

مطالعه اثر آسپیرین بر هیستون H5 و کمپلکس H5-DNA

سرور شجاعیان، سیده زهرا بطحائی

دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه بیوشیمی بالینی

چکیده

هیستون‌های رابط (H1 و H5) نقش مهمی در سازماندهی کروماتین دارند و به عنوان بازدارنده‌های بیان ژن شناخته می‌شوند. هسته گلبول‌های سرخ بالغ جوجه (و بعضی سلول‌های جانوری) حاوی هر دو پروتئین است. هر چند که میان‌کنش هیستون H5 با DNA قوی‌تری از میان‌کنش H1 است، ولی مانع بیان برخی ژن‌های ویژه اریترئوئیدی نمی‌شود. بررسی‌ها نشان داده که بعضی دگرگونی‌ها نقش بسیار مهمی در میان‌کنش هیستون‌ها با DNA، بخصوص در تنظیم رونویسی دارد. استیله شدن هیستون‌ها باعث تغییر شکل کروماتین به فرم فعال می‌شود. آسپیرین به عنوان یک استیله کننده غیر آنزیمی پروتئین‌ها پیشنهاد و در طی سال‌های اخیر نیز، از آن به عنوان یک داروی ضد سرطان استفاده شده است. در این مطالعه، ابتدا هیستون H5 با یک روش اصلاح شده از گلبول‌های سرخ جوجه استخراج، خلوص و شناسایی آن به وسیله الکتروفورز SDS-PAGE و با استفاده از پروتئین استاندارد، انجام گرفت. مطالعات اسپکتروفتومتری حاصل از آنکوبه کردن هیستون H5 با آسپیرین در لرزاننده نشان داد که شرایط بهینه برای استیله شدن H5 توسط آسپیرین، غلظت ۶/۵ میلی مولار آن در مدت ۳/۵ ساعت در دمای اتاق می‌باشد. مطالعات فلوریمتری نشان داد که آنکوبه شدن هیستون H5 با آسپیرین در شرایط بهینه باعث کاهش نشر آن می‌شود که این امر ناشی از استیله شدن پروتئین و باز شدن نسبی تاخوردگی آن است. همچنین پروتئین استیله شده نسبت به پروتئین طبیعی تحرک الکتروفورتیک کمتری را در الکتروفورز در حضور غیرطبیعی کننده (SDS-PAGE)، نشان داد که این امر به دلیل افزایش وزن مولکولی آن است. مطالعات بعدی، بررسی میان‌کنش هیستون H5 استیله در مقایسه با شکل طبیعی آن، با DNA بود. میان‌کنش هیستون استیله شده توسط آسپیرین با DNA کاهشی حدود ۱۵ واحد در نسبت مولی جفت باز DNA به هیستون را در ۵۰٪ رسوب، در مقایسه با هیستون طبیعی نشان داد. هر چند که افزایش آسپیرین به کمپلکس H5-DNA تنها در حدود ۵ واحد کاهش در نسبت فوق ایجاد کرد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که هیستون H5 با آسپیرین استیله می‌شود و به دلیل خنثی شدن بخشی از بارهای مثبت آن و تغییرات بنای فضایی، میان‌کنش کمتری با DNA برقرار می‌کند.

واژه‌های کلیدی: خالص سازی، هیستون H5، آسپیرین، استیله شدن، میان‌کنش پروتئین-DNA

مقدمه

دگرگونی‌ها، استیله شدن است که با تغییر در میزان بار مثبت هیستون‌ها باعث تضعیف میان‌کنش هیستون - DNA در سطوح مختلف تاخوردگی کروماتین می‌شود و بنابراین ثبات رشته‌های تاخوردگی کروماتین را بر هم زده و باعث فعال شدن بیان ژن‌ها می‌شود [۱۹-۲۳].

آسپیرین یک داروی ضد التهاب غیر استروئیدی است که دارای مجموعه وسیعی از اثرات دارویی و درمانی می‌باشد. این دارو علاوه بر اثرات ضد التهاب، ضد درد، ممانعت از تجمع پلاکتها، موجب پیشگیری از ابتلا به ناراحتی‌های قلبی، سکتة قلبی و مغزی نیز می‌باشد. برخی از این اثرات ناشی از استیله شدن آنزیم سیکلواکسیژناز و در نتیجه جلوگیری از سنتز پروستاگلاندین‌ها و ترومبوکسان‌هاست [۲۴]. به علاوه مشخص شده که مصرف آسپیرین دارای اثرات ضدآب مروارید و اثرات درمانی در بیماری کم خونی داسی شکل نیز می‌باشد. این اثرات از طریق استیله کردن پروتئین‌های کریستالین عدسی چشم یا HbS اعمال می‌گردد [۲۵-۲۸].

در سالهای اخیر اثرات ضدسرطانی آسپیرین اثبات شده است. اولین نشانه‌های مربوط به این اثر آسپیرین در درمان سرطان کولون در سال ۱۹۸۸ شناخته شد [۲۹]. در سرطان پروستات نیز مهار سنتز DNA و پروتئین‌ها بوسیله آسپیرین مشاهده شده است [۳۰].

از آنجائی که استیله شدن هیستون‌ها نقش بسیار مهمی در ساختار کروماتین و تنظیم فرآیندهایی چون همانندسازی، رونویسی و ترمیم DNA دارد و آسپیرین نیز دارای خاصیت استیله‌کنندگی است، بنابراین بر آن شدیم تا با بررسی اثر آسپیرین بر ساختار هیستون‌های رابط از جمله هیستون H₅، امکان شناخت بیشتر مکانیزم مولکولی اثر آسپیرین را فراهم سازیم. لازم به ذکر است که چون هیستون رابط میان‌کنش ضعیفی با سایر هیستون‌ها دارد [۱۳، ۳۱ و ۳۲]،

هیستون‌ها اولین پروتئین‌های کروموزومی شناخته شده می‌باشند. این پروتئین‌ها به دو دسته کلی هیستون‌های مرکزی و هیستون‌های رابط تقسیم می‌شوند که دسته دوم، غنی از لیزین هستند [۱ و ۲]. میان‌کنش هیستون‌های رابط با کروماتین از لحاظ ترمودینامیکی فرآیندی برگشت پذیر است [۳].

منشأ هیستون‌های H₁ به باکتری‌ها بر می‌گردد [۴-۶]. اولین بار در سال ۱۹۵۰ Stedman & Stedman پیشنهاد کردند که در هر بافت، هیستون‌های رابط ویژه‌ای وجود دارند که از طریق میان‌کنش با DNA باعث تنظیم یا سرکوب بیان ژن‌ها می‌شوند [۷]. انواع هیستون H₁ در نواحی مختلف کروماتین که دارای درجات متفاوتی از توانایی رونویسی هستند به طور غیر تصادفی توزیع می‌شوند [۸]. نسبت انواع هیستون‌های H₁ در بافت‌های مختلف، متفاوت می‌باشد [۵]. این نسبت‌ها طی تکامل و تمایز سلول‌ها، القاء هورمونی، ترانسفورم شدن ویروسی و رشد سلول تغییر می‌کند [۸]. از جمله انواع هیستون‌های رابط می‌توان به هیستون H₅ اشاره کرد که بر اثر بلوغ در گلبولهای قرمز پرنده‌گان، ماهیها، دوزیستان و خزندگان تجمع یافته و باعث غیر فعال شدن آنها از لحاظ رونویسی می‌شود [۹-۱۳]. از طرفی پس از بیان هیستون H₅ (به طور نابه‌جا) در سایر سلول‌ها، کروماتین متراکم و غیر فعال می‌شود [۱۴]. این هیستون در سلول‌های انسان از جمله اسپرم وجود دارد و مشخص شده که در برخی بیماریها علیه آن آنتی هیستون تولید می‌شود [۱۵ و ۱۶].

وجود مقدار زیادی اسید آمینه‌های بازی در هیستون‌های یوکاریوت‌ها، امکان اتصال محکم آنها را با DNA توسط میان‌کنش‌های الکتروستاتیک فراهم می‌کند [۴۰]. یک مکانیسم برای غلبه بر این نیروها، دگرگون شدن (Modification) هیستون‌ها و القاء تغییر آرایش فضایی در بخشهایی از آنها می‌باشد [۲، ۷، ۱۷ و ۱۸]. یکی از این

کمپلکس‌های حاصل از میان‌کنش DNA با هیستون‌های رابط در شرایط *in vitro* به عنوان مدلی برای کروماتین معرفی شده‌اند [۳۳ و ۳۴].

مواد و روش‌ها

مواد:

DNA بر اساس روش ارائه شده در کارهای قبلی ما [۳۵] از تیموس گوساله استخراج شد. آسپیرین و هیستون ۱ از شرکت سیگما تهیه شد. سایر مواد مورد نیاز نیز از شرکت‌های سیگما و مرک تهیه شد و همگی دارای درجه خلوص بالایی بود. هیستون H5 نیز بر اساس یک روش تصحیح شده در این مقاله استخراج شد.

روش‌ها:

کلیه آزمایشات مربوط به بخش میان‌کنش‌های پروتئین با لیگاند و یا DNA در بافر تریس ۵۰ میلی مولار با pH برابر ۷/۴ و در دمای ۲۷°C انجام شد.

- استخراج هیستون H5:

در این روش گلوبول‌های قرمز به وسیله سانتریفوژ از خون جوجه جدا و به روش انجماد - ذوب ترکانده شد. هسته‌های به دست آمده ابتدا با محلول نمکی ایزوتونیک و سپس با محلول نمکی با غلظت بالا چندین بار با هموزنایزر همگن شد. محصول نهایی حاصل از این مرحله، دزوکسی ریبونوکلئوپروتئین حاوی هیستون H5 بود. برای جداسازی پروتئین از DNA، از اسید پرکلریک ۵٪ استفاده شد، سپس هیستون H5 به کمک اسید تری کلرواستیک رسوب داده و چندین بار با استون سرد شسته شد (شمای ۱).

- بررسی اثر آسپیرین بر هیستون H5:

الف) مطالعات اسپکتروفوتومتری: در این مرحله هیستون H5، با غلظت نهایی ۱ mg/ml با آسپیرین با غلظت نهایی ۵/۵ تا ۱۲/۵ میلی مولار انکوبه و جذب نوری هر لوله

در حضور شاهد مربوط به خود که دارای تمامی مواد به جز H5 بود در فواصل زمانی یک ساعت در طول موج ۲۸۰ نانومتر قرائت شد.

ب) مطالعات اسپکتروفولوریمتری: ابتدا طول موج‌های برانگیختگی و نشری هیستون H5 در شرایط آزمایش تعیین شد که به ترتیب ۲۷۸ نانومتر و ۳۱۲/۴ نانومتر بود. در این شرایط محلول آسپیرین نشری ندارد. سپس محلول آسپیرین در غلظت‌های نهایی ۰/۵ تا ۷/۵ میلی مولار در حضور غلظت نهایی ثابتی از هیستون H5 انکوبه شد و میزان نشر هر نمونه در طول موج برانگیختگی ۲۷۸ نانومتر و طول موج ۳۱۲/۴ نانومتر قرائت گردید.

ج) الکتروفورز: الکتروفورز هیستون H5 به روش لاملی در حضور غیرطبیعی کننده SDS با آکریل آمید ۱۰٪ انجام شد. برای این منظور هیستون H5 با غلظت نهایی با محلول آسپیرین با غلظت‌های نهایی ۰/۵ تا ۶/۵ میلی مولار انکوبه و سپس الکتروفورز نمونه‌ها انجام شد.

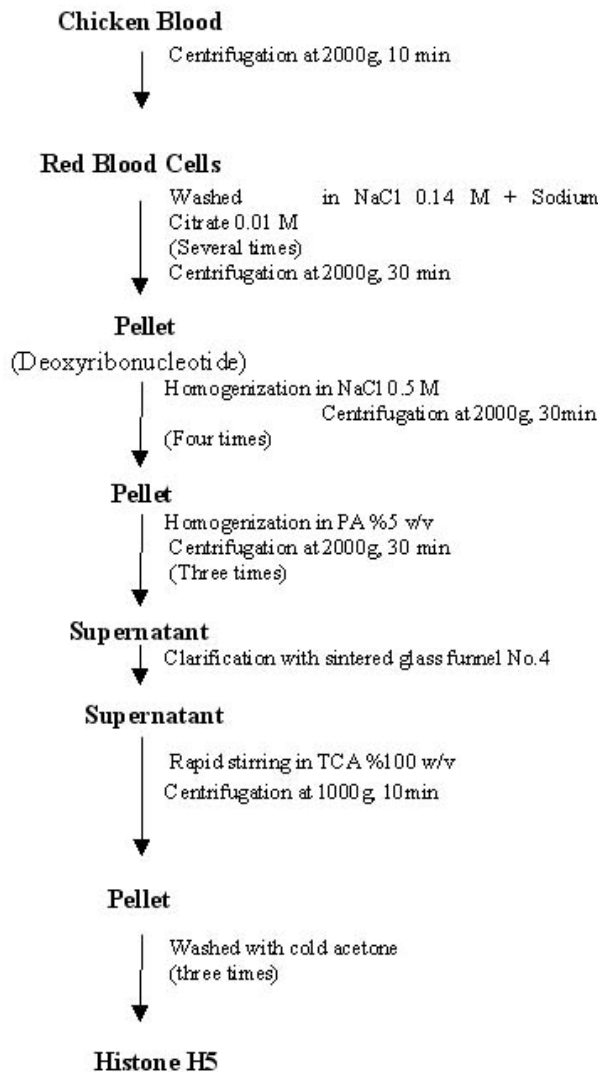
- مطالعه میان‌کنش H5 با DNA

این مطالعات در سه بخش و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد.

الف) میان‌کنش هیستون H5 طبیعی با DNA: تعیین غلظت DNA در این مطالعه بر اساس قرائت جذب در ۲۶۰ نانومتر و استفاده از ضریب جذب مولی $10^4 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ صورت گرفت [۳۶].

در یک سری لوله اپندورف حاوی محلول DNA با غلظت ثابت نهایی (۰/۰۴ mMbp)، محلول هیستون H5 طبیعی به گونه‌ای اضافه شد که نسبت نهایی $\frac{DNA(mMbp)}{H5(mM)}$ بین ۵ تا ۴۰۰ متغیر باشد. سپس نمونه‌ها در دمای ۳۷°C به مدت یک ساعت در لرزاننده نگهداری، سپس سانتریفوژ شد و درصد رسوب حاصل از تشکیل کمپلکس DNA - H5 با قرائت جذب DNA باقی مانده در

سپس تغییرات نشر هیستون H5 پس از انکوبه شدن با آسپیرین در شرایط بهینه مورد مطالعه قرار گرفت. همان طور که در نمودار ۲ مشاهده می شود، با افزایش غلظت آسپیرین، نشر پروتئین کاهش می یابد تا به یک حد ثابتی می رسد.



محلول رویی و بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید [۳۷]:

$$P\% = \left[1 - \frac{\Delta A_{260SUP}}{\Delta A_{260DNA}} \right] \times 100$$

ب) میان کنش هیستون H5 استیل دار شده توسط آسپیرین با DNA: مراحل انجام آزمایش مانند هیستون طبیعی بود با این تفاوت که ابتدا هیستون H5 با آسپیرین در شرایط بهینه (۶/۵ میلی مولار به مدت ۳/۵ ساعت) انکوبه و بعد با غلظت مناسب به محلول DNA اضافه شد.

ج) بررسی اثر آسپیرین بر کمپلکس DNA - H5: ابتدا هیستون H5 طبیعی با DNA مطابق قسمت الف میان کنش داده شد و قبل از سانتریفوژ کردن نمونه ها، محلول آسپیرین با غلظت نهایی ۶/۵ میلی مولار به آنها اضافه و پس از انکوبه شدن مجدد به مدت ۳/۵ ساعت، سانتریفوژ و درصد رسوب حاصل با قرائت جذب DNA در محلول روئی محاسبه شد.

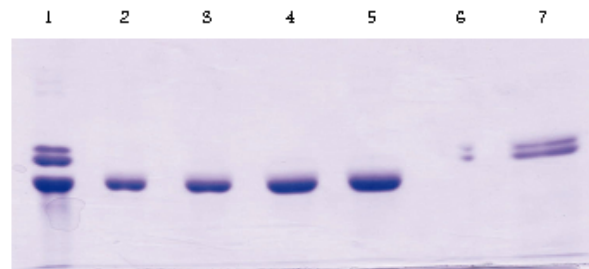
نتایج

همان طور که در بخش روش ها ذکر شد (شماي ۱)، هیستون H5 بر اساس روشی که تلفیقی از چند روش بود، با بازده نسبتا خوب (۵۵٪) و بدون نیاز به ستون کروماتوگرافی، از گلبول های سرخ جوجه جدا شد و خلوص آن توسط الکتروفورز بر روی ژل پلی آکریل آمید، تائید گردید (شکل ۱). سپس با استفاده از پروتئین تولید شده، سایر آزمایش ها انجام شد.

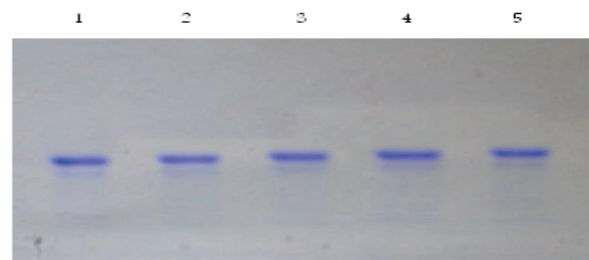
۱- بررسی اثر آسپیرین بر هیستون H5:

ابتدا به منظور بهینه سازی شرایط آزمایش، اثرات دما، بافر، pH، زمان و غلظت آسپیرین بر میان کنش آسپیرین با H5 مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که (نمودار ۱) غلظت ۶/۵ میلی مولار آسپیرین پس از ۳/۵ ساعت انکوبه کردن در ۳۷ ° C و pH برابر ۷/۴ شرایط مناسبی برای انجام واکنش است.

شمای ۱- مراحل استخراج هیستون H5 از گلبول‌های سرخ جوجه



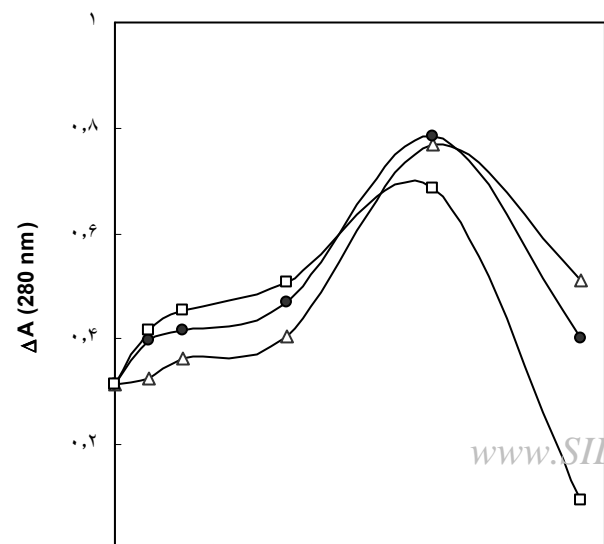
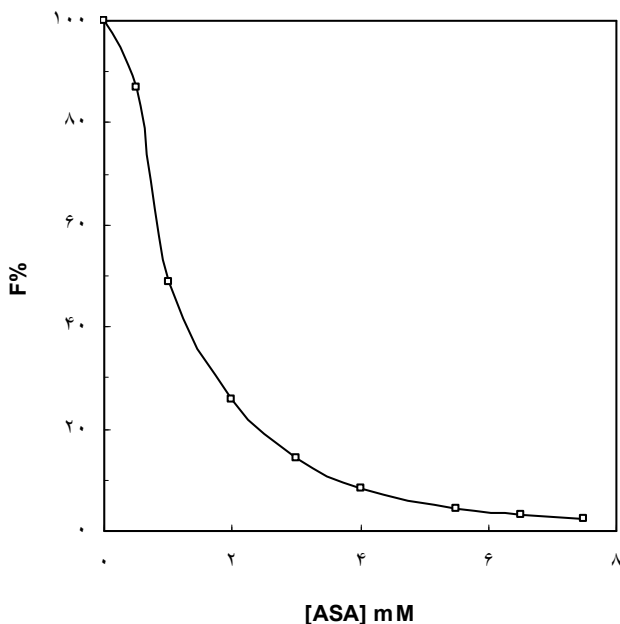
شکل ۱- الکتروفورز هیستون H5 خالص شده از گلبول‌های سرخ جوجه. ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست حاوی مخلوط هیستون‌های H1 و H5 (۱)، هیستون H5 با غلظت‌های افزایشی ۲، ۴، ۸ و ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر (۲ تا ۵) و استاندارد هیستون H1 به میزان ۱/۶ و ۱۶ میکروگرم در میلی لیتر (۶ و ۷) می‌باشد.



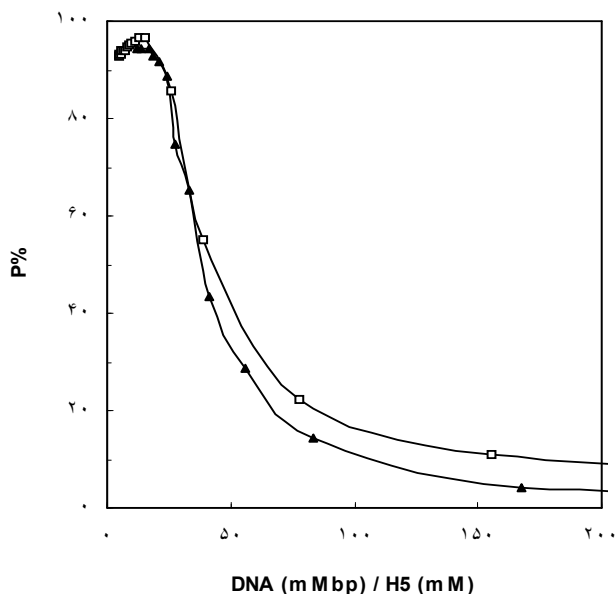
شکل ۲- الکتروفورز هیستون H5 خالص شده از گلبول‌های سرخ جوجه در غیاب و حضور آسپیرین. ستون‌ها به ترتیب از چپ به راست حاوی هیستون H5 خالص (۱) و هیستون H5 در حضور غلظت‌های افزایشی ۰/۵، ۲/۵، ۴/۵ و ۶/۵ میلی مولار آسپیرین (۲ تا ۵)، پس از انکوبه شدن ۳/۵ ساعته می‌باشد.

نمودار ۱- تغییرات جذب هیستون H5 از ۲ تا ۴/۵ ساعت پس از انکوبه شدن با آسپیرین (مثلث: ۲ ساعت، دایره: ۳/۵ ساعت و مربع: ۴/۵ ساعت). در زمان‌های بعدی نمودارها بر یکدیگر منطبق شد. غلظت پروتئین در هر نمونه ۱ mg/ml و غلظت آسپیرین بین صفر تا ۹/۵ متغیر بود. داده‌ها در فواصل زمانی کوتاه‌تر نشان داده نشده است.

قبلاً ملاحظه شده بود که حرکت الکتروفوریتیک هیستون H1 بر اثر استیله شدن با انیدریداستیک کم می‌شود [۲۳] که این تغییر تحرک به دلیل افزایش وزن مولکولی پروتئین بر اثر استیله شدن است. این اثر در مورد هیستون H5 استیله شده نیز ملاحظه گردید (شکل ۲).

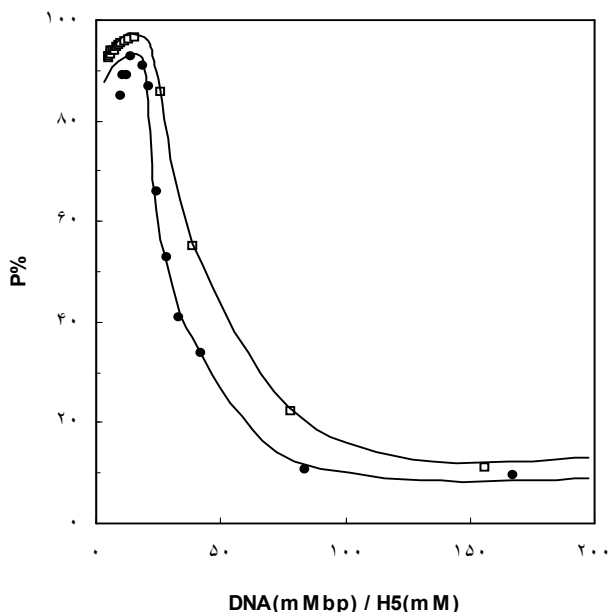


می‌یابد و در نسبت مولی جفت باز DNA به هیستون حدود ۲۰ به حداکثر میزان خود یعنی ۹۷٪ می‌رسد. در مرحله بعد ابتدا هیستون H5 در شرایط بهینه با آسپیرین انکوبه و سپس با DNA میان‌کنش داده شد. نتایج (نمودار ۳، دایره) نشان داد که میزان تشکیل کمپلکس نسبت به H5 طبیعی (مربع) کاهش یافته یعنی نسبت مولی DNA bp / H5 در نقطه مربوط به ۵۰٪ رسوب، از ۴۵ به نسبت مولی ۳۰ رسید و حداکثر رسوب نیز از ۹۷٪ به ۹۲٪/۵ تقلیل یافت. در حالی که افزودن محلول آسپیرین به کمپلکس H5 - DNA باعث شد که این نسبت به ۴۰ برسد و حداکثر رسوب نیز از ۹۷٪ به ۹۴٪/۵ کاهش یابد (نمودار ۴، مثلث).



نمودار ۴ - تغییرات درصد رسوب DNA توسط هیستون H5 طبیعی در غیاب (مربع) و حضور آسپیرین ۶/۵ mM (مثلث).

نمودار ۲ - تغییرات درصد نشر هیستون H5 با غلظت ۰/۱ mg/ml در حضور آسپیرین با غلظت‌های بین صفر تا ۷/۵ میلی‌مولار، پس از انکوبه شدن پروتئین با آسپیرین به مدت ۳/۵ ساعت در هر غلظت.



نمودار ۳ - تغییرات درصد رسوب DNA توسط هیستون H5 طبیعی (مربع) و استیل‌شده توسط آسپیرین ۶/۵ mM (دایره).

۲ - مقایسه میان‌کنش هیستون H5 طبیعی و استیل‌دار شده با DNA:

همان‌طور که در قسمت روش‌ها ذکر شد، این مطالعات طی سه دسته آزمایش طراحی و انجام شد. نمودار ۳ (مربع) نشان می‌دهد که در حضور غلظت ثابت DNA، با افزایش غلظت هیستون H5 میزان تشکیل کمپلکس افزایش

بحث

پروتئین استخراج شده هیستون H5 است و خلوص بسیار بالای پروتئین استخراج شده نیز توسط الکتروفورز به اثبات رسید.

شرایط بهینه برای استیله شدن هیستون H5 توسط آسپیرین به شیوه اسپکتروفتومتری مطالعه شد. همان طور که در نمودار ۱ ملاحظه می شود با افزایش تدریجی غلظت آسپیرین تا تقریباً ۳/۵ میلی مولار تغییرات ناچیزی در جذب پروتئین دیده می شود ولی از آن به بعد تغییرات جذب تشدید شد و در ۶/۵ میلی مولار به حداکثر خود رسید. شکل سیگموئیدی منحنی، دال بر متعاون بودن میان کنش است؛ به این معنی که با اتصال اولین گروه های استیل، اتصال بقیه نیز سریع انجام می گیرد.

به منظور شناخت بهترین زمان برای میان کنش هیستون H5 و آسپیرین تغییرات جذب در زمان های مختلف انجام (نمودار ۱) و ملاحظه شد که میزان جذب بعد از ۳/۵ ساعت به حداکثر میزان خود رسید. نمودارها در زمان های بالاتر بر یکدیگر منطبق شد.

بررسی تغییرات ساختاری هیستون H5 در اثر استیله شدن توسط آسپیرین با استفاده از روش اسپکتروفلوریمتری صورت گرفت. همانطور که در نمودار ۲ ملاحظه می شود با افزایش غلظت آسپیرین نشر پروتئین کم شد تا در غلظت ۶/۵ میلی مولار آسپیرین تقریباً به حد ثابتی رسید.

هیستون های H1 و H5 از پروتئین های دسته A هستند که با داشتن تیروزین، در اثر القاء تاخوردگی در ساختار آنها و فرورفتن تیروزین به مرکز هیدروفوب پروتئین، نشر تیروزین افزایش می یابد [۴۲]. مطالعات قبلی ما در مورد هیستون H1 نشان داده بود که لیگاند هایی که باعث افزایش تاخوردگی می شوند مانند سدیم دودسیل سولفات (SDS) [۴۳] و نمک های کاسموتروپ مثل سدیم کلراید، موجب افزایش نشر پروتئین هم می شوند [۴۴].

روش های مختلفی برای استخراج هیستون H5 از عصاره های سلولی به کار می رود که می توان آنها را به چند دسته کلی تقسیم کرد: استخراج هیستون ها با تغییر pH به سمت pH کمتر [۳۸].

در این روش جداسازی هیستون ها با تغییر قدرت یونی از کروماتین صورت می گیرد، سپس با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یون انواع هیستون ها از هم جدا می شوند [۱۰].

استخراج هیستون ها با استفاده از اسید پر کلریک ۰.۵٪ در این روش با استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی یا کروماتوگرافی غربالی می توان به پروتئین خالص دست یافت [۳۹].

استخراج هیستون ها با استفاده از تغییر قدرت یونی به سمت مقادیر بالاتر و اسید پر کلریک ۰.۵٪ به صورت توأم [۳۸-۴۱].

در این تحقیق با ادغام چند روش، مراحل جداسازی هسته سلول های RBC و کروماتین انجام شد. از آنجائی که هیستون H5 دارای دانسیته بار مثبت بیشتری نسبت به هیستون H1 است [۹] و با DNA میان کنش قوی تری دارد، جدا شدن آن از کروماتین در قدرت یونی بالاتری انجام می شود. پس ابتدا هیستون H1 را بوسیله محلول کلرید سدیم ۰.۵٪ مولار از کروماتین جدا شد، در مرحله بعد با استفاده از قابلیت حلالیت هیستون های غنی از لیزین (H1 و H5) در اسید پرکلریک ۰.۵٪ هیستون H5 به طور خالص از کروماتین بدست آمد [۴۰]. بازده این روش مناسب و بیش از ۵۵٪ بود که با بازده گزارش شده توسط سایر محققین هماهنگ است. الکتروفورز پروتئین استخراج شده در مقایسه با نمونه استاندارد (هیستون H1) مؤید این است که

مشاهده شده بود [۴۶].

مطالعه میان کنش H_0 با DNA در حضور و عدم حضور آسپیرین به کمک روش اسپکتروفتومتری صورت گرفت (نمودارهای ۳ و ۴). همان طور که مشاهده می شود، نمودار سیگموییدی شکل دال بر متعاون بودن میان کنش در pH فیزیولوژیک و قدرت یونی مناسب است. سایر عوامل دخیل در میان کنش هیستون های رابط با DNA با درجات متفاوتی از تعاونی عبارتند از: غلظت DNA و نسبت مولی دو ماکرومولکول [۲ و ۳۳]. از آن جایی که میان کنش هیستون H_0 با DNA عمدتاً به طریق الکتروستاتیک است [۳]، با استیله شدن گروه های لیزین و القاء تغییر بنای فضائی در آن، میان کنش این پروتئین با DNA کاهش می یابد. نتایج این تحقیق حدود ۴/۵٪ کاهش در حداکثر رسوب و حدود ۱۵ واحد نسبت مولی در ۵۰٪ رسوب را در میان کنش هیستون استیله شده توسط آسپیرین با DNA در مقایسه با هیستون طبیعی نشان داد.

در ادامه کار، با توجه به اینکه در سلول کمپلکس DNA-H5 نیز وجود دارد، جهت بررسی اثر آسپیرین بر کمپلکس، آزمایشی طراحی شد که این هدف تأمین گردد یعنی آسپیرین با غلظت بهینه به کمپلکس افزوده شد و بعد میزان رسوب اندازه گیری شد. همان طور که در نمودار ۴ (مثلث) ملاحظه می شود، میزان تشکیل کمپلکس نسبت به عدم حضور آسپیرین، در حداکثر رسوب حدود ۲/۵٪ کاهش یافته، یعنی از ۹۷٪ و به ۹۴/۵٪ رسیده و نسبت مولی در ۵۰٪ رسوب، حدود ۵ واحد کاهش یافته است. این کاهش ۲/۵٪ در مقایسه با کاهش ۴/۵٪ در میزان حداکثر رسوب کمپلکس H_0 استیله با DNA (یا تغییر نسبت مولی از ۴۰ به ۳۰ واحد در ۵۰٪ رسوب)، ناشی از این است که آسپیرین در مواجهه با کمپلکس، به اسید آمینه های لیزین کمتری دسترسی دارد، زیرا اکثر لیزین ها درگیر در میان کنش با DNA هستند. همچنین آسپیرین قادر به رقابت

همچنین نتایج قبلی ما نشان داد که بعضی نمک ها مثل سدیم آیداید و سایر نمک های کائوتروپ، موجب کاهش نشر هیستون H_1 می شوند که این امر به دلیل اثر ناپایدار کنندگی آن ها بر ساختار پروتئین و باز شدن تاخوردگی آن است [۴۴].

تغییرات بار سطحی پروتئین ها و افزایش هیدروفوبیسیته آن ها در اثر استیله شدن توسط عوامل استیله کننده همچون انیدرید استیک و در نتیجه ایجاد ناپایداری در ساختار پروتئین های مختلف مشاهده و گزارش شده است [۴۵]. در مطالعه حاضر نتایج نشان داد که میان کنش هیستون H_0 با آسپیرین باعث کاهش نشر آن شد که این امر نیز احتمالاً ناشی از باز شدن تاخوردگی پروتئین به دلیل خنثی شدن بارهای سطحی هیستون H_0 پس از استیله شدن گروه های لیزین توسط آسپیرین و در نتیجه افزایش هیدروفوبیسیته در سطح پروتئین و ناپایدار شدن ساختمان آن است. همچنین نتایج حاکی از پیدایش جابه جایی در پیک نشری پروتئین به طرف طول موج های بالاتر (red shift) بود که این تغییر مکان پیک نیز دلیل دیگری مبنی بر افزایش هیدروفوبیسیته سطحی پروتئین است [۴۵].

آقای وانگ گزارش کرده بود که حرکت الکتروفوریتیک هیستون H_1 بر اثر استیله شدن با انیدرید استیک کم می شود [۲۳]، بنابراین آزمایش الکتروفورز برای پروتئین طبیعی و استیله شده با غلظت های مختلف آسپیرین انجام و نتایج مشابهی مشاهده شد. حداکثر کاهش تحرک پروتئین در غلظت ۶/۵ میلی مولار آسپیرین مشاهده شد. این نتیجه تأیید دیگری بر استیله شدن ریشه های لیزین با بار مثبت و افزایش وزن مولکولی پروتئین و در نتیجه کاهش حرکت الکتروفوریتیک پروتئین استیله در مقایسه با پروتئین طبیعی است. نتایج مشابهی در مورد هیستون H_1 نیز به دست آمده بود، یعنی تغییرات جذب، نشر فلورسانس و تحرک الکتروفوریتیکی مشابهی در اثر استیله شدن هیستون H_1

H₅ توسط آسپیرین نکته بسیار مهمی را ثابت می کند و آن اینکه، علی رغم اینکه معمولاً کروماتینی که در آن H₅ به عنوان هیستون رابط وجود دارد متراکم بوده و عمدتاً حاوی ژنهای خاموش است، ولی حضور ترکیبات و عوامل مختلفی همچون آسپیرین نیز می تواند موجب کاهش میان کنش و احتمالاً تحریک و شروع بیان ژنها شود.

نتیجه گیری

در این تحقیق بر اساس روش اصلاح شده ای که از ادغام چند روش به دست آمد، هیستون H₅ با بازده نسبتاً خوبی به صورت خالص تولید شد. همچنین نشان داده شد که آسپیرین به عنوان یک استیل کننده می تواند موجب استیله شدن هیستون H₅ شود و از این طریق بر میان کنش آن با DNA اثر بگذارد و این میان کنش را تضعیف کند.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از حوزه معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و دانشکده علوم پزشکی که هزینه این تحقیق را تأمین نمود، تشکر و قدردانی می شود. همچنین از آقای دکتر حمید رضا ظهیری فرد که در تهیه خون جوجه همکاری فراوانی نمودند، تشکر می گردد.

منابع

- [1] Giradet, J.L., Casas, M.T., Cornudella, L., Gorka, C., Lawrence, J.J., Mura, C.V., Conformational effects of histones H1 on DNA structure comparative study between H1-1, H1^o, H5 and sperm holothuria ϕ °, *Biophys. Chem.*, 31 (1988) 275-86.
- [2] Zlatanova, J., van Hold, K., The linker histones and chromatin structure: New twists, *Prog. in Nucl. Acids Res. Mol. Biol.*, 52 (1996) 217-57.
- [3] Kumar, N.M., Walker, I.O., The binding of histones H1 and H5 to chromatin in chicken erythrocyte nuclei, *Nucl. Acids Res.*, 8 (1980) 3535-51.
- [4] Elgin, S.C.R. and Weintraub, H. Chromosomal proteins and chromatin structure, *Ann. Rev. Biochem.*, 44 (1975) 725-75.
- [5] Coles, L.S., Wells, R.E., An H1 histone gene-

با DNA برای میان کنش با لیزینها نیست و توانائی جدا کردن کامل کمپلکس H₅-DNA را ندارد. مطالعه قبلی مانشان داده بود که SDS به طور کامل و در غلظت ها بسیار پائین می تواند موجب تفکیک کامل کمپلکس H1-DNA بشود [۴۳].

نتایج این بررسی در تطابق کامل با مطالعه قبلی ما در مورد هیستون H₁ است، با این تفاوت که کاهش در میان کنش این پروتئین با DNA پس از استیله شدن توسط آسپیرین یا انیدرید استیک به مراتب بیشتر از تغییرات مشاهده شده در مورد هیستون H₅ است [۴۶]. به طور کلی می توان گفت که چون هیستون های رابط در متراکم شدن ساختمان کروماتین نقش اساسی دارند و در مرحله تراکم زدایی، هیستون های رابط به طور کامل تخلیه نمی شوند بلکه قدرت میان کنش آنها با DNA کم می شود [۱۳]، بنابراین حتی کاهش ۲/۵٪ در میزان تشکیل کمپلکس H₅ - DNA در حضور آسپیرین می تواند در فرآیند رونویسی و بیان ژنها اهمیت زیادی داشته باشد. از طرفی محل سنتز هیستون H₅ در سیتوپلاسم سلول است [۹]، بنابراین در حالت طبیعی می توان انتظار داشت که هیستون استیله شده به هسته وارد و با DNA میان کنش بدهد. بنابراین کاهش ۴/۵٪ در این میان کنش نیز احتمال قابل توجهی است. استیله شدن هیستون

- specific 5 elements and evolution of H1 and H5 genes, *Nucl. Acids Res.*, 13 (1995) 585-594.
- [6] Kasinsky, H.E., Lewis, J., Dack, J.B., Ausio, J., Origins of H1 linker histones, *FASEB J.*, 15 (2001) 34-42.
- [7] Stedman, E., Stedman, E., *Nature* 166: 780-81, 1950 (cited in Ref 4).
- [8] Shanon, M.F., Wells, J.R.E., Characterization of the six chicken histone H1 proteins and alignment with their respective genes, *J. Biol. Chem.*, 262 (1987) 9664-68.
- [9] Bergman, M.G., Wawra, E., Winge, M., Chicken histone H5 inhibits transcription and replication when introduced into proliferating cells by microinjection, *J. Cell Sci.*, 91 (1988) 201-209.
- [10] Garcia-Ramirez, M., Rocchini, C., Ausio, J., Modulation of chromatin folding by histone acetylation, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 17923-28.
- [11] Hallupp, M., Buck, F., Stratling, W.H., Structural analysis of purified histone H5 and of H5 in nuclei by limited proteolysis, *Biochem. J.*, 282 (1992) 435-41.
- [12] Robinson, C.C., Danby, S.E., Bradbury, M., Garel, A., Kovacs, A.M., Champagne, M., Daune, M., Structural studies of chicken erythrocyte histone H5, *Eur. J. Biochem.*, 7 (1976) 379-88.
- [13] Yao, J., Lowary, P.T., Widom, J., Linker DNA binding induced by the core histones of chromatin, *Biochem.*, 30 (1991) 8408-18.
- [14] Michlska, E.G., Palyga, J., Lubon, H., Kowalski, A., Cywabenko, K., Genetic variants of chicken erythrocyte histone H5, *Biochem. Mol. Boil. Int.*, 44 (1998) 605-15.
- [15] Pauls, J.D., Silverman E., Laxer R.M., Fritzler M.J., Antibodies to histones H1 and H5 in sera of patients with juvenile rheumatoid arthritis, *Arthritis and Rheumatism*, 32 (1989) 877-83.
- [16] Kleine, T.J., Lewis, P.N., Lewis, S.A., Histone-induced damage of a mammalian epithelium: the role of protein and membrane structure, *Am. Phys. Soci.*, (1997) C1925-C1936.
- [17] Sung, M.T., Dixon, G.H., Modification of histones during spermiogenesis in Trout: A molecular mechanism for altering histone binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 67 (1970) 1616-23.
- [18] Isenberg, I., Histones, *Ann. Rev. Biochem.*, 48 (1979) 159-91.
- [19] Bang, E., Lee, C.H., Yoon, J.B., Chung, J., Lee, D.W., Lee, W., NMR studies on the N-terminal acetylation domain of histone H4, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22 (2001) 507-13.
- [20] Frado, L.L.Y., Mura, C.V., Stollar, B.D., Woodcock, C.L.F., Mapping of histone H5 sites on nucleosomes using immunoelectron microscopy, *J. Biol. Chem.*, 258 (1983) 11984-90.
- [21] Garcia-Ramirez, M., Leuba, S.H., Ausio, J., One-step fractionation method for isolation H1 histones from chromatin under nondenaturing conditions, *Prot. Exp. Pur.*, 1 (1990) 40-44.
- [22] Herrera, J.E., West, K.L., Schiltz, R.L., Nakatani, Y., Bustin, M., Histone H1 is a specific repressor of histone acetylation in chromatin, *Mol. Cell Biol.*, 20 (2000) 523-29.
- [23] Wong, T.K., Marushige, K., Modification of histone binding in Calf thymus chromatin and in the chromatin-protamine complex by acetic anhydride, *Biochem.*, 15 (1976) 2041-46.
- [24] Eklou-Kalonji E., Andriamihaja M., Reinaud P., Mayeur C., Camous S., Robert V., Charpigny G., Blachier F., Prostaglandin-independent effects of aspirin on cell cycle and putrescine synthesis in human colon carcinoma cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 81(5): 443-50, 2003.
- [25] Klotz, I.M., Tam, J.W.O., Acetylation of sickle cell hemoglobin by aspirin, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 70 (1973) 1313-15.
- [26] Xu, A.S.L., mc Donald, J.M., Labotka, R., London, R.E, NMR study of the sites of human hemoglobin acetylated by aspirin,

- Biochim. Biophys. Acta*, 1432 (1999) 333-49.
- [27] Xu, A.S.L., Ohba, Y., Vide, L., Labotka, R., London, R.E., Aspirin acetylation of β Lys-82 of human hemoglobin, *Biochem. Pharm.*, 60 (2000) 917-22.
- [28] Qin, W., Smith, J.B., Smith, D.L., Reaction of aspirin with cysteinyl residues of γ -crystallin: a mechanism for the proposed anti-cataract effect of aspirin, *Biochim. et Biophys. Acta*, 1181 (1993) 103-110.
- [29] www.aspirin.com/milestone/woa_milestones_content0.htm
- [30] Viljoen, T.C., van Aswegen, C.H., Du plessis, D.J., Influence of Acetyl Salicylic Acid and metabolite on Du-145 prostatic cancer cell proliferation. *Oncology*, 52 (1995) 6-69.
- [31] Allen, J., Mitchell, T., Harborne, N., Roles of histone H1 domains in determining higher order chromatin structure and H1 location, *J. Mol. Biol.*, 187 (1986) 591-601.
- [32] Bavikyn, B.G., Usachencho, S.I., Zalensky, A.O., Mirzabekov, A.D., Structure of nucleosome and organization of internucleosomal DNA in chromatin, *J. Mol. Biol.*, 212 (1990) 495-511.
- [33] Bradbury, E.M., Danby, S.E., Rattle, H.W.E., Giancotti, V., Studies on the role and mode of operation of the Very-Lysine-Rich histone H1 (F1) in eukaryote chromatin. Histone H1 in chromatin and H1-DNA complexes, *Eur. J. Biochem.*, 57 (1975) 97-105.
- [34] Fiel, R.J., Porphyrin-nucleic acid interaction, *Ann. Rev. Biomol. Struct. Dynam.*, 6 (1989) 1259-1275.
- [35] Bathaie, S.Z., Moosavi-Movahedi, A.A., Saboury, A.A., Energetic and binding properties of DNA upon interaction with dodecyl trimethylammonium bromide, *Nucl. Acids Res.*, 27 (1999) 1001-5.
- [36] Aktipis, S., Martz, W.W., Kindelis, A. Thermal denaturation of the DNA-Ethidium complex: Redistribution of the intercalated dye during melting, *Biochem.*, 14 (1975) 326-331.
- [37] Buche, A., Colson, P., Houssiev, C., Effect of organic effectors on chromatin solubility, DNA-histone H1 structure, *J. Biomol. Struct. Dynam.*, 11 (1993) 95-119.
- [38] Murray, K., The stepwise removal of histones from chicken erythrocyte nucleoprotein, *Biochem. J.* 107 (1963) 207-15.
- [39] Srebrev, L., Zlatanova, J., A rapid and convenient method for the purification of chicken erythrocyte histone H5, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 8 (1993) 85-86.
- [40] Johns, E.W., Diggle, J.H., A method for the large scale preparation of the avian erythrocyte specific histone F2C, *Eur. J. Biochem.*, 11 (1969) 495-98.
- [41] Libertini, L.J., Small, E.W., Salt induced transitions of chromatin core particles studied by tyrosine fluorescence anisotropy, *Nucl. Acids Res.*, 8 (1980) 3517-52.
- [42] Jordano, J., Barbero, J.L., Montero, F., and Franco, L., Fluorescence of histone H1,

- J. Biol. Chem.**, 258 (1983) 315-320.
- [43] Bathaie S.Z., Moosavi-Movahedi A.A., Ranjbar B. and Saboury A.A.. A Mechanistic Study on H1-DNA complex dissociation by sodium n-Dodecyl sulfate. **Colloid and Surfaces. B: Biointerfaces**, 28 (2003) 17-25.
- [44] Bathaie, S.Z., **Study on H1-DNA interaction under the effect of Hofmeister anions**, Project Report, Tarbiat Modarres University, 2002, Tehran.
- [45] Magdassi, S., and Toledano, O., Enhanced hydrophobicity. In: S. Magdessi (Ed.) **Surface activity of proteins**, Marcel Dekker inc., New York, 1996, pp. 39-51.
- [46] Saadatmand-Zadeh, M., Bathaie, S. Z., Sabouni, F. and Moosavi-Movahedi, A.A. A study on the effect of aspirin on histone H1 structure and H1-DNA interaction, (2004) Submitted.