

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17151

HSP90 抑制剂根赤壳菌素对斑马鱼胚胎发育的影响

罗军涛, 李艳, 陶筱帆, 刘玮, 倪国军, 张俊芳, 韩兵社

省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 为研究热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)在斑马鱼(*Danio rerio*)胚胎发育中的作用, 本实验采用 2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的 HSP90 抑制剂根赤壳菌素(radicol)对斑马鱼发育期胚胎进行处理, 监测斑马鱼胚胎不同发育时期两个 HSP90 功能抑制标志基因 *BAG3* (BCL2-associated athanogene3)和 *HSPB1*(heat shock protein beta-1)的 mRNA 的表达水平, 并观察不同发育时期的胚胎发育状况。结果如下: (1)实时荧光定量 PCR 结果显示, *BAG3* 和 *HSPB1* mRNA 水平在根赤壳菌素处理胚胎 12 hpf (hours post-fertilization, hpf) 或 24 hpf 后显著增高, Western blot 检测到 5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理胚胎 24 hpf 后 HSP70 表达上调, 证明该实验条件下 HSP90 功能受到抑制; (2)根赤壳菌素处理后斑马鱼胚胎发育变缓, 胚胎成活率统计显示: 2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理 24 hpf 胚胎成活率分别是 95%、77%、35%, 成活率随根赤壳菌素浓度的增高而降低; (3)5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理 72 hpf 可见部分个体色素沉积减少、心包膜增大、肌肉萎缩等发育畸形。研究结果证明 HSP90 在斑马鱼胚胎发育过程中发挥重要的作用, 根赤壳菌素在 5 $\mu\text{mol/L}$ 时已达到较佳抑制效果且成活率较高, 而且胚胎发育出现了各种形态学变化, 为后期研究 HSP90 调节斑马鱼胚胎发育奠定了基础。

关键词: 斑马鱼; 热休克蛋白 90; 根赤壳菌素; 色素沉积; 发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-0988-07

热休克蛋白 90(heat shock protein 90, HSP90)属于热休克蛋白家族中表达量比较高的一员, 它作为分子伴侣的功能得到广泛的认可。HSP90 存在两种亚型 HSP90 α (诱导型)和 HSP90 β (构成型), 在外界环境压力作用下, HSP90 α 具有明显的组织特异性, 在不同组织中特异表达。这两种亚型与不同的分子伴侣结合, 维护靶蛋白的稳定, 对多细胞生物的功能调节和生长发育起到重要的作用^[1-3]。Gething 等^[4]研究证明 HSP90 在促进蛋白正确折叠、重折叠、防止变性蛋白的聚集、降解错误折叠或凝集的蛋白、蛋白的运输和组装中起主要作用。ATP、共分子伴侣、靶蛋白和小分子等的结合可以影响 HSP90 的构象发生不同的变化^[5-7]。根赤壳菌素(radicol)是一种高效特异的小分子 HSP90 抑制剂^[8-10], 它通过与底物竞争性结合的

方式与 HSP90 α N 端结构域的 ATP 结合位点结合, 导致 HSP90 的构象改变, 从而抑制了 HSP90 与靶蛋白的特异性结合^[11-12]。根赤壳菌素作为公认的 HSP90 的功能抑制剂被广泛应用到生物科研中, 曾作为抗肿瘤药物应用于临床实验^[11], 为抑制斑马鱼胚胎中 HSP90 的功能研究提供了行之有效的方法。

经典的生物进化理论认为, 自然的基因突变作为进化的基础, 在自然环境下选择出适合生存的基因型, 淘汰不利的基因变异。但在 1942 年, Waddington 等^[13-14]提出了“canalization”学说, 他们认为自然界同一物种中存在不同的变异基因型, 在环境压力下适应环境生存的基因型浮现出来, 不能适应环境的基因型被隐藏。Rohner 等^[15]用根赤壳菌素处理墨西哥黑暗环境洞穴鱼(*Astyanax*

收稿日期: 2017-01-12; 修订日期: 2017-04-12.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31372516); 上海市人才发展资金项目(201457); 上海市教育委员会“东方学者”计划支持项目.

作者简介: 罗军涛(1989-), 男, 硕士, 专业方向为发育生物学. E-mail: 1012688697@qq.com

通信作者: 韩兵社, 副研究员. E-mail: bs-han@shou.edu.cn

mexicanus)(无眼)和地表水域洞穴鱼(有眼)的后代,检测到两个 HSP90 功能抑制的标志基因 *BAG3* (BCL2-associated athanogene3)和 *HSPB1*(heat shock protein beta-1)的 mRNA 水平上调,证明 HSP90 功能被抑制,性成熟后会出现眼眶从大到无的一系列新表型变化。这个实验揭示了洞穴鱼进化历程中 HSP90 在洞穴鱼眼睛发育过程中起到了重要的作用,提出了 HSP90 具有储存基因变异的缓冲作用以应对环境压力,而且可以选择出适合环境生存基因型的功能假说。但是 HSP90 的这种储存基因变异的缓冲机制还不是很清楚,仅了解到 HSP90 作为分子伴侣在帮助蛋白的折叠和促进蛋白(激酶、转录因子和泛素连接酶)的成熟方面发挥作用。HSP90 与这些靶蛋白以复合体的形式共同维持生物的生存^[16-20]。为进一步探讨 HSP90 是如何运作这一缓冲机制,本研究用根赤壳菌素抑制 HSP90 功能,解除 HSP90 对环境压力的缓冲作用,还原生物的多样性表型,为研究 HSP90 在生物进化中的作用提供了一个新的切入点。

斑马鱼(*Danio rerio*)由于繁殖周期短、产卵量高、基因组注释信息完备、与人类基因相似度高达 87%,因而成为一种广泛应用于遗传学和分子生物学的模式生物^[21-23]。斑马鱼作为亚热带和热带鱼对环境适应范围较广,品系较多易于区分,是研究进化生物学的良好材料。为研究 HSP90 的功能对斑马鱼胚胎发育的影响,本实验采用根赤壳菌素在斑马鱼胚胎期抑制 HSP90 功能的方法,监测了在不同浓度(2 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$)、不同发育期(12 hpf、24 hpf)胚胎的发育状态、成活率及形态学变化,为以后研究 HSP90 在斑马鱼胚胎中的功能提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 斑马鱼繁育 斑马鱼来源于实验室斑马鱼房饲养: AB 品系; 饲养环境为恒温循环水系统; 水环境控制: pH 6.8~7.8; 电导率: 450~550 μs ; 温度: 27~28 $^{\circ}\text{C}$; 养殖密度: 4 尾/L; 饲喂饵料为丰年虫。

1.1.2 胚胎抑制剂处理及观察 HSP90 抑制剂根赤壳菌素溶于二甲基亚砜(DMSO), 储存浓度为

0.25 mol/L, 选择发育状态良好的斑马鱼(5 对)产卵后混合, 分别用终浓度为 2、5、10 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素、DMSO (对照组)处理胚胎, 遮光处理 24 h, 用倒置显微镜观察其形态并拍照。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 主要试剂 根赤壳菌素(radicol)、DMSO 和 β -actin 鼠属单克隆抗体抗购于西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; Trizol 购于英潍捷基(上海)贸易有限公司; RT-qPCR 反转录试剂盒购于宝生物工程(大连)有限公司; SYBR Green 购于罗氏公司; 兔属 HSP70、HSP90 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗购于赛信通(上海)生物试剂有限公司; Western blot 裂解液、5 \times SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液和 TEMED 购于上海碧云天生物技术有限公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒和溴化乙锭购于上海生工生物工程技术服务有限公司; ECL 化学发光液购于伯乐生命医学产品(上海)有限公司; 试剂均为国产分析纯。

1.2.2 主要仪器 LightCycler 480 II (罗氏); 倒置荧光显微镜(蔡司); NanoDrop2000[赛默飞世尔科技(中国)有限公司]; 电泳仪[伯乐生命医学产品(上海)有限公司]; 斑马鱼循环系统(上海海圣生物实验设备有限公司); 电动组织研磨器[天根生化科技(北京)有限公司]。

1.3 实时荧光定量 PCR 检测抑制效果

1.3.1 RNA 提取 收集胚胎($n=30$)放入 1.5 mL EP 管, 加入 200 μL Trizol, 用电动研磨器研磨 2 min 后, 补充 Trizol 至 1 mL。室温静置 5 min, 加 200 μL 氯仿, 摇匀静止 3 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 15 min, 吸取上清。加入等体积异丙醇, 室温放置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 12000 g 离心 10 min。弃上清, 加入 1 mL 75% 乙醇摇匀, 4 $^{\circ}\text{C}$ 7500 g 离心 5 min。弃上清。风干 10 min, 加 30 μL DEPC 水溶解, 55 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min, -80 $^{\circ}\text{C}$ 储存。总 RNA 用 RT-qPCR 专用反转录试剂盒合成 cDNA。

1.3.2 引物合成与检测 为避免潜在的 DNA 污染, 引物设计时跨至少一个内含子, 引物由上海生工生物工程有限公司合成(表 1)。以 β -actin 为内参, 以 cDNA 为模板, 检测对照组(DMSO)与实验组(radicol)的两个标志基因 *BAG3* 和 *HSPB1*

的相对表达量, 每个样品 3 个生物学重复, 计算方法用相对定量方法($2^{-\Delta\Delta C_T}$)计算。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物
Tab. 1 Primers for real-time quantitative PCR

引物 primer	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')
HSP90-F	TTCGGTGTGGGCTTTTATTC
HSP90-R	TTAATGCGCTTTTCTCCAC
BAG3-F	AGCACACTGTCGGCCTAGAT
BAG3-R	CTAAGCTGGGATGGCAAGAC
HSPB1-F	GAAGATCAGCCTAGATGTCAATCA
HSPB1-R	AGCCGTGTTTCATCCTTTCTC
β -actin-F	CTTCGAGCAGGAGATGGGAACC
β -actin-R	GATTCATACCCAGGAAGG

1.4 数据统计

在胚胎发育 12 hpf、24 hpf 统计胚胎死亡情况, 拍照观察胚胎形态变化。所有实验结果均进

行至少 3 次独立实验。

2 结果与分析

2.1 HSP90 功能抑制的检测

有研究报道, HSP90 功能被抑制, 则 BAG3 和 HSPB1 的 mRNA 水平升高, 因此检测这 2 个基因的 mRNA 水平可以反映 HSP90 的功能抑制效果^[15]。实时荧光定量 PCR 结果显示, 与 DMSO 对照组相比, 根赤壳菌素处理斑马鱼胚胎后 BAG3 和 HSPB1 的 mRNA 水平均有不同程度的上调, 2 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理胚胎在 24 hpf BAG3 mRNA 水平显著增加(1.19 \pm 0.08)倍; 24 hpf HSPB1 mRNA 水平显著增加(1.35 \pm 0.08)倍(图 1a); 5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理胚胎 12 hpf BAG3 mRNA 水平显著增加(6.26 \pm 0.08)倍; 24 hpf HSPB1 mRNA 水平显著的

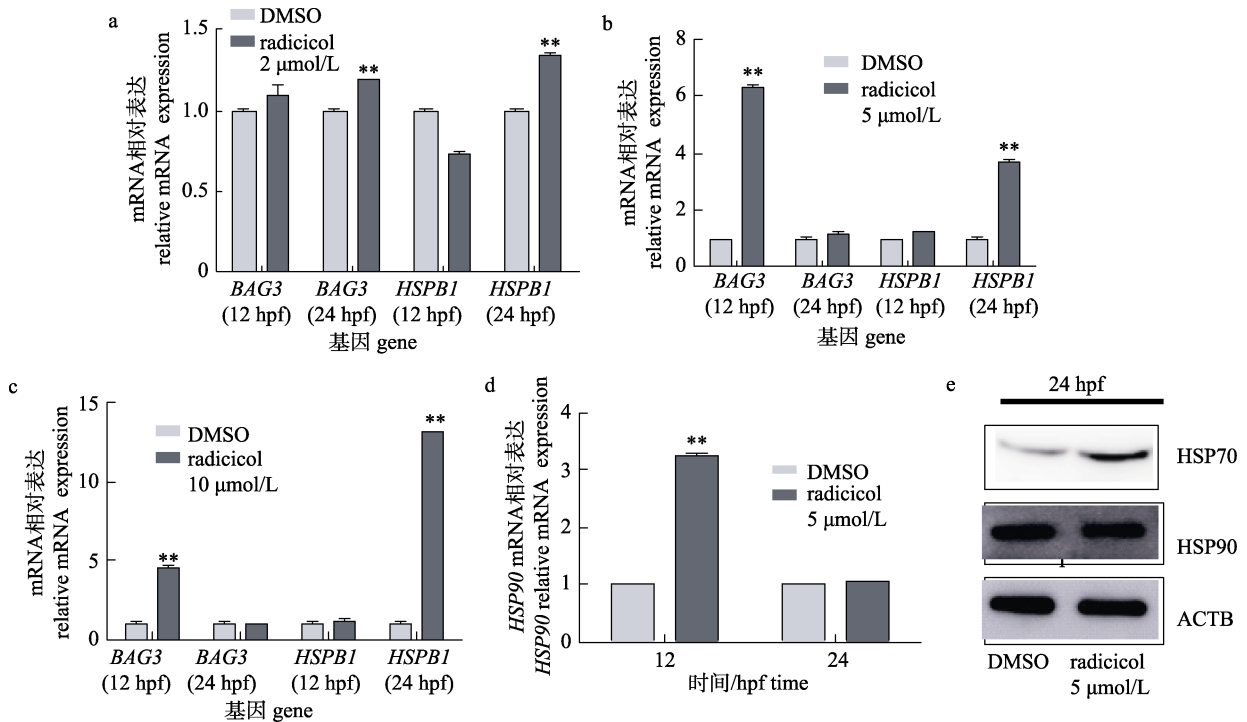


图 1 根赤壳菌素处理斑马鱼胚胎后 HSP90 功能受到抑制的情况

a, b, c 表示实时荧光定量 PCR 检测不同浓度的根赤壳菌素处理胚胎不同发育时期(12 hpf、24 hpf) BAG3 和 HSPB1 mRNA 水平; d. 实时荧光定量 PCR 检测 5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理胚胎在不同发育时期(12 hpf、24 hpf) HSP90 mRNA 水平; e. Western blot 检测 5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理胚胎 24 hpf 的 HSP90 和 HSP70 蛋白表达变化。 β -actin 作为内参。以上数据来自至少 3 次生物学重复, **代表极显著性差异($P < 0.01$, two-tailed t test)。

Fig. 1 The inhibition of HSP90 function after radicicol treatment

The zebrafish embryos were treated with 2 $\mu\text{mol/L}$ (a), 5 $\mu\text{mol/L}$ (b), 10 $\mu\text{mol/L}$ (c) radicicol, then the mRNA levels of BAG3 and HSPB1 were analyzed by RT-qPCR at 12 hpf and 24 hpf; d. The zebrafish embryos were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ radicicol, then the mRNA levels of HSP90 were analyzed by RT-qPCR at 12 hpf and 24 hpf; e. The zebrafish embryos were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ radicicol, then the protein levels of HSP90 and HSP70 at 24 hpf were analyzed by Western blot. β -actin served as a control. The data above were from at least three biological replicates. ** denotes extremely significant differences (two-tailed t test, $P < 0.01$).

增加(3.69 ± 0.08)倍(图 1b)。10 μmol/L 根赤壳菌素处理胚胎 12 hpf, *BAG3* mRNA 水平显著增加(4.93±0.08)倍; 24 hpf *HSPB1* mRNA 水平显著增加(12.5±0.08)倍(图 1c)。由此可见, 不同浓度的根赤壳菌素处理斑马鱼胚胎, *BAG3* 和 *HSPB1* 的 mRNA 水平均显著升高, 此结果与 Rohner 等^[15]报道结果一致, 证明不同浓度的根赤壳菌素对 HSP90 均有不同程度的抑制效果。这些结果说明 HSP90 功能受到了抑制, 实验采用 5 μmol/L 根赤壳菌素处理胚胎 12 hpf *HSP90* mRNA 水平显著增加(3.21±0.08)倍, 而 24 hpf 恢复到原来水平(图 1d)。Western blot 检测 5 μmol/L 根赤壳菌素处理胚胎 24 hpf HSP90 和 HSP70 的蛋白表达, 发现根赤壳菌素处理胚胎 24 hpf HSP70 上调, 这些结果也说明 HSP90 功能受到了抑制(图 1e)。

2.2 HSP90 抑制剂对斑马鱼胚胎成活率的影响

检测不同浓度根赤壳菌素在不同发育时期(12 hpf、24 hpf、72 hpf)的胚胎成活率。结果显示: 与 DMSO 对照组成活率(97±0.5)%相比, 根赤壳菌素处理组导致胚胎成活率下降, 胚胎成活率与根赤壳菌素的浓度呈负相关; 根赤壳菌素浓度越高, 胚胎成活率越低。2 μmol/L 根赤壳菌素组的成活率为(95±0.5)%; 5 μmol/L 根赤壳菌素组的成活率为(77±0.5)%; 10 μmol/L 根赤壳菌素组的成活率为(35±0.5)% (图 2)。

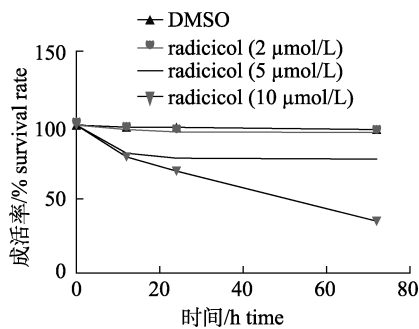


图 2 不同浓度的根赤壳菌素处理对不同发育时期斑马鱼胚胎成活率的影响

Fig. 2 The effect of radicicol on the survival rates of zebrafish embryos at different developmental stages

2.3 HSP90 抑制后胚胎形态学检测

倒置相差显微镜观察, 与野生型斑马鱼胚胎相比, DMSO 对照组、2 μmol/L 根赤壳菌素处理

组和野生型对照组发育过程没有显著的差异, 而 5 μmol/L 和 10 μmol/L 根赤壳菌素组则出现延迟发育现象(图 3), 尤其在 24 hpf 较为明显。

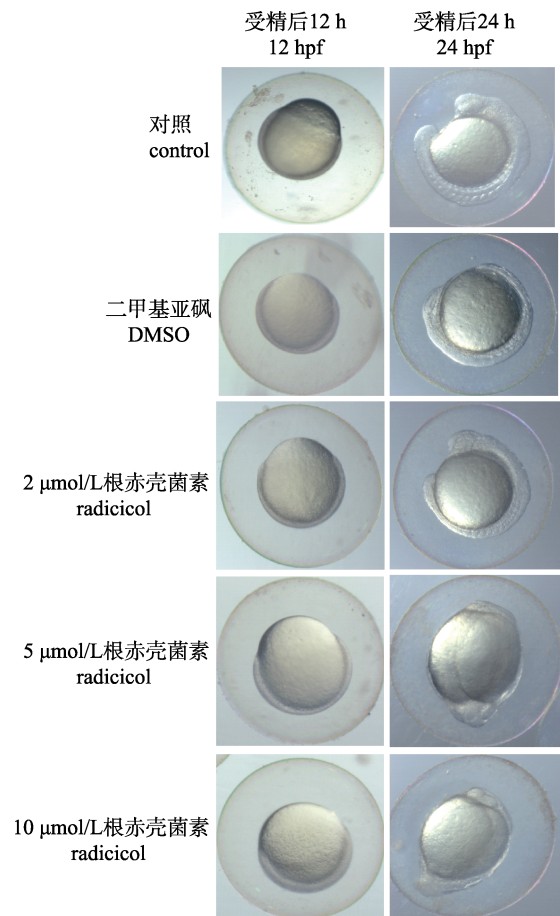


图 3 根赤壳菌素处理对斑马鱼胚胎发育的影响
不同浓度的根赤壳菌素(2 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L)处理斑马鱼胚胎, 12 hpf 和 24 hpf 观察斑马鱼的发育状态。数据来自 5 组样品: 野生型、DMSO 组、根赤壳菌素处理组(2、5、10 μmol/L)的形态学图形。

Fig. 3 The effect of radicicol on the development of zebrafish embryos

The zebrafish embryos were treated with 2 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L radicicol, respectively. Development status was observed at 12 hpf and 24 hpf. The morphological photos above were from 5 groups of embryos: WT, DMSO, radicicol treatment group (2 μmol/L, 5 μmol/L, 10 μmol/L).

2.4 HSP90 抑制导致斑马鱼形态学变化

本实验选择抑制效果明显且成活率较高的根赤壳菌素浓度 5 μmol/L 处理斑马鱼胚胎, 在 72 hpf 时用倒置显微镜观察结果发现, 部分斑马鱼出现异常发育表型, 分别表现为: 黑色素沉积减少(图 4b); 尾部肌肉萎缩, 心包膜肥大现象(图 4c 黑色箭

头所指); 整个尾部上翘与背部连在一起(图 4d 黑色箭头所指), 对斑马鱼的形态造成了一定的影响。

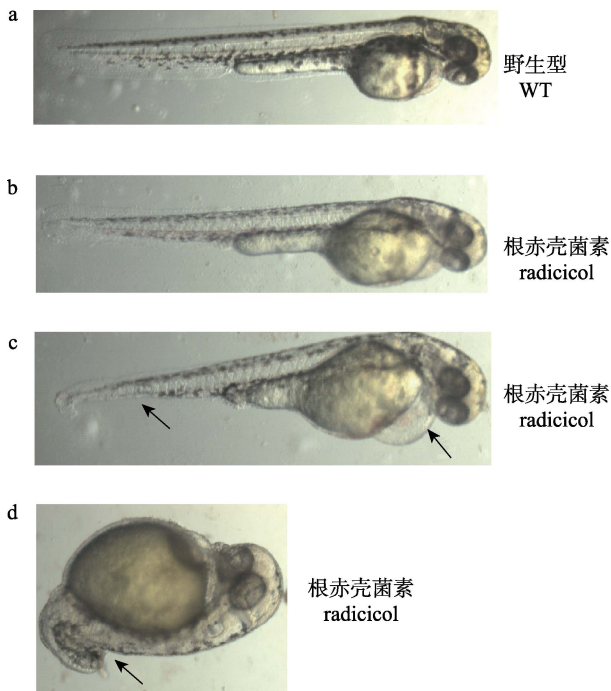


图 4 根赤壳菌素处理导致斑马鱼发育畸形
a. 野生型斑马鱼在 72 hpf 的形态学图形; b、c、d 均为 5 $\mu\text{mol/L}$ 根赤壳菌素处理斑马鱼 72 hpf 的形态学图形。黑色箭头所指是根赤壳菌素处理后不同的形态学异常。

Fig. 4 Developmental abnormalities in zebrafishes treated with radicicol

a. The morphological photos of wide type zebrafishes at 72 hpf; b, c, d: the morphological photos of 5 $\mu\text{mol/L}$ radicicol treated zebrafishes at 72 hpf. Black arrows represent morphological abnormalities after radicicol treatment.

3 讨论

3.1 根赤壳菌素浓度的选择

根赤壳菌素能结合 HSP90 α 的 N 端结构域 ATP 结合位点, 结果诱导 HSP90 的构象由“开放”状态变成“闭合”状态, 导致 HSP90 的 N 端结构域和中间结构域的结合, 增加了 HSP90 α 同源二聚体和 HSP90 α -HSP90 β 异源二聚体 2 种构象的形成, 影响 HSP90 与靶蛋白的结合^[24-25]。为了研究 HSP90 在斑马鱼发育中的作用, 笔者采用根赤壳菌素来抑制斑马鱼胚胎发育中 HSP90 功能的方法。不同浓度根赤壳菌素对斑马鱼胚胎发育和成活率的影响有很大差异, 因此选择合适的根赤壳

菌素浓度十分重要。

本实验所采用的 3 种浓度的根赤壳菌素均可以抑制 HSP90 功能, 经统计 3 种不同浓度根赤壳菌素处理的斑马鱼胚胎的成活率分别为 95% (2 $\mu\text{mol/L}$)、77% (5 $\mu\text{mol/L}$)、35% (10 $\mu\text{mol/L}$) (图 2)。根赤壳菌素的浓度越高, 斑马鱼胚胎死亡率越高。根据成活率统计, 5 $\mu\text{mol/L}$ 的根赤壳菌素处理的斑马鱼胚胎成活率在 75% 以上, 且出现了一系列形态学异常的表型, 所以 5 $\mu\text{mol/L}$ 的根赤壳菌素为后期实验的理想选择。该浓度与 Workman^[26] 的临床治疗癌症的安全浓度实验相一致。

3.2 斑马鱼中的异常表型

本研究发现用根赤壳菌素处理的斑马鱼胚胎出现色素沉积减少、尾部肌肉萎缩、心包膜肥大、背部与背鳍黏合等异常表型(图 4), 这些结果与 Yeyati 等^[27] 研究报道用格尔德霉素在 30% 外包期处理斑马鱼胚胎, 出现心脏移位、脊椎弯曲等现象类似, 说明 2 种浓度的 HSP90 抑制剂均能达到类似的结果, 证明这些异常表型的出现确实是因为 HSP90 的功能抑制所致。

对本实验重复 3 次, 几种异常表型交替出现而且统计结果比例不同, 占总体的 0~3%。导致这些表型随机性出现的原因可能为: (1) 样本数量少, 异常表型可能随机出现; (2) 鱼卵的发育主要在动物极, 实验期间鱼卵孵化采用静水孵育, 鱼卵下沉动物极与孵育器底部接触有可能影响抑制效果; (3) 根赤壳菌素不能直接影响亲代, 异常表型可能出现在 F_1 ; (4) 这些异常表型的整齐度不高可能是根赤壳菌素对 HSP90 功能抑制程度不同, 或者对不同靶蛋白的抑制效果不同所致。

本实验筛选出 5 $\mu\text{mol/L}$ 的根赤壳菌素处理斑马鱼胚胎导致斑马鱼出现异常表型, 这为研究 HSP90 与脊椎动物心脏和脊椎等的发育及斑马鱼的进化提供了良好的材料。根赤壳菌素作为 HSP90 功能的抑制剂影响斑马鱼的胚胎发育, 造成斑马鱼胚胎形态学上的异常, 其作用原理还未见报道, 这些表型的出现是通过哪些基因调控还有待进一步研究。本实验为后期研究 HSP90 如何调控斑马鱼胚胎发育奠定了基础。

参考文献:

- [1] Li J, Buchner J. Structure, function and regulation of the hsp90 machinery[J]. *Biomed J*, 2013, 36(3): 106.
- [2] Brandt G E L, Blagg B S J. Alternate strategies of Hsp90 modulation for the treatment of cancer and other diseases[J]. *Curr Topic Med Chem*, 2009, 9(15): 1447–1461.
- [3] Taipale M, Jarosz D F, Lindquist S. HSP90 at the hub of protein homeostasis: emerging mechanistic insights[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(7): 515–528.
- [4] Gething M J, Sambrook J. Protein folding in the cell[J]. *Nature*, 1992, 355(6355): 33.
- [5] Jahn M, Rehn A, Pelz B, et al. The charged linker of the molecular chaperone Hsp90 modulates domain contacts and biological function[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(50): 17881–17886.
- [6] Krukenberg K A, Street T O, Lavery L A, et al. Conformational dynamics of the molecular chaperone Hsp90[J]. *Q Rev Biophys*, 2011, 44(02): 229–255.
- [7] Li J, Soroka J, Buchner J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones[J]. *Mol Cell Res*, 2012, 1823(3): 624–635.
- [8] Jarosz D F, Taipale M, Lindquist S. Protein homeostasis and the phenotypic manifestation of genetic diversity: principles and mechanisms[J]. *Annu Rev Genet*, 2010, 44: 189–216.
- [9] Boulon S, Bertrand E, Pradet-Balade B. HSP90 and the R2TP co-chaperone complex: building multi-protein machineries essential for cell growth and gene expression[J]. *RNA Biol*, 2012, 9(2): 148–154.
- [10] Kadota Y, Shirasu K, Guerois R. NLR sensors meet at the SGT1–HSP90 crossroad[J]. *Trends Biochem Sci*, 2010, 35(4): 199–207.
- [11] Stebbins C E, Russo A A, Schneider C, et al. Crystal structure of an Hsp90–geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent[J]. *Cell*, 1997, 89(2): 239–250.
- [12] Roe S M, Prodromou C, O'Brien R, et al. Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin[J]. *J Med Chem*, 1999, 42(2): 260–266.
- [13] Waddington C H. Canalization of development and the inheritance of acquired characters[J]. *Nature*, 1942, 150(3811): 563–565.
- [14] Kelley L A, Mezulis S, Yates C M, et al. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis[J]. *Nat protoc*, 2015, 10(6): 845–858.
- [15] Rohner N, Jarosz D F, Kowalko J E, et al. Cryptic variation in morphological evolution: HSP90 as a capacitor for loss of eyes in cavefish[J]. *Science*, 2013, 342(6164): 1372–1375.
- [16] Taipale M, Krykbaeva I, Koeva M, et al. Quantitative analysis of HSP90-client interactions reveals principles of substrate recognition[J]. *Cell*, 2012, 150(5): 987–1001.
- [17] Queitsch C, Sangster T A, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation[J]. *Nature*, 2002, 417(6889): 618–624.
- [18] Jarosz D F, Lindquist S. Hsp90 and environmental stress transform the adaptive value of natural genetic variation[J]. *Science*, 2010, 330(6012): 1820–1824.
- [19] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution[J]. *Nature*, 1998, 396(6709): 336–342.
- [20] Cowen L E, Lindquist S. Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi[J]. *Science*, 2005, 309(5744): 2185–2189.
- [21] Watanabe E, Mano S, Nomoto M, et al. HSP90 stabilizes auxin-responsive phenotypes by masking a mutation in the auxin receptor TIR1[J]. *Plant Cell Physiol*, 2016, 57(11): 2245–2254.
- [22] Sollars V, Lu X, Xiao L, et al. Evidence for an epigenetic mechanism by which Hsp90 acts as a capacitor for morphological evolution[J]. *Nat Gen*, 2003, 33(1): 70–74.
- [23] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498–503.
- [24] Chavez J D, Schweppe D K, Eng J K, et al. *In vivo* conformational dynamics of Hsp90 and its interactors[J]. *Cell Chem Biol*, 2016, 23(6): 716–726.
- [25] Pearl L H. Review: The HSP90 molecular chaperone—an enigmatic ATPase[J]. *Biopolymers*, 2016, 105(8): 594–607.
- [26] Workman P. Altered states: selectively drugging the Hsp90 cancer chaperone[J]. *Trends Mol Med*, 2004, 10(2): 47–51.
- [27] Yeyati P L, Bancewicz R M, Maule J, et al. Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development[J]. *PLoS Genet*, 2007, 3(3): e43.

Effect of HSP90 inhibitor radicicol on zebrafish embryonic development

LUO Juntao, LI Yan, TAO Xiaofan, LIU Wei, NI Guojun, ZHANG Junfang, HAN Bingshe

Key Laboratory of Aquacultural Resources and Utilization, Ministry of Education; College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: To study the role of heat shock protein 90 (HSP90) in the development of zebrafish embryos, we examined the mRNA levels of two HSP90 activity marker genes, namely *bag3* (BCL2-associated athanogene 3) and *hspb1* (heat shock protein beta-1), at different developmental stages. Furthermore, we observed the marker gene expression and development of zebrafish embryos at different stages after treating with 2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, and 10 $\mu\text{mol/L}$ of the HSP90 inhibitor radicicol. Analysis by quantitative polymerase chain reaction showed a strong increase in the mRNA levels of *bag3* and *hspb1* when zebrafish embryos were treated with radicicol at 12 or 24 hours post-fertilization (hpf). Western blot results showed that the protein level of HSP70 was upregulated when zebrafish embryos were treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ radicicol at 24 hpf, indicating that the activity of HSP90 was inhibited. Observations of embryonic development showed that the radicicol-treated embryos had a delayed development and survival rates of 95%, 77%, and 35% after treatment with 2 $\mu\text{mol/L}$, 5 $\mu\text{mol/L}$, and 10 $\mu\text{mol/L}$ radicicol, respectively. The embryos manifested some abnormalities including reduced pigmentation, an enlarged pericardial membrane, and muscular dystrophy after treatment with 5 $\mu\text{mol/L}$ radicicol at 72 hpf. The results showed that HSP90 plays an important role on the development of zebrafish embryos. The radicicol concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$ appeared optimal, because it strongly inhibited HSP90 without decreasing the survival rate of zebrafish embryos below 75%. Various morphological changes appeared in the radicicol-treated embryos, laying a foundation for the further study of HSP90's functions in zebrafish embryos.

Key words: zebrafish; HSP90; radicicol; pigmentation; development

Corresponding author: HAN Bingshe. E-mail: bs-han@shou.edu.cn