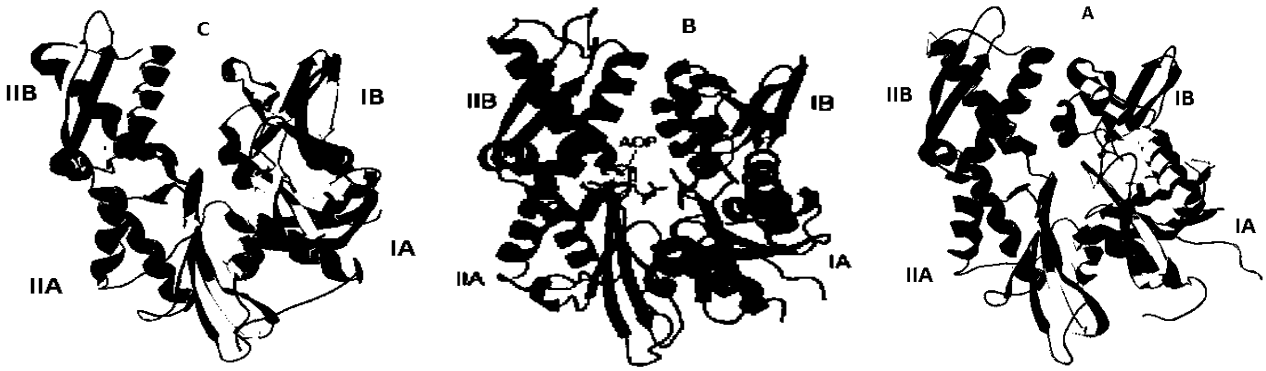


شکل۵- میزان بتا فاکتور (B-factor) نرمالایز شده پیش‌بینی شده برای توالی کامل پروتئین مدل‌سازی شده HSP طیور.

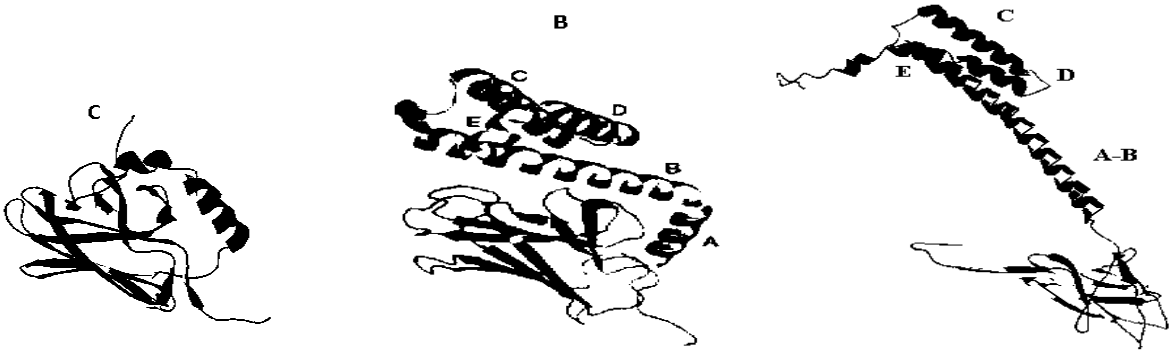
علت این امر این است که Swiss Model از الگوی پروتئین HSC70 (4FL9) گاوی استفاده نموده که این ساختار بخش کلاهک آلفا هلیکسی در آن تعیین ساختار نشده‌است. همچنین این مدل نشان می‌دهد که زیر دمین صفحات بتا (βSBD) که به پپتیدها متصل می‌شود دارای الگویی مشابه HSP70 انسانی بوده و صفحات بتای مشابهی تشکیل داده‌است. از طرفی ساختار دمین C-ترمینال HSP70 طیور که در I-TASSER مدل‌سازی شده دارای بخش کلاهک 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 مشاهده‌است. همچنین، زیر دمین صفحات بتا (βSBD) 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 طیور متفاوت است و نسبت به قرارگیری آن‌ها در HSP انسانی از هم دور شده‌اند. عمده دلیل آن به خاطر لوپی است که این دو

زیردمین را به هم وصل می‌کند. با توجه به سخت بودن مدل-سازی 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.

در مجموع مدل‌سازی HSP70 اولین مرحله در شناسایی ساختار پروتئینی این چاپرون می‌باشد. هر دو پایگاه I-TASSER و Swiss Model مدل ساختاری مشابهی از این چاپرون ارائه می‌کنند که با توجه به شباهت بالای توالی اسید آمینه این چاپرون با چاپرون-های تعیین ساختار شده می‌توان در آنالیزها و طراحی‌های بعدی از این مدل‌ها با ضریب اطمینان بالا استفاده نمود. این پروژه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است نتایج این پژوهش نشان دهنده شباهت ساختاری مناسب بین HSP70 طیور و HSP70 انسان می-باشد. از این رو می‌توان پیش‌بینی نمود که رفتار و عملکرد HSP70 طیور می‌تواند مشابه با HSP70 انسانی باشد و میان کنش‌هایی که HSP70 انسانی با سایر پروتئین‌های سلولی برقرار می‌کند HSP70 طیور نیز می‌تواند با پروتئین‌های سلول‌های پرندگان برقرار نماید. این رفتار در شناسایی فاکتورهای اثر گذار بر فعالیت سلول‌های پرندگان در شرایط تنش بسیار کمک کننده است. در واقع با توجه به دانش پایین در زمینه مطالعه HSP70 طیور از داده‌های مربوط به حوزه HSP70 انسانی می‌توان در بسیاری از فرضیات و عملکردهای HSP70 طیور استفاده نمود و در مرحله اول از این اطلاعات به‌صورت اولین احتمال استفاده نمود. داده‌های این مقاله به عنوان نمونه می‌توانند در زمینه داروهای طراحی شده که در عملکرد با HSP70 انسانی می‌باشند و استفاده از همان داروها در حوزه طیور بسیار کمک کننده باشند. این داده‌ها می‌توانند به فهم چگونگی نحوه میان کنش HSP70 طیور با سایر پروتئین‌ها و HSPهای طیور کمک کرده و زمینه‌ساز روشن شدن نحوه فعالیت آن در درون سلول‌های طیور باشد.



شکل ٦– مقایسه ساختار دمین N–ترمینال HSP70 انسانی (B) با ساختار مدل‌سازی شده HSP70 طیور در I-TASSER (A) و Swiss Model (C).



شکل۷– مقایسه ساختار دمین C–ترمینال HSP70 انسانی (B) با ساختار مدل‌سازی شده HSP70 طیور در I-TASSER (A) و Swiss Model (C).

همانطور که در شکل ٦ مشاهده می‌شود ساختار در هر سه تصویر از شباهت بالایی برخوردار بوده و زیر دمین‌ها در جایگاه‌های مشابهی نسبت به هم قرار دارند. بر این اساس می‌توان آنالیز دقیق‌تر ساختار را انجام داد هرچند که موقعیت تعدادی از رزیجیوها در این سه تصویر کاملا یکسان نیست اما می‌توان درباره نحوه عملکرد این دمین، مکانیسم یکسانی را در نظر گرفت. دمین C-ترمینال یا دمین اتصال به سوبسترا (SBD) از یک زیر دمین صفحات بتا (βSBD) که به پپتیدها متصل می‌شود و یک کلاهک آلفا هلیکسی (αSBD) تشکیل شده‌است (Jiang et al. 2007). کلاهک آلفا هلیکسی مجموعه‌ای متشکل از پنج آلفا هلیکس A، B، C، D و E می‌باشد (Jiang et al. 2007). تصویر ۷ مقایسه ساختار دمین C-ترمینال HSP70 انسانی با ساختار HSP70 طیور که در (C) Swiss Model و (A) I-TASSER مدل‌سازی شده‌است را نشان می‌هد (شکل۷).

با هیدرولیز ATP، دمین اتصال به سوبسترا از حالت بسته به حالت باز تغییر شکل می‌دهد در حالی‌که کلاهک آلفا هلیکسی در دسترس بودن آن را برای جایگاه‌های هیدروفوبی پپتیدهای هدف تنظیم می‌کند (Zhu et al. 1996). همانطورکه اشاره شد دمین C-ترمینال از یک زیر دمین صفحات بتا (βSBD) و یک کلاهک آلفا هلیکسی (αSBD) تشکیل شده‌است (Jiang *et al.*, 2007). مقایسه ساختار دمین C-ترمینال HSP70 انسانی با ساختار HSP70 طیور که در Swiss Model مدل‌سازی شده‌است نشان می‌دهد که بخش کلاهک آلفا هلیکسی HSP70 طیور در Swiss Model مدل‌سازی نشده و در ساختار نهایی وارد نشده‌است. علت این امر این است که Swiss Model از الگوی پروتئین (4FL9) HSC70 گاوی استفاده نموده که این ساختار بخش کلاهک آلفا هلیکسی در آن تعیین ساختار نشده‌است. همچنین این مدل نشان می‌دهد که زیر دمین صفحات بتا (βSBD) که به پپتیدها متصل می‌شود دارای الگویی مشابه HSP70 انسانی بوده و صفحات بتای مشابهی تشکیل داده‌است. از طرفی ساختار دمین C-ترمینال HSP70 طیور که در I-TASSER مدل‌سازی شده دارای بخش کلاهک 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 (βSBD) 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 طیور متفاوت است و نسبت به قرارگیری آن‌ها در HSP انسانی از هم دور شده‌اند. عمده دلیل آن به خاطر لوپی است که این دو زیردمین را به هم وصل می‌کند. با توجه به سخت بودن مدل-سازی 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 به‌عنوان بخشی از آلفا هلیکس شناسایی نموده است.

در مجموع مدل‌سازی HSP70 اولین مرحله در شناسایی ساختار پروتئینی این چاپرون می‌باشد. هر دو پایگاه I-TASSER و Swiss Model مدل ساختاری مشابهی از این چاپرون ارائه می‌کنند که با توجه به شباهت بالای توالی اسید آمینه این چاپرون با چاپرون-های تعیین ساختار شده می‌توان در آنالیزها و طراحی‌های بعدی از این مدل‌ها با ضریب اطمینان بالا استفاده نمود. این پروژه از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است نتایج این پژوهش نشان‌دهنده شباهت ساختاری مناسب بین HSP70 طیور و HSP70 انسان می-باشد. از این رو می‌توان پیش‌بینی نمود که رفتار و عملکرد HSP70 طیور می‌تواند مشابه با HSP70 انسانی باشد و میان کنش‌هایی که HSP70 انسانی با سایر پروتئین‌های سلولی برقرار می‌کند HSP70 طیور نیز می‌تواند با پروتئین‌های سلول‌های پرندگان برقرار نماید. این رفتار در شناسایی فاکتورهای اثر گذار بر فعالیت سلول‌های پرندگان در شرایط تنش بسیار کمک‌کننده است. در واقع با توجه به دانش پایین در زمینه مطالعه HSP70 طیور از داده‌های مربوط به حوزه HSP70 انسانی می‌توان در بسیاری از فرضیات و عملکردهای HSP70 طیور استفاده نمود و در مرحله اول از این اطلاعات به‌صورت اولین احتمال استفاده نمود. داده‌های این مقاله به‌عنوان نمونه می‌توانند در زمینه داروهای طراحی شده که در عملکرد با HSP70 انسانی می‌باشند و استفاده از همان داروها در حوزه طیور بسیار کمک کننده باشند.

این داده‌ها می‌توانند به فهم چگونگی نحوه میان کنش HSP70 طیور با سایر پروتئین‌ها و HSPهای طیور کمک کرده و زمینه ساز روشن شدن نحوه فعالیت آن در درون سلول‌های طیور باشد.

منابع

Al Aqil A, Zulkifli I (2009) Changes in heat shock protein 70 expression and blood characteristics in transported broiler chickens as affected by housing and early age feed restriction. Poultry Science 88:1358-1364.

Altan O, Pabuccuoglu A, Altan A, Konyalioglu S, Bayraktar H (2003) Effect of heat stress on oxidative stress, lipid peroxidation, and some stress parameters in broilers. British Poultry Science 44:545-550.

Basha E, Friedrich KL, Vierling E (2006) The N-terminal arm of small heat shock proteins is important for both chaperone activity and substrate specificity. Journal of Biological Chemistry 281:39943-39952.

Chen B, Zhong D, Monteiro A (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. BMC Genomics 7:156.

Chou C, Forouhar F, Yeh Y, Shr H, Wang C, Hsiao C (2003) Crystal Structure of the C-terminal 10-kDa Subdomain of Hsc70. The Journal of Biological Chemistry 278:30311-30316.

Diamante S, Eliahu N, Rosenthal D, Goloubinoff P (2001) Chemical chaperones regulate molecular chaperones in vitro and in cells under combined salt and heat stresses. The Journal of Biological Chemistry 276:39586-39591.

Deane EE, Woo NYS (2005) Cloning and characterization of the hsp70 multigene family from silver sea bream: Modulated gene expression between warm and cold temperature acclimation. Biochemistry Biophysics Research Communities 330:776-783.

Feder ME (1999) Organismal, ecological, and evolutionary aspects of heat-shock proteins and the stress response: established conclusions and unresolved questions. American Zoology 39:857-864.

Feder ME, Hofmann GE (1999) Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: evolutionary and ecological physiology. Annual Review of Physiology 61:243-82

Gehrmann M, Radons J, Molls M (2008) The therapeutic implications of clinically applied modifiers of heat shock protein 70 (Hsp70) expression by tumor cells. Cell Stress and Chaperones 13:1-10.

Gupta RS, Singh B (1994) Phylogenetic analysis of 70 kD heat shock protein sequences suggests a chimeric origin for the eukaryotic cell nucleus. Current Biology 4:1104-1114.

Guzhova IV, Novoselov SS, Margulis BA (2005) Hsp70 chaperone and the prospects of its application in anticancer therapy. Tsitologiia (Cytology) 47:187-199

Hohfeld J, Cyr MD, Patterson C (2001) From the cradle to the grave: molecular chaperones that may choose between folding and degradation. EMBO reports 2:885-890.

Jiang J, Maes EG, Taylor AB, Wang L, Hinck AP, Lafer EM, Sousa R (2007) Structural basis of J cochaperone binding and regulation of Hsp70. Molecular Cell 28: 422-433.

Joe MK, Park SM, Lee YS, Hwang DS, Hong CB (2000) High temperature stress resistance of Escherichia coli induced by a tobacco class I low molecular weight heat-shock protein. Molecular Cells 10:519-24.

Karlin S, Brocchieri L (2000) Heat shock protein 60 sequence comparisons: duplications, lateral transfer, and mitochondrial evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA 97:11349.

Krebs AR, Bettencourt BR (1999)Evolution of thermotolerance and variation in the heat shock protein, HSP70. American Zoology 39:910-919.

Ming J, Xie J, Xu P, Liu WB, Ge XP, Liu B, He YJ, Cheng YF, Zhou QL, Pan LK (2010) Molecular cloning and expression of two HSP70 genes in the Wuchang bream (MegalobramaamblycephalaYih). Fish Shellfish Immunology 28:407-418.

Chernorizov KA, Švedas VK (2010) Modeling of the full-size 3D structure of human chaperone Hsp70 and study of its interdomaininter actions. Acta Nature 2:66-77.

Moseley PL (1997) Heat shock proteins and heat adaptation of the whole organism. Journal Applied Physiology 83:1413-1417.

Nollen EA, Kabakov AE, Brunsting JF, Kanon B, Höhfeld J, Kampinga HH (2001) Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1.Journal of Biological Chemistry 276: 4677-4682.

Renner T, Waters ER (2007) Comparative genomic analysis of the Hsp70s from five diverse photosynthetic eukaryotes. Cell Stress and Chaperones 12:172-185.

Robert J (2003) Evolution of heat shock protein and immunity. Developmental and Comparative Immunology 27: 449-464.

Schlesinger MJ (1986) Heat shock proteins: The search for functions. Journal of Cell Biology 103: 321-325.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003)SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. Nucleic Acids Research 31:3381-3385.

Vogel M, Bukau B, Mayer MP (2006) Allosteric regulation of Hsp70 chaperones by a proline switch. Molecular Cell 21:359-367.

Serensen JG, Kristensen TN, Loeschcke V (2003) The evolutionary and ecological role of heat shock proteins. Ecology Letters 6:1025-1037.

Shaner L, Morano AK (2007) All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity. Cell Stress and Chaperones 12:1-8.

Sikora A, Grzesiuk E (2007) Heat shock response in gastrointestinal trace. Journal of Physiology and Pharmacology 58:43-62.

Smith MO (1993) Parts yield of broilers reared under cycling high temperatures. Poultry Science 72:1146-1150.

Sun W, Montagu MV, Verbruggen N (2002) Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1577:1-9.
Tomanek L (2002) The Heat-Shock Response: Its Variation, Regulation and Ecological Importance in Intertidal Gastropods (genus Tegula). Integrative and Comparative Biology 42:797-807
Vierling E (1991) The Roles of Heat Shock Proteins in Plants. Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42:579-620.
Zhang Y (2008) I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9:40-48
Zhu X, Zhao X, Burkholder WF, Gragerov A, Ogata CM, Gottesman ME, Hendrickson WA (1996) Structural analysis of substrate binding by the molecular chaperone DnaK. Science 272:1606-1614.

Modern Genetics Journal

Vol 11, Number 2, Summer 2016, Quaternary

Software modeling of heat-shock protein 70 (HSP70) of poultry

Rezvannejad E[1*], Mortazavi M[1], Riahi Medvar A[1]

1. Assistant Professors, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, Iran
* Corresponding Author, Email: Rezvannejad2002@yahoo.com

A B S T R A C T

Heat shock proteins (HSPs) are the most of intracellular proteins. Their synthesis is rapidly up-regulated because of various 'stressors' including temperature, glucose deprivation, and infection. These proteins play an important role in survival cell and intracellular homeostasis under stress conditions. Since the crystallographic structure of the protein extensively damaged from heat stress it is not reported in poultry, modeling the structure of HSP70 of poultry can identify the mechanism of action of this protein against environmental stresses and help to reduce costs related to environmental stresses. In this study three-dimensional structure of protein HSP70 in poultry, species *Gallus gallus* was modeling to identify structural domains and specific position in this structure. The three-dimensional model was prepared by homology modeling using I-TASSER and Swiss Model with similar and suitable pattern from database PBD (*Homo sapiens* HSP70 ,*Bovine* HSC70). In order to evaluate and analysis of structure model SPDBV software was used. Quality evaluation of the model was done based on the structural parameters of C-score, TM-score and RMSD that Showed the quality of the proposed model is suitable and stable for HSP70 of poultry. Modeling HSP70 in poultry is the first stage in identifying of protein's structure of this chaperon. Due to the high similarity of the amino acid sequence of this Chaperon with determined structural Chaperons, this model can high reliability be used in later analysis and design.

Key Words

Chaperon, Heat stress, HSP70, Modeling, Poultry