جداسازی و تعیین برخی خصوصیات ایزو فرم غالب مولکول GP96 از رده سلولی فیبرو سارکومای موش (WEHI-164)

عقیل تبارملاحسن[1*]، زهیر محمدحسن[2]، علی مصطفایی[3]، سعید حصارکی[4]، علی طراوتی[5]

چکیده

GP96 جزئی از پروتئین‌های شوک حرارتی است که نقش فراوانی در ایمنی سلولی علیه تومور دارد. آن در رده توموری، نشانه تسلط بیشتر ایمنی بدن به آن تومور است.جهت خالص سازی ایزوفرم غالب مولکول GP96 از رده توموری فیبروسارکومای موش، سلول‌های حاصل از کشت رده سلولی WEHI-164 لیز شده و مایع رویی حاصل از عصاره سلولی با سولفات آمونیوم رسوب داده شد. سپس با استفاده از کروماتوگرافی میل جذبی و کروماتوگرافی تعویض یون عمل خالص سازی انجام شد. وزن مولکولی پروتئین هدف با الکتروفورز (SDS-PAGE) و ماهیت آن با روش وسترن بلات بررسی گردید. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که مولکول تخلیص شده دارای وزن مولکولی معادل ۶۸-۶۶ کیلو دالتون می‌باشد که دال بر حضور یکی دیگر از ایزوفرم‌های مختلف این پروتئین است که ماهیت آن با وسترن بلات تایید گردید.

واژگان کلیدی: *کروماتوگرافی میل ترکیبی، تعویض یونی، تخلیص*

تاریخ دریافت: ۸۹/۲/۵ تاریخ پذیرش: ۸۹/۷/۱۵

مقدمه

گلیکوپروتئین ۹۶ کیلودالتونی یا Glycoprotein 96 که به اختصار GP96 نامیده می‌شود، مولکولی ازخانواده پروتئین‌های شوک حرارتی است که از نظر وزن مولکولی بسیار هتروژن بوده و علاوه بر سیتوپلاسم و شبکه اندوپلاسمی، درغشاء سلول‌ها هم وجود دارد. این پروتئین در سلول‌های سرطانی بیشتر بروز می‌یابد(۳). این مولکول می‌تواند علاوه بر پپتیدهای اندوژن خودی به پپتیدهای اندوژن بیگانه مانند آنتی‌ژن‌های توموری نیز وصل و سبب اتصال آنها به MHC کلاس یک گردد (۴،۵). از آنجایی که GP96 به پپتیدهای طبیعی و توموری متصل می‌شود، در حین تخلیص آن می‌توان این پپتیدها را نیز به دست آورد. به علاوه از آنجا که این پروتئین از طریق پردازش متقاطع (Cross presentation) عرضه می‌شود می‌تواند با اتصال به MHC کلاس یک، پاسخ ایمنی لنفوسیت‌های T سیتوتوکسیک که یک پاسخ ایده‌ال در برابر تومور می‌باشد را القا کند (۶،۷،۸). این پروتئین اولین بار توسط Srivastava و همکارانش تخلیص شد. تاکنون ایزوفرم‌های مختلفی از این پروتئین شناخته شده است. از تفاوت‌های عمده این ایزوفرم‌ها تفاوت در وزن مولکولی و الگوی گلیکوزیلاسیون آنها می‌باشد. این پروتئین را تا بحال از بافت‌های مختلفی مانند ریه و کبد انسان و سایر بافت‌های مدل موشی تخلیص نموده اند (۹،۱۰،۱۱،۱۲). در این مطالعه هدف بر آن است که ایزوفرم غالب GP96 از رده توموری فیبروسارکومای موش جدا و برخی خصوصیات آن تعیین گردد.

مواد و روش کار

کشت سلول و تهیه عصاره سلولی

با توجه به میزان مورد نیاز GP96 و مشکلات خالص سازی آن، لازم بود تا حجم زیادی از این رده سلولی کشت داده شود. ابتدا رده سلولی فیبروسارکوما (WEHI-164) که یک رده سلولی توموری فیبروبلاستی موش می‌باشد، درمحیط کشت RPMI 1640، حاوی سرم جنین گوساله ده درصد (GIBCo) و آنتی بیوتیک‌های پنی سیلین و استرپتومایسین در حجم‌های بالا و طی چندین مرحله کشت داده شد و سلول‌های حاصل از

[1*]- عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد بابل، دانشجوی دکتری ایمونولوژی دانشگاه تربیت مدرس
Doctoragheel@yahoo.com
۲- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده پزشکی، گروه ایمونولوژی
۳- دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده پزشکی ، مرکز تحقیقات بیولوژی سلوی و مولکولی
٤- گروه آسیب‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران
۵- عضو هیئت علمی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد جویبار، جویبار، ایران

هر مرحله به منظور حذف پروتئین‌های محیط کشت شسته شده و به نحو مناسبی ذخیره گردیدند. برای لیز سلول‌ها از روش سونیکه کردن استفاده شد. عصاره حاصل از لیز سلولی سانتریفوژ شد و مایع رویی آن جمع آوری گردید. به منظور جلوگیری از تخریب احتمالی پروتئین‌های محلول توسط پروتئازها، به آن آنتی پروتئاز فنیل متیل سولفونیل فلوراید یا PMSF خریداری شده از شرکت سیگما در غلظت نهایی یک میلی مولار اضافه گردید.

رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم

رسوب‌دهی پروتئین‌های عصاره سلول با استفاده از سولفات آمونیوم طی دو مرحله انجام شد. در مرحله اول به عصاره سلولی سولفات آمونیوم تا غلظت نهایی ۵۰٪ به آرامی و در حال هم زدن اضافه شد. مخلوط یک ساعت در دمای ٤ درجه سانتی گراد قرار گرفت. سپس به مدت ۳۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰×g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ شد. رسوب حاصله کنار گذاشته شده ومحلول رویی با افزودن سولفات آمونیوم و رساندن آن به میزان ۷۰٪ در شرایطی مانند شرایط فوق رسوب داده شد. در مرحله بعد، محلول رویی کنار گذاشته شد و رسوب به دست آمده در بافر تریس ۲۰ میلی مولار با pH برابر با ۷/٤، حاوی ۵۰۰ میلی مولار کلرید سدیم، ۲ میلی مولار کلرید کلسیم و ۲ میلی مولار کلرید منیزیم حل گردید و سپس یک شب در مقابل بافر مربوطه دیالیز شد. محلول بدست آمده برای مرحله بعد نگهداری شد.

کروماتوگرافی میل جذبی

برای تهیه ستون میل جذبی دارای لیگاند کانکاناوالین آ یا Concanavalin A خریداری شده از شرکت سیگما، ابتدا مقدار مورد نیاز از رزین سفارز 4B فعال شده سه بار با اسید کلریدریک یک میلی مولار شسته شد تا ذرات رزین کاملا متورم شوند. پس از آماده‌سازی رزین، ۵ میلی گرم کانکاناوالین آ خالص به ازای هر میلی لیتر ژل متورم در بافر کربنات ۰/۱ مولار با pH=۸/۵ حاوی کلرید سدیم ۰/۵ مولار اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ ساعت به آرامی در دمای اتاق تکان داده شد. سپس مناطق فعال باقیمانده روی رزین با بافر گلیسین ۰/۲ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم مسدود شد. رزین بدست آمده ۵ بار به صورت متناوب با دو بافر استات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH=٤ و بافر کربنات ۰/۱ مولار حاوی ۰/۵ مولار کلرید سدیم با pH=۸/۵ شسته شد. پس از آماده‌سازی و شستشوی ستون شیشه ای متناسب، رزین حاصله وارد آن گردید و با حجم کافی از بافر فسفات نمکی شسته شد تا به تعادل بافری رسید. پس از ورود نمونه به ستون و شستشوی ستون با مقدار کافی از بافر، برای جداسازی پروتئین‌های متصل به آن، از قند آلفا متیل مانوپیرانوزید (α-methyl mannopyranoside) ده درصد خریداری شده از شرکت سیگما در بافر استفاده شد.

کروماتوگرافی تعویض یونی

در مرحله بعد کروماتوگرافی تعویض یونی انجام شد. به این صورت که مقدار کافی از رزین دی‌اتیل آمینواتیل سفارز یا (DEAE) خریداری شده از شرکت سیگما در بافر سیترات ۰/۰۵ مولار با pH =۵/۵ شسته شد و در یک ستون شیشه‌ای به قطر ۲ و ارتفاع ۱۳ سانتی‌متر ریخته شد. بعد از به تعادل رسیدن ستون با بافر سیترات، نمونه پروتئینی حاصل از دیالیز در بافر سیترات وارد آن گردید. پس از ورود نمونه به ستون، بافر سیترات با جریان ٤۰ میلی‌لیتر در ساعت برقرار گردید. نمونه‌ها در حجم‌های ۲ میلی‌لیتری جمع‌آوری و جذب نوری آنها در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. پس از رسیدن جذب خروجی ستون به کمتر از ۰/۰۵، برای جداسازی پروتئین‌های چسبیده به ستون، از شیب خطی ۱۵۰–۳۰ میلی‌مولار کلرید سدیم در بافر استفاده شد.

اندازه‌گیری غلظت پروتئین

دراین مطالعه غلظت پروتئین با دو روش زیر محاسبه شد.

۱ـ روش برادفورد (۱۳)

در این روش برای اندازگیری غلظت پروتئین از معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی آبی G-250، ۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵٪ و ۱۰۰ میلی‌لیتر اسید فسفوریک ۸۵ در صد در حجم نهایی یک

لیتر)، و آلبومین گاوی به عنوان استاندارد در محدوده ۰/۱ تا ۱ میلی گرم در میلی لیتر استفاده شد .

۲- روش UV (۱٤)

برای این کار جذب نمونـه‌هـای در دو طـول مـوج ۲٦۰ و ۲۸۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و با استفاده از رابطه زیر غلظت پـروتئین در آنها محاسبه گردید. (۰/۷٤× جذب نوری در ۲٦۰ نـانومتر) – (۱/٤٥ × جـذب نـوری در ۲۸۰ نـانومتر) = (mg/ml) غلظـت پروتئین.

الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضـور سـدیم دودسـیل سولفات (SDS-PAGE):

الکتروفورز بر اساس روش لاملی (۱۵) در ژل پلی اکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات درژل جداکننده ۱۲٪ و ژل متراکم کننده ٤ درصد تحت شرایط احیایی انجام شد. چهار حجم نمونه به یک حجم بافر نمونه 5x افزوده شد سپس پنج دقیقه در آب جوش قرار گرفت. ۱۰ میکرولیتر از هر نمونه به چاهک‌ها اضافه و در ولتاژ ثابت ۱۵۰ ولت الکتروفورز گردید. پس از اتمام الکتروفورز، ژل به دوقسمت تقسیم شد. یک قسمت به روش نقره که حساسیت بالایی دارد، رنگ آمیزی گردید و وزن مولکولی پروتئین مذکور با توجه به منحنی استاندارد حاصل از پروتئین‌های با وزن مولکولی معلوم، تخمین زده شد. قسمت دیگر برای انجام عمل وسترن بلات مورد استفاده قرار گرفت.

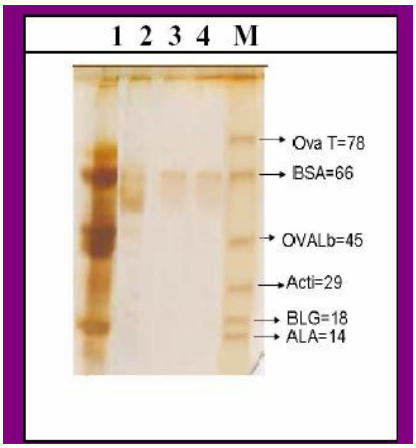
وسترن بلات

باندهای پروتئینی تفکیک شده با روش الکتروفورز به روش تاوبین (۱٦) به غشای پلی وینیلیدین دی فلوراید یا (PVDF) خریداری شده از شرکت سیگما انتقال داده شد. غشا به مدت ۱۵ دقیقه در بافر فسفات نمکی حاوی توین ۰/۵ درصد مسدود و سپس ۳ بار در بافر فسفات نمکی حاوی توین ۰/۰۵ درصد شسته شد. غشاء دو ساعت در آنتی بادی اولیه (آنتی بادی خرگوشی ضدGP96 خریداری شده از شرکت Abcam) و یک ساعت در آنتی بادی ثانویه (آنتی بادی ضد IgG خرگوشی کونژوگه با پراکسیداز خریداری شده از شرکت Abcam) قرار گرفت و پس از شستشوی کافی در هر مرحله، برای ظهور پروتئین هدف در محلول سوبسترای آنزیم (پراکسید هیدروژن و دی آمینو بنزیدین) قرار گرفت. غشا پس از ظهور پروتئین هدف در آب مقطر شسته شد و به صورت خشک شده در محل تاریک نگهداری شد.

نتایج

بعد از تهیه عصاره سلولی و رسوب دهی پروتئین‌ها بوسیله سولفات آمونیوم ، نمونه ای از محصول حاصل از مرحله دوم رسوب دهی الکتروفورز گردید و ژل مربوطه به دو قسمت مشابه تقسیم گردید. یکی از دو بخش ژل به روش نقره رنگ آمیزی گردید و بخش دیگر به روش وسترن بلات با آنتی بادی اختصاصی ضد GP96 مورد آزمایش قرار گرفت. نتایج الکتروفورز نشان داد که محصوی مرحله دوم رسوب دهی حاوی چندین نوع پروتئین پرمقدار و کم مقدار است که تعدادی از آنها در محدوده وزنی پروتیئن هدف (GP96) قرار دارند (ستون ۱ در نگاره ۱). در میان این پروتئین ها یک پروتئین در محدوده وزنی ٦٦–٦۸ کیولودالتون با آنتی بادی ضد GP96 در وسترن بلات واکنش محسوسی نشان داد. پس از عبور نمونه از ستون کانکاوالین آ – سفارز، دو فراکسیون شامل بخش عبور نموده از ستون و بخش چسبیده به ستون که برای جداسازی آن از قند آلفا متیل مانوپیرانوزید در بافر استفاده گردید، حاصل گردید (ستون‌های ۲ و ۳ در نگاره ۱). این نتایج نشان داد که کروماتوگرافی میل جذبی باعث خروج بخش عمده ای از ناخالصی های پروتئینی موجود در عصاره سلولی شده است. نتایج حاصل از وسترن بلات بر روی بخش های از این مرحله نشان داد که بخش عمده واکنش پذیر با آنتی بادی ضد GP96 در فراکسیون چسبیده به ستون دیده می شود (ستون ۱ در نگاره ۲) که برای جداسازی آن افزایش قند آلفا متیل مانوپیرانوزید در بافر لازم است. با این حال آزمون وسترن بلات نشان داد که بخش خارج شده از ستون میل جذبی حاوی باند پروتئینی واکنش پذیر با آنتی بادی است که ظاهراً توسط ستون

جذب نشده است. در مرحله انتهایی تخلیص که شامل کروماتوگرافی تعویض یون در ستون دی اتیل آمینو اتیل سفارز بود، فراکسیونی از GP96 با خلوص قابل توجه بدست آمد (ستون ٤ در نگاره ١). تخمین وزن مولکولی پروتئین حاصله با توجه منحنی استاندارد مارکرهای پروتئینی، نشان داد که مولکول مورد بحث وزنی در محدوده ٦٨-٦٦ کیلودالتون دارد.



نگاره ١ـ الکتروفورز بخش‌های پروتئینی حاوی GP96 در ژل جدا کننده ١٢٪ . رنگ‌آمیزی به روش نقره

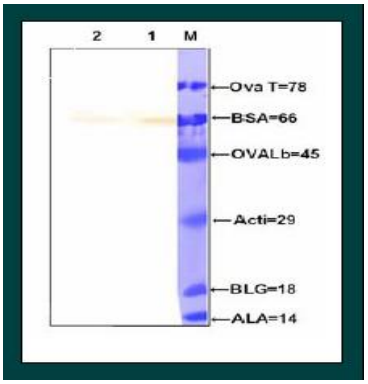
ستون١: لایزت سلولی

ستون٢: محصول خروجی از ستون کروماتوگرافی میل جذبی قبل از قند آلفا متیل مانوپیرانوزید

ستون٣: محصول خروجی از ستون کروماتوگرافی میل جذبی بعد از قند آلفا متیل مانوپیرانوزید

ستون ٤: محصول خروجی از ستون کروماتوگرافی تعویض یونی

ستون M: مربوط به مارکر های با اوزان مولکولی متفاوت می‌باشد.



نگاره ٢ـ واکنش نمونـه حاصل از کروماتوگرافی میـل ترکیبی (ستون ١) کروماتوگرافی تعویض یونی (ستون ٢) با آنتی‌بادی ضد GP96 به روش وسترن بلات، ستون M: مارکرهای وزنی مختلف می‌باشند که با کوماسی آبی رنگ شده‌اند.

بحث

Fairburn در سال ٢٠٠٦ نشان داد که خانواده GP96 از بیشترین پروتئین‌های موجود درشبکه اندوپلاسمیک می‌باشد. GP96 دارای ایزوفرم‌های متعددی است و محققین تاکنون توانسته‌اند، ایزوفرم‌های مختلفی با اوزان مولکولی ٧٥ الی ٩٦ کیلو دالتون از این مولکول را از سلول‌ها و بافت‌ها متفاوت شناسایی ویا تخلیص نمایند. این ایزوفرم‌ها معمولاً از نظر وزن مولکولی، الگوی گلیکوزیلاسیون و یا نقطه ایزوالکتریک یا PI با یکدیگر تفاوت دارند (١٧). مطالعات Suriano و همکارانش در سال ٢٠٠٥ نشان داد که این ایزوفرم‌ها می‌توانند از یک رده سلولی به رده دیگرمتفاوت باشند بطوری که در سلول طبیعی و سلول سرطانی می‌توانند با هم تفاوت داشته باشند (١٨). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ایزوفورم غالب GP96 در رده سلولی فیبروسارکومای موش پروتئینی در محدوده وزنی ٦٨-٦٦ کیلودالتون است که بخش عمده آن بدلیل محتوای قندی بالا قادر است به ستون میل جذبی کانکاوالین آ متصل گردد و در رقابت با قند آلفا متیل مانوپیرانوزید از ستون جدا گردد. این ایزوفورم که ماهیت آن با آنتی بادی اختصاصی به روش وسترن بلات تایید گردید، طی مراحل ترسیب با سولفات آمونیوم، کروماتوگرافی میل جذبی و کروماتوگرافی تعویض آنیون با درجه خلوص بالایی بدست آمد. به نظر می رسد عدم تطابق وزن مولکولی پروتئین بدست آمده در این مطالعه با نتایج دیگران ناشی از هتروژن بودن مولکول GP96 در انواع سلول‌ها است. ابتدا تصور می‌شدکه هتروژن بودن GP96 احتمالاً ناشی ازتخریب این مولکول و یا آلودگی آن با سایرمولکول‌ها مانند فیلامنت‌های اکتین، کالرتیکولین وغیره باشد، ولی بعدها مشخص گردید که این ناهمگونی ناشی از دلایل دیگری از جمله میزان گلیکوزیلاسیون مولکول می‌باشد (١٧). مولکول GP96 دارای پنج جایگاه برای اتصال به شاخه‌های قندی است که می‌تواند سبب تولید الگوهای متفاوت گلیکوزیلاسیون و

تولید گلیکوفورم‌های متفاوت آن شود. مطالعات Cala و همکارانش نشان داده که به احتمال قویتر الگوهای متفاوت گلیکوزیلاسیون در این مولکول می‌توانند بر جنبه‌های متفاوت این مولکول اثرگذار باشد (۱۸). بعلاوه، یافته‌های Kang و همکارانش نشان داد که الگوهای متفاوت گلیکوزیلاسیون به عواملی مانند نوع سلول و نوع استرسی که بر سلول تحمیل می‌شود، بستگی دارد و اکثریت این مولکول‌ها دارای یک شاخه الیگوساکاریدی هستند که تحت شرایط استرس تغییر می‌کند لذا از آنجایی که عواملی که در تومورزایی نقش دارند، متفاوت هستند، اثر آنها بر الگوهای گلیکوزیلاسیون نیز مختلف خواهد بود. الگوهای متفاوت گلیکوزیلاسیون شاید بتواند یکی از دلایل وجود این نوع ایزوفرم از مولکول GP96 در رده سلولی مورد استفاده در این مطالعه و حتی می‌تواند توجیه کننده بخشی از GP96 باشد که در این مطاله به ستون کانکاوالین آ - سفارز متصل نگردید و قبل از افزودن قند آلفا متیل مانوپیرانوزید از آن خارج گردید. به هر حال، این یافته‌ها تا حد زیادی با نتایج تحقیق Wearsch مطابقت دارد (۱۹). با توجه به نگاره ۱ و۲ در این تحقیق مشخص شده که ایزوفرم غالب این گلیکوپروتئین در رده سلولی WEHI-164، ایزوفرم ٦٨-٦٦ کیلودالتونی می‌باشد که با توجه به روش استفاده شده و خلوص بالای مولکول تخلیص شده، می‌توان در تحقیقات بعدی از این روش و از این مولکول جهت ایمونوتراپی تومور فیبروسارکوما در موش‌های Balb/c استفاده نمود.

تشکر و سپاسگزاری

بدین وسیله از همه همکاران گرامی مرکز تحقیقات بیولوژی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه خصوصا جناب آقای منصوری، سرکار خانم‌ها: ادهم، ونائی، قنبری، کیانی و سایر همکاران دیگر که در کلیه مراحل مختلف این تحقیق با این حقیر همکاری داشته‌اند، تشکر و قدردانی می‌شود.

فهرست منابع

1- Robert J. Binder, John B. Kelly, Ralph E, Vatner and Pramod K. Srivastava.(2007): Specific Immunogenicity of Heat Shock Protein gp96 Derives from Chaperoned Antigenic Peptides and Not from Contaminating Proteins. The Journal of Immunology. 179: 7254-7261.

2- Zhang tian, Wang hua, Zhou xin-Yang, Shi hai-Yan , Lin Lin , Gu Jun-yi.(2006): Effects of heat shock protein gp96 on function of macrophages from mouse . Article in Chinese. 25(2):153-8.

3- Ménoret A and Chandawarkar R.(1998): Heat-shock protein-based anticancer immunotherapy: an idea whose time has come. Semin Oncol. 25(6):654-6.

4 -Peibin y, Shude y and Changzhi H.(2005): Heat shock protein gp96 and cancer immunotherapy , Chin Med Sci J.17(4):251-6.

5 - M . Ni and A . Lee.(2007):ER chaperones in mammalian development and human diseases . FEBS Lett. 581(19):3641-51 .

6- Harpreet Singh-Jasuja, René E.M. Toes , Pieter Spee , and et al.(2000): Cross-Presentation of Glycoprotein 96–Associated Antigens on Major Histocompatibility Complex Class I Molecules Requires Receptor-Mediated Endocytosis. J Exp Med. 191(11): 1965–1974.

7- Srivastava Pk.(2006): Therapeutic cancer vaccines. Curr Opin Immunol .18(2):201-5.

8- Ulrich Zügel, Anne-Marit Sponaas, Jutta Neckermann, Bernd Schoel, and Stefan H. E.(2001): Kaufmann. Gp 96 - Peptide Vaccination of Mice against Intracellular Bacteria, Infection and immunity .96(6); 4164 – 4167.

9- B. Fairburn, M. Muthana, K. Hopkinson, L.K. Slack, S. Mirza, A.S. Georgiou and et al.(2006): Analysis of purified gp 96 preparations from rat and mouse livers using 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry . Biochimie .88 (9); 1165-1174.

10- Antoine Ménoret and Gillian Bell.(2000): Purification of multiple heat shock proteins from a single tumor sample. Journal of Immunological Methods. 237 (1-2); 119-130.

11– Song Dong Meng , Jian Song , Zihe Roa , Po Tien and George F. Gao.(2002):Three-step purification of gp96 from human liver tumor tissues suitable for isolation of gp96 -bound peptides .Journal of Immunological Methods. 264: 29-35.

12-James R. Zabrecky and Wayne Sawlivich.(2004): Purification of the heat shock protein gp96 from natural sources. Methods. 32(1): 3-6.

13 -Bradford MM. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem.72: 248-254.

14- Roe S. (2001): Protein Purification Techniques.Texas: Oxford University Press: Weimer.28 – 32.

15- Laemmli UK. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature.227: 680-685.

16 - Towbin H, Staehelin T and Gordon J. (1970): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U.S.A.76:4350-4354.

17- Suriano R, Ghosh SK, Ashok BT, Mittelman A, Chen Y, Banerjee A and et al.(2005):Differences in glycosilation patternsof heat shock protein,gp96:implication for prostat cancer prevention,cancer res.(65) 6466-6477.

18 - S.E cala ,L.R.jones.(1994): GRP94 resides within cardiac sarcoplamic reticulum vesicle and is phosphorylated by casein kinae II. j. Biol. chem. 269(8):5926-5931.

19 - Pamela A. Wearsch and Christopher V. Nicchitta. (1996):purification and partial charecterization of GRP94 an ER resident chaperone.protein expr.purif.7(1) :114-121.