جداسازی پروتئین LMG از بافت کبد موش و میانکنش آن با DNA

دکتر عذرا ربانی I
*سودابه فلاح II

چکیده

در سلولهای یوکاریوت، ماده ژنتیکی(DNA) در اتصال با یک سری پروتئینها، ساختاری به نام نوکلئوزوم را در کروماتین می‌سازند. دسته‌ای از این پروتئینها به نام پروتئینهای غیرهیستونی با حرکت الکتروفورزی پایین به نام LMG(Low Mobility Group) از کروماتین جداسازی شده‌اند. بررسی پروتئینهای LMG بافت کبد موش روی ژل پلی‌اکریلامید SDS حدود ۱۰ پروتئین را مشخص می‌سازد. در این تحقیق یکی از پروتئینهای LMG از بافت کبد موش با استفاده از روش الکتروفورز و الکتروالوشن تهیه و برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و میانکنش آن با DNA با استفاده از روشهای اسپکتروسکوپی و کروماتوگرافی تمایلی سلولز DNA ۲ رشته‌ای و تک رشته‌ای، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین خالص شده، وزن مولکولی حدود ۱۶۰ کیلو دالتون و نقطه ایزوالکتریک ۵/۵ دارد. بررسی میانکنش LMG با DNA به روش اسپکتروسکوپی نشان داد که جذب ۲۱۰ و ۲۶۰ نانومتر DNA میانکنش یافته با پروتئین، افزایش می‌یابد. مطالعات کروماتوگرافی تمایلی مشخص می‌کند که LMG خالص شده تمایل بیشتری به DNA ۲ رشته‌ای نسبت به تک‌رشته‌ای دارد. بطور کلی می‌توان چنین گفت که پروتئین LMG به DNA متصل می‌شود و موجب بازشدن مولکول DNA در کروماتین می‌گردد لذا می‌تواند به عنوان یک پروتئین تنظیمی نقشهایی را در رونویسی و همانندسازی ایفا نماید.

کلیدواژه‌ها: ۱ – کروماتین ۲ – پروتئینهای غیرهیستونی ۳ – میانکنش

مقدمه

در سلولهای یوکاریوت، DNA به یک سری پروتئینهای اختصاصی متصل است که هیستون نامیده می‌شوند. کمپلکس هیستونی با DNA ساختاری را می‌سازند که مجموعاً نوکلئوزم نامیده می‌شود(۱و ۲). علاوه بر هیستونها، در ساختار کروماتین، پروتئینهای غیرهیستونی نیز وجود دارند که از تنوع بسیاری برخوردار هستند و تاکنون بیش از ۱۰۰ نوع از این پروتئینها شناسایی شده‌اند(۳). این پروتئینها اعمال مختلف و متنوعی را در هسته سلول انجام می‌دهند. آنالیز الکتروفورزی نشان می‌دهد که توزیع پروتئینهای غیر هیستونی در کروماتین فعال و غیر فعال دارای تفاوتهای کمی و کیفی است: به نظر می‌رسد برخی از پروتئینهای غیرهیستونی کروماتین در فعالیت رونویسی ژنها یا تثبیت ساختار کروماتین دخالت داشته باشند(٤). در سال ۱۹۷۳ دسته‌ای از پروتئینهای غیرهیستونی که قدرت حرکت الکتروفورزی کم و وزن مولکولی بالایی دارند توسط Johns و همکارانش از بافت تیموس گوساله جداسازی شدند. این پروتئینها به نام پروتئینهای LMG(Low Mobility Group) نام‌گذاری شدند. از آنجائیکه پروتئینهای LMG در آب و حلالهای معمولی نامحلول هستند، کمتر مطالعه شده‌اند(۷-۵). از سوی دیگر این پروتئینها به علت اتصال سست با کروماتین، در قدرتهای یونی پایین از کروماتین جدا می‌شوند(۱۰-۸).

این مقاله خلاصه‌ایست از پایان نامه سودابه فلاح جهت دریافت مدرک دکتری بیوشیمی به راهنمایی خانم دکتر عذرا ربانی، سال ۱۳۸۰

I) استاد گروه بیوشیمی ـ بیوفیزیک، مرکز تحقیقات بیوشیمی ـ بیوفیزیک، دانشگاه تهران.

II) مربی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ درمانی ایران(*مولف مسؤول)

در سال ۱۹۹۰ Wiland و همکارانش یکی از اجزای پروتئینهای غیرهیستونی را با استفاده از روش کروماتوگرافی (Immuno affinity) از کروماتین سلولهای کبدی موش جدا کردند(۱۱).

بررسی میانکنش یکی از این پروتئینها با پروتئینهای هیستونی با استفاده از روش کراس‌لینک نشان می‌دهد که احتمالاً میانکنش‌هایی را با برخی از پروتئینهای هیستونی مانند H_{2A}، H_3، H_4 انجام می‌دهد اما ارتباط ساختمانی یا عملکردی در کمپلکسها هنوز مشخص نیست(۱۱).

در سال ۱۹۹۳ Wiland و همکارانش نشان دادند که برخی از پروتئینهای LMG حاصل از سلولهای کارسینومای پانکراس نیز با قطعه بخصوصی از DNA میانکنش داده و کمپلکسهای ویژه‌ای با قطعات ژن آنتی‌ژن 1A–17 تشکیل می‌دهند(۱۲).

تهیه آنتی‌بادی علیه برخی از این پروتئینها و میانکنش آنها با سایر پروتئینهای کروماتین بطور سطحی نشان می‌دهد که این پروتئینها بسیار متنوع می‌باشند.

همچنین گزارشهایی مبنی بر اتصال این پروتئینها به الیگونوکلئوتیدهای سنتز شده اختصاصی نیز وجود دارد(۱۱).

در این تحقیق پروتئین LMG با وزن مولکولی تقریباً ۱۶۰ کیلودالتون، از کروماتین کبد موش جداسازی شدو برخی از خصوصیات بیوشیمیایی و میانکنش آن با DNA تعیین گردید.

روش بررسی

تمام آزمایشات در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در حضور محلول ۰/۵ میلی‌مولار PMSF(Phenyl-Methyl-Sulfunyl-Flouride) به عنوان مهارکننده پروتئاز انجام شد. موش استفاده شده در این مطالعه از نوع Sprague Dawley با وزن تقریبی ۲۰۰ گرم بود که از انیستیتو رازی خریداری شده بود.

جداسازی پروتئینهای LMG: کروماتین از سلولهای کبد موش تهیه شد(۱۳و ۱٤) که جهت جداسازی کروماتین، ابتدا کبد موش خارج شد و بعد از شستشوی آن با سرم فیزیولوژی، در بافر ۰/۰۷۵ مولار کلرید سدیم، ۰/۰۲۵ مولار EDTA(PH=۷/۳) با دستگاه هموژنیزور (STI-MODEL-S63c) هموژن گردید.

محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۹۰۰ دور، سانتریفوژ گردید. محلول رویی جدا شد و رسوب کروماتین حاصل حداقل ۳ بار دیگر به روش فوق شستشو داده شد. رسوب به دست آمده توسط بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار و کلرید سدیم ۰/۳۵ مولار (PH=۷/٤) هموژن و به مدت ۳۰ دقیقه در ۵۹۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

مرحله استخراج ۳ بار تکرار گردید و محلولهای رویی ۳ مرحله، جمع‌آوری و به مدت ۱ ساعت در ۹۰۰۰ دور سانتریفوژ شد. به محلول رویی رزین کربوکسی متیل سفادکس (۰/۲-۰/۱٪) شسته شده با بافر، اضافه گردید و به صورت هموژن در آورده شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در ۵۹۰۰ دور سانتریفوژ گردید.

نمونه به دست آمده در مقابل بافر تریس ۵۰ میلی‌مولار، EDTA ۱۰ میلی‌مولار، PMSF ۰/۵ میلی‌مولار (PH=۸) دیالیز شد.

کروماتوگرافی: نمونه تهیه شده به وسیله تعویض آنیون DEAE(DE 52) با ابعاد ۲۲/۵×۳/۷ سانتیمتر کروماتوگرافی گردید.

ستون با ۲ برابر حجم بافر با سرعت ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه شسته شد و نمونه‌های ۱۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید.

پس از شستشو با بافر، گرادیان نمکی از صفر تا ۰/۱ مولار با حجم کلی ۸۰۰ میلی‌لیتر به ستون وصل شد و لوله‌های ۱۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری گردید که در طول موجهای ۲۳۰ و ۲٦۰ نانومتر قرائت و منحنی کروماتوگرام رسم شد.

پیک A حاصل بعد از تغلیظ و دیالیز در برابر بافر (شب تا صبح) روی ستون سفادکس با ابعاد ۲×۰/۸٦ سانتیمتر

قرار گرفت ستون را با بافر شسته و نمونه‌های ۳میلی‌لیتری با سرعت ۳ میلی‌لیتر در دقیقه جمع‌آوری گردید.

پس از قرائت جذب نمونه‌ها در ۲۳۰ و ۲۶۰ نانومتر منحنی کروماتوگرام رسم شد. پیکهای I و II بطور جداگانه جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد.

جداسازی پروتئین LMG کل: نمونه‌های پیک I حاصل از ستون ژل فیلتراسیون بعد از تغلیظ و دیالیز (شب تا صبح)، با سولفات آمونیوم ٤٠٪ ترسیب یافت.

رسوب حاصل بعد از شستشو با مخلوط استن ـ اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال (v/v ۱:٦) و سپس با استن خالص، با خلاء خشک و در ٤- درجه سانتیگراد نگهداری شد. غلظت پروتئین به روش لوری (۱۵) با استفاده از آلبومین به عنوان پروتئین استاندارد مشخص شد.

جداسازی پروتئین LMG به روش ژل الکتروفورز preparative: برای جداسازی از روش الکتروفورز روی ژل صفحه‌ای اکریلامید SDS ۱۰٪ لاملی (Laemmli)(۱٦) با ولتاژ ثابت ۱۰۰ ولت، استفاده گردید.

تا ٤٠ میلی‌گرم از پروتئین LMG کل بعد از حل شدن در بافر نمونه‌گذاری، روی ژل صفحه‌ای ۱۰٪ پلی‌آکریل آمید SDS، با ابعاد ۱۳×۱۷/۵ سانتیمتر و ضخامت ۰/۵ سانتیمتر به مدت ۳ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. بند پروتئینی LMG مورد نظر از ژل جدا شد و پس از هموژن در بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار (PH=۸) به مدت ۸ ساعت در ولتاژ ۸۰ تا ۱۰۰ ولت الکتروالوشن گردید، سپس در مقابل بافر دیالیز (صبح تا شب) شد.

پروتئین LMG جدا شده در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد و غلظت آن با روش لوری مشخص گردید.

تعیین وزن مولکولی: نمونه پروتئین LMG جدا شده به همراه پروتئینهای استاندارد وزن مولکولی (Sigma) روی ژل اکریلامید SDS ۱۰٪ الکتروفورز شد، سپس منحنی حرکت رسم و وزن مولکولی آن تعیین گردید.

تعیین اسید آمینه انتهای آمینی (N-terminal): آنالیز اسید آمینه انتهای آمینی پروتئین LMG خالص شده با استفاده از دنزیل کلراید به روش کروماتوگرافی ۲ بعدی(۱۷) انجام شد.

میانکنش پروتئین LMG با DNA که با ۲ روش انجام شد: الف ـ روش اسپکتروسکپی: ابتدا DNA تیموس گاوی (شرکت سیگما) در غلظت ۱میلی‌گرم در میلی‌لیتر در بافر تریس ۱۰ میلی مولار (PH=۸) تهیه شد، سپس طیفهای جذبی DNA کنترل و DNA میانکنش یافته با غلظتهای مختلف پروتئین برای نسبتهای متفاوت پروتئین /DNA در برابر غلظت ثابت DNA (میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با استفاده از اسپکتروفتومتر شیمادزو مدل ۲٦۰ uv در طول موجهای ۲٦۰-۱۹۰ نانومتر ترسیم شد.

ب ـ کروماتوگرافی تمایلی سلولز- DNA: سلولز DNA تک رشته از شرکت سیگما خریداری شد و سلولز DNA ۲ رشته‌ای مطابق روش Albert و Herrick تهیه گردید(۱۸). ۱ میلی‌لیتر از پروتئین LMG با غلظت ۳۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر روی ستون با ابعاد ۲/۵×۰/۷ سانتیمتر قرار داده شد سپس نمونه‌های ۱ میلی‌لیتری حاصل از شستشوی ستون با ۳ برابر حجم از بافر و محلول بافری با گرادیان نمکی کلرید سدیم ۰/٦-۰/۱ مولار با حجم کلی ۱۰۰ سانتیمتر مکعب با سرعت ٤ میلی‌لیتر در ساعت جمع‌آوری شد. جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید.

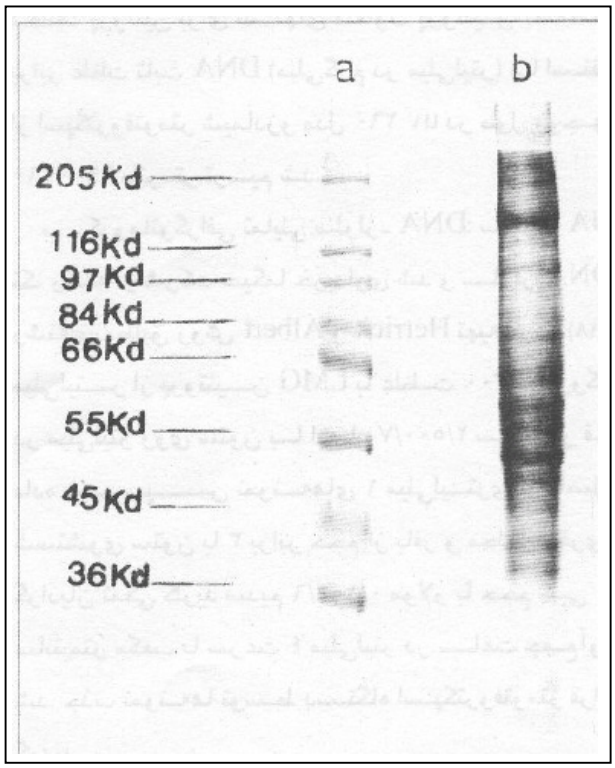
آنالیز پروتئین LMG حاصل از شستشوی ستونها بعد از ترسیب با TCA ۱۰٪ (تری کلرواستیک اسید) روی ژل پلی اکریلامید SDS ۱۰٪ مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج

طرح الکتروفورزی پروتئینهای غیرهیستونی جدا شده از کروماتین سلولهای کبدی که در محلول نمکی با قدرت یونی پایین محلول می‌باشند در شکل شماره ۱ نشان داده شده است.

بطوری که مشاهده می‌شود تعداد زیادی بند روی ژل با وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۲۰۰ کیلو دالتون نمایان است. برای خالص کردن از چند روش استفاده گردید.

ابتدا برخی از پروتئینهای با وزن مولکولی پایین که تمایل اتصال به کربوکسی متیل سلولز را دارند، از محیط عمل برداشته شدند و پروتئینهای LMG به حالت محلول با غلظت نسبتاً بالایی باقی ماندند که جهت الکتروفورز توسط TCA ۱۰٪ رسوب داده شدند و پس از آماده‌سازی روی ژل الکتروفورز برده شدند.



شکل شماره ۱- طرح الکتروفورزی ژل ۱۰٪ پلی‌اکریلامید SDS پروتئینهای LMG

a: پروتئینهای با وزن مولکولی استاندارد. b: پروتئینهای LMG

در مرحله بعدی جداسازی، پروتئینهای LMG روی ستون کروماتوگرافی تعویض آنیون DEAE قرار گرفتند، همان طور که منحنی کروماتوگرام شکل شماره ۲(۲a) نشان می‌دهد نمونه‌ها به صورت ۲ پیک، A و B از ستون خارج شدند. با توجه به طرح الکتروفورزی نمونه‌های پیک A و B(شکل شماره ۲)، مشخص می‌گردد که پروتئینهای LMG بطور همزمان از ستون جدا شده‌اند.

از آنجائیکه این پروتئینها در ابتدای اتصال گرادیان نمک از ستون خارج شده‌اند، می‌توان گفت که بار کلی این پروتئینها احتمالاً منفی می‌باشد اما میزان بار منفی خیلی زیاد نیست. جذب نمونه‌ها با استفاده از سیستم مولتی لاندا در چند طول موج اندازه‌گیری شد.

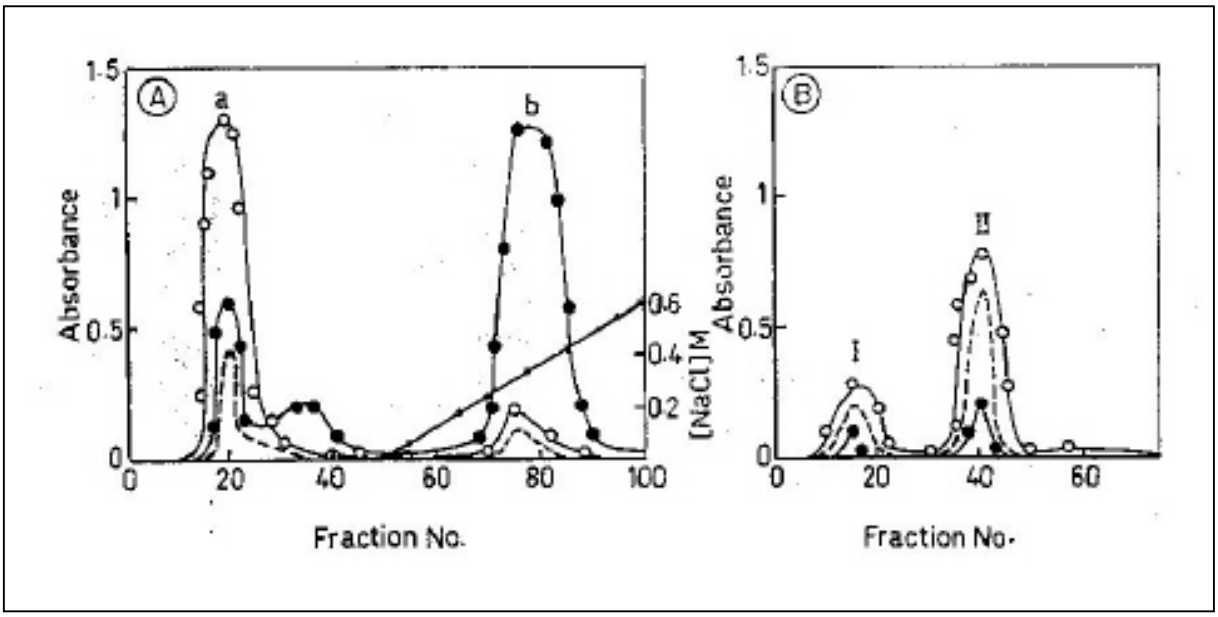
بررسی جذب ۲۶۰ نانومتر نمونه‌های خارج شده از ستون نشان می‌دهد که پیک B مقدار نسبتاً زیادی در ۲۶۰ نانومتر جذب دارد. این احتمال وجود دارد که در حین جداسازی پروتئینهای غیرهیستونی از کروماتین به همراه آنها مقداری اسیدنوکلئیک نیز جدا شده باشد. بنابراین جهت پرهیز از آلودگی پروتئینها با اسیدهای نوکلئیک، نمونه‌های پیک A که در طول موج ۲۶۰ نانومتر جذب جزئی دارند، در مرحله بعدی خالص کردن مورد استفاده قرار گرفتند.

در مرحله بعد، جهت جداسازی پروتئینهای LMG بر حسب وزن مولکولی و اندازه، از ستون ژل فیلتراسیون (Gel Filtration) استفاده شد.

منحنی کروماتوگرام مربوط به شستشوی پیک B حاصل از ستون تعویض یون DEAE که روی ستون ژل فیلتراسیون G-100 قرار گرفته بود رسم شد(شکل شماره ۲b).

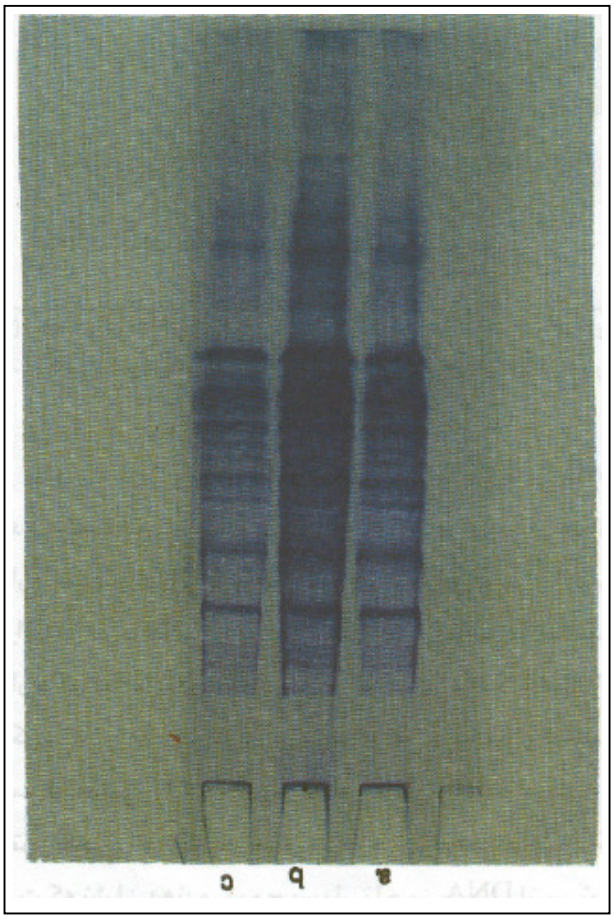
طرح الکتروفورزی نمونه‌های ترسیب یافته با TCA ۱۰٪ که از این مرحله روی ژل ۱۰٪ پلی اکریلامید SDS به دست آمد(شکل شماره ۳) نشان می‌دهد که احتمالاً پروتئینهای دسته LMG بطور همزمان از ستون خارج شده‌اند.

جهت جداسازی یکی از پروتئینهای LMG، با استفاده از الکتروفورز نمونه‌های پیک II ستون ژل فیلتراسیون، بند پروتئین LMG مورد نظر را از روی ژل جدا کرده، سپس وزن مولکولی پروتئین LMG خالص شده به همراه پروتئینهای با وزن مولکولی استاندارد، توسط الکتروفورز روی ژل ۱۰٪ اکریلامید SDS(شکل شماره ٤a) و رسم منحنی استاندارد حرکت(شکل شماره ٤b)، ۱۶۰ کیلو دالتون تخمین زده شد.



(O)- جذب نمونه‌ها در ۲۳۰ نانومتر، (●)- جذب نمونه‌ها در ۲۶۰ نانومتر، (---)- جذب نمونه‌ها در ۲۱۰ نانومتر

شکل شماره ۲- A- منحنی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی پروتئین LMG روی ستون DEAE، B- منحنی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی نمونه پروتئین LMG روی ستون ژل فیلتراسیون سفادکس G-۱۰۰



شکل شماره ۳- طرح الکتروفورزی ژل ۱۰٪ پلی‌اکریلامید SDS پروتئینهای LMG. خط a- پروتئینهای LMG قبل از قرارگرفتن روی ستون DEAE، خط b- پروتئینهای LMG بعد از خارج شدن از ستون DEAE، خط c- پروتئینهای LMGبعد از خارج شدن از ستون ژل فیلتراسیون

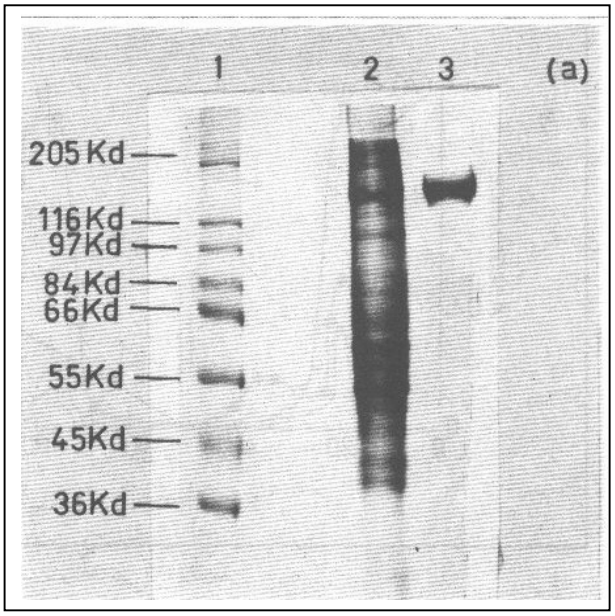
طیف جذبی پروتئین LMG خالص شده نشان می‌دهد که ماکزیمم جذب آن در ۲۱۰ تا ۲۳۰ نانومتر بوده و جذب در ۲۸۰ نانومتر بسیار کم می‌باشد(شکل شماره ۵).

تعیین اسید آمینه انتهای آمین پروتئین LMG خالص شده، حضور اسید آمینه گلیسین را تأیید کرد.

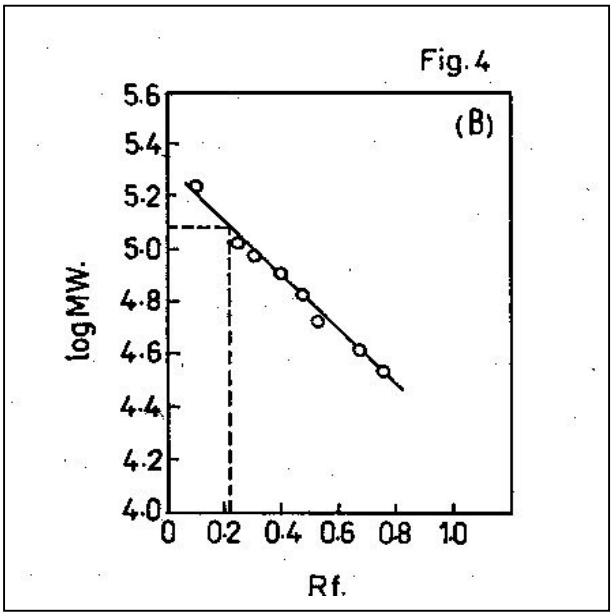
جهت بررسی میانکنش این پروتئین با DNA، ابتدا طیف جذبی نمونه‌های میانکنش یافته در برابر بافر، در طول موجهای ۱۹۰ تا ۳۵۰ نانومتر و سپس طیف تفاضلی آن در برابر غلظتهای مشابه پروتئین رسم شد.

همان طور که در شکل شماره ٦ مشاهده می‌شود، پروتئین LMG خالص شده جذب ۲۱۰ و ۲٦۰ نانومتر DNA را بالا می‌برد اما این تغییر جذب، وابسته به غلظت می‌باشد بطوری که در نسبت غلظت ۱:۱ جذب افزایش می‌یابد و در نسبت غلظت ۱:٤ افزایش بیشتری مشاهده می‌گردد.

جهت درک بیشتر تمایل LMG خالص شده به DNA، از کروماتوگرافی تمایلی سلولز DNA تک رشته‌ای و ۲ رشته‌ای استفاده شد.



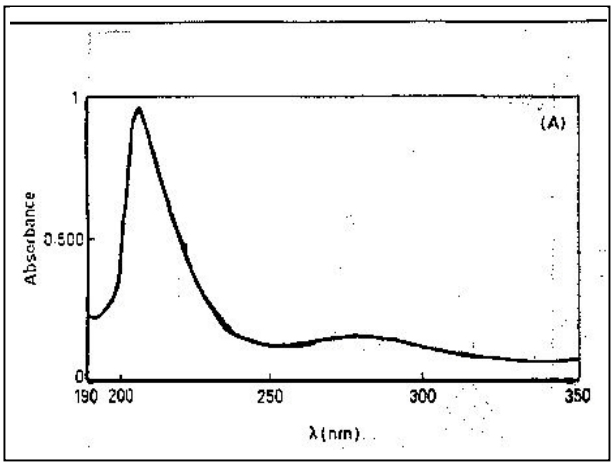
شکل شماره ۴- (A) طرح الکتروفورزی ژل ۱۰٪ پلی‌اکریلامید SDS
a- پروتئینهای با وزن مولکولی استاندارد، b- پروتئینهای دسته LMG کل، c- پروتئین LMGخالص شده



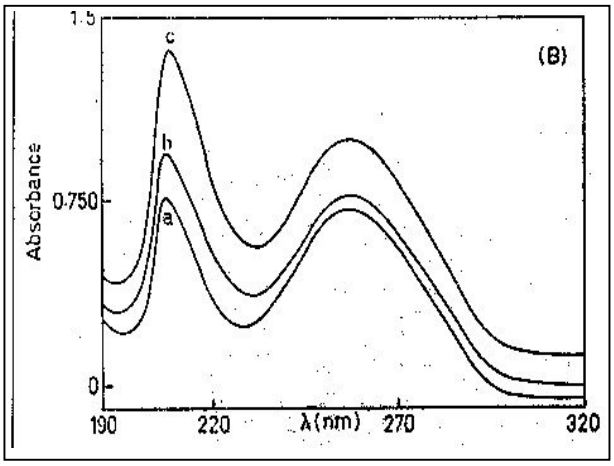
(B)- منحنی حرکت پروتئینها با وزن مولکولی استاندارد

بعد از تثبیت DNA ۲ رشته‌ای روی سلولز، LMG خالص شده مستقیماً روی هر دو ستون قرار گرفت.

منحنی کروماتوگرام حاصل از شستشوی ۲ ستون در ۲ شکل (٦a) و (٦b) نشان داده شده است.

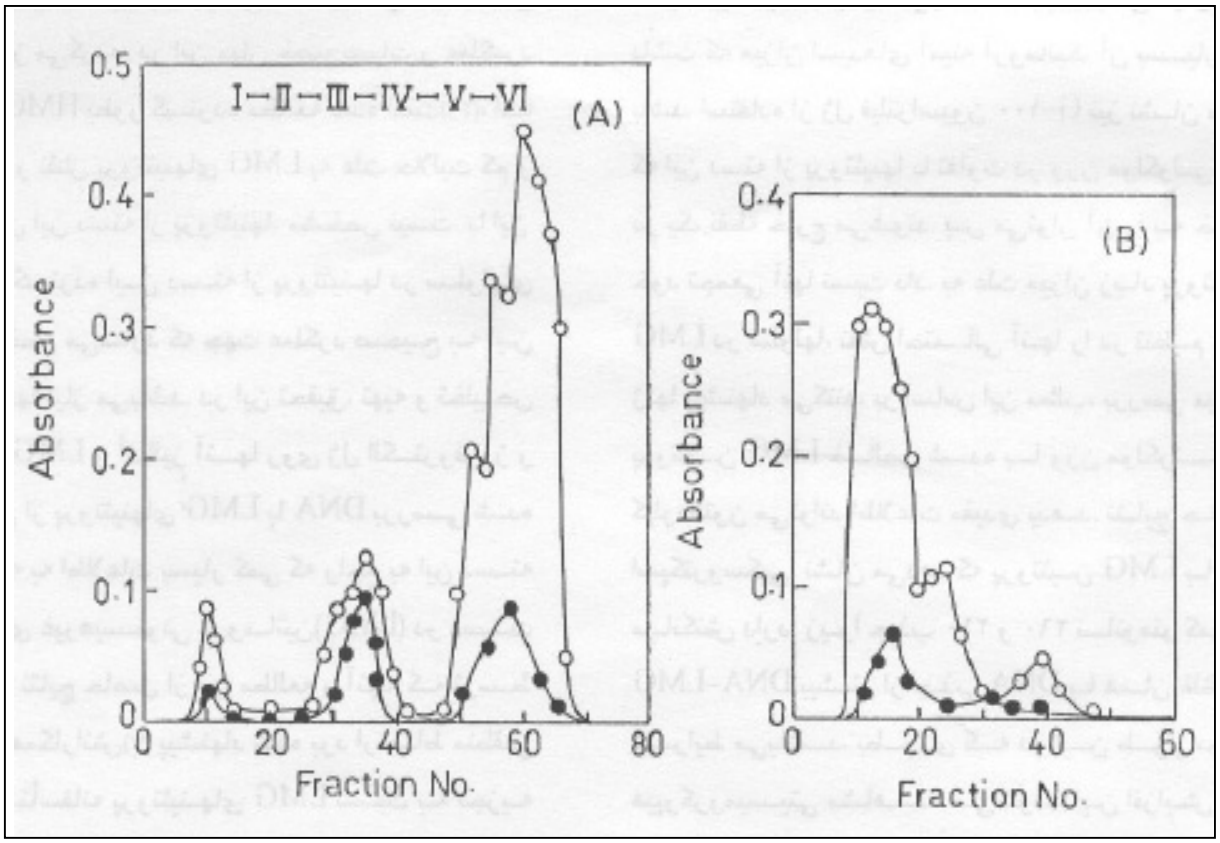


شکل شماره ۵- (A) طیف جذبی پروتئین LMG خالص شده از ژل در برابر بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار(PH=۸)

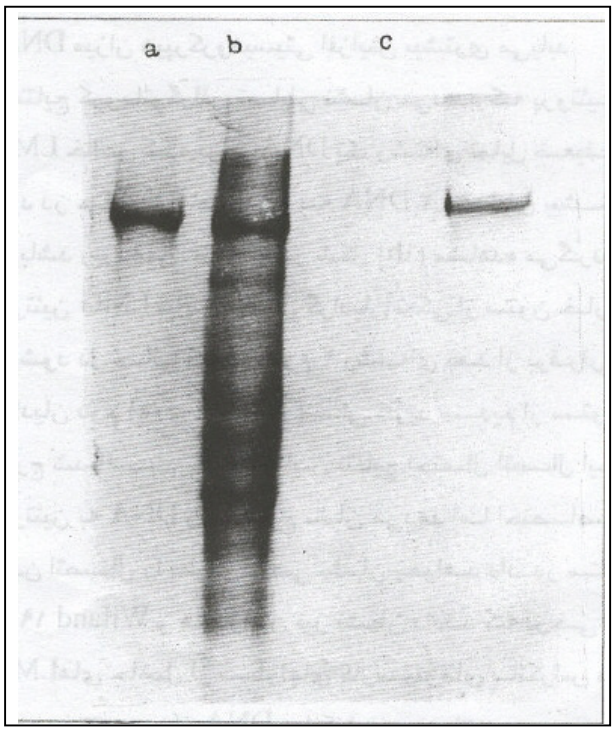


(B)- طیف جذبی DNA ۲ رشته‌ای، a- طیف جذبی DNA در برابر بافر تریس، c،b- طیف جذبی کمپلکس DNA-LMGدر برابر غلظتهای به ترتیب ۰/۵ و ۲ میلی‌مولار LMG

در ستون سلولز DNA تک رشته‌ای، نمونه پروتئین LMG بعد از شستشوی ستون با بافر در لوله‌های اولیه از ستون خارج شد در حالی که در نوع ۲ رشته‌ای بعد از اتصال گرادیان دوم نمکی (۰/۵-۰/٤ مولار) پروتئین از ستون خارج گردید. در نمونه‌های خارج شده توسط گرادیان اول نمکی (۰/٤-۰/۱ مولار)، پروتئین LMG حضور نداشت. نسبت جذبی ۲۳۰/۲٦۰ نمونه‌های خارج شده از هر دو ستون همان طور که در شکل شماره ٦ مشاهده می‌شود کم است که نشان دهنده خروج بسیار ناچیز DNA از ستونها می‌باشد. آنالیز نمونه‌های پروتئین حاصل از شستشوی ستونها توسط الکتروفورز ژل ۱۰٪ پلی اکریلامید SDS(شکل شماره ۷) طرح یکسانی را نشان می‌دهد.



شکل شماره ۶- منحنی کروماتوگرام حاصل از کروماتوگرافی تمایلی سلولز DNA، (a)- ستون سلولز DNA ۲ رشته‌ای در بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار، ۰/۱ مولار کلرید سدیم (PH=۸) و گرادیان مرحله‌ای (۰/۱-۰/۶) مولار کلرید سدیم. (I) ۰/۱ مولار، (II) ۰/۲ مولار، (III) ۰/۳ ولار، () ۰/٤ مولار، (V) ۰/۵ مولار، (VI) ۰/٦ مولار. (b)- ستون سلولز DNA تک رشته‌ای در بافر تریس ۱۰ میلی‌مولار، کلرید سدیم ۰/۱ مولار، (○- جذب نمونه‌ها در ۲۱۰ نانومتر، (●- جذب نمونه‌ها در ۲٦۰ نانومتر.



شکل شماره ۷- طرح ژل الکتروفورز ۱۰٪ پلی‌اکریلامید SDS، a- پروتئینهای LMG خالص جدا شده از ستون کروماتوگرافی تمایلی سلولز DNA ۲ رشته‌ای، b- پروتئین LMG کل ترسیب یافته با ۱۰٪ TCA c- پروتئین خالص جدا شده از ستون کروماتوگرافی تمایلی سلولز DNA تک‌رشته‌ای

بحث

در سلولهای یوکاریوتی، DNA همواره در ارتباط با یک سری پروتئینها است. این پروتئینها ممکن است نقش ساختاری، تنظیمی یا آنزیمی داشته باشند و در تشکیل ساختمان فشرده کروماتین، یا بازشدن ۲ رشته DNA و غیره موثر باشند. بدین جهت ژنوم سلولهای یوکاریوت از پیچیدگیهای خاصی برخوردار است و عوامل متعددی در کنترل و تنظیم فرایندهای سلولی دخالت دارند، یکی از عواملی که در پی از دست رفتن ساختمان فشرده کروماتین در منطقه فعال ژنوم یافته می‌شود، پروتئینهای غیرهیستونی است(۱۹). پروتئینهای غیرهیستونی کروماتین دارای چند گونه هستند و دارای ویژگی بافتی می‌باشند. آنالیز الکتروفورزی نشان می‌دهد که توزیع پروتئینهای غیرهیستونی کروماتین فعال و غیرفعال دارای تفاوتهای کمی و کیفی هستند(۲۰). همچنین گزارشهایی وجود دارند که نشان می‌دهند، تغییر در مقدار پروتئینهای غیرهیستونی

کروماتین، منجر به تغییر در فعالیت رونویسی ژن در طی تکوین و تمایز می‌گردد. در این میان خصوصیات و عملکرد پروتئینهای HMG بطور گسترده مطالعه شده است(۲۱)، اما خصوصیات و نقش پروتئینهای LMG به علت حلالیت کم و هتروژن بودن این دسته از پروتئینها، مشخص نیست. با این حال حضور گسترده این دسته از پروتئینها در سلولهای مختلف، مشخص می‌سازد که جهت عملکرد صحیح به این دسته پروتئینها نیاز می‌باشد. در این تحقیق، تهیه و تخلیص پروتئینهای LMG و آنالیز آنها روی ژل الکتروفورز و میانکنش یکی از پروتئینهای LMG با DNA بررسی شده است. با توجه به اطلاعات بسیار کمی که راجع به این دسته از پروتئینهای غیرهیستونی کروماتین(LMG) در دست می‌باشد، بین نتایج حاصل از این مطالعه و آنچه که توسط Godwin و همکارانش(۷) پیشنهاد شده بود ارتباط منطقی وجود دارد. متأسفانه پروتئینهای LMG نسبت به تجزیه توسط پروتئازهای آندوژن کروماتین و مجاورت با دمای محیط حساس می‌باشند(۸و ۱۰). بسیاری از محققین مانند Goodwin و Nicolas نیز حضور آنزیمهای پروتئولتیک فعال را در کروماتین تیموس گاوی در شرایط خنثی و قدرتهای یونی فیزیولوژیک تأیید می‌نمایند(۵)، بطوری که حتی در حضور مهارکننده‌های پروتئازی مختلف نیز کاملاً مهار نخواهند شد. لذا در این مطالعه سعی شد در تمام مراحل استخراج، تخلیص و سنجش، از مهار کننده پروتئازها استفاده شود.

نکته دیگر، حلالیت کم این پروتئینها در بافرهای معمولی است که آن را به خاصیت خود تجمعی آنها نسبت می‌دهند، برای غلبه بر این مشکل در حین مراحل استخراج آنها از کروماتین، از محلول حاوی پروتئینهای LMG استفاده شد میزان حلالیت این دسته از پروتئینها در محیط قلیایی بیشتر است که این امر نشان دهنده حضور کم اسیدهای آمینه با بار مثبت و هیدروفیل می‌باشد، لذا می‌توان انتظار داشت که حضور اسیدهای آمینه با بار منفی محسوس‌تر باشد. با توجه به طیف جذبی پروتئین LMG خالص، ماکزیمم جذب آن در ۲۳۰ و ۲۱۰ نانومتر است در حالی که جذب ۲۸۰ نانومتر بسیار ناچیز می‌باشد همچنین می‌توان انتظار داشت که میزان اسیدهای آمینه آروماتیک آن بسیار پایین باشد. استفاده از ژل فیلتراسیون G-۱۰۰ نیز نشان می‌دهد که این دسته از پروتئینها با تفاوت در وزن مولکولی همگی در یک نقطه خارج می‌شوند. پس می‌توان آن را به خاصیت خود تجمعی آنها نسبت داد. به علت میزان زیاد پروتئینهای LMG در سلولها، نقش احتمالی آنها را در تنظیم و بیان ژنها پیشنهاد می‌کنند، بر اساس این مطلب، بررسی میانکنش پروتئین LMG خالص شده با وزن مولکولی ۱۶۰ کیلودالتون می‌تواند اطلاعات مفیدی بدهد. نتایج حاصل از اسپکتروسکپی، نشان می‌دهد که پروتئین LMG با DNA میانکنش دارد. زیرا جذب ۲۱۰ و ۲۶۰ نانومتر کمپلکس DNA-LMG بیشتر از جذب DNA با همان غلظت و شرایط می‌باشد، بطوری که در این طول موجها هیپرکرومیسیتی مشاهده می‌گردد. این افزایش جذب احتمالاً ناشی از اثر بازکنندگی پروتئین روی DNA است و میزان این اثر در غلظتهای مختلف پروتئین LMG متفاوت می‌باشد. بطوری که با افزایش نسبت غلظت پروتئین /DNA میزان هیپرکرومیسیتی افزایش بیشتری می‌یابد.

نتایج کروماتوگرافی تمایلی نشان می‌دهد که پروتئین LMG خالص شده برای DNA تک رشته‌ای تمایل ضعیفی دارد در حالی که تمایل آن به DNA ۲ رشته‌ای بیشتر می‌باشد زیرا همان طور که در شکل (6b) مشاهده می‌گردد، پروتئین LMG قبل از اتصال گرادیان نمکی از ستون خارج می‌شود در حالی که در نوع ۲ رشته‌ای بعد از برقراری گرادیان دوم (۰/۵-۰/۴ مولار) نمکی کلرید سدیم از ستون خارج شده است. با اینکه این نتایج احتمال اتصال این پروتئین به DNA را بوضوح نشان می‌دهد اما اختصاصی بودن اتصال را بطور قطعی نشان نخواهد داد. در سال ۱۹۹۳ Wiland و همکارانش نیز نشان دادند که برخی از LMGهای حاصل از سلولهای کارسینومای پانکراس با قطعه بخصوصی از DNA میانکنش می‌دهد(۱۲).

Teny و همکارانش(۲۲) نشان دادند که بعضی از فسفوپروتئینهای هسته‌ای با DNA کمپلکس می‌دهند که

منجر به افزایش ۹۰-۷۸٪ فعالیت رونویسی می‌گردد. Wiland و همکارانش در سال ۱۹۹۰ از کبد موش، پروتئینی با وزن مولکولی ۱۶۰ کیلودالتون را با استفاده از روش Immuno affinity جداسازی کردند(۱۱). برای دانستن اینکه این ۲ پروتئین مشابه می‌باشند یا نه، نیاز به بررسی اسیدهای آمینه آنها دارد. از طرفی مطالعه‌ای روی اتصال آن به DNA صورت نگرفته است. مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است تا بتوان نقش دقیق این پروتئین را در کروماتین مشخص نمود. همچنین ویژگی اتصال به DNA یا سایر ترکیبات کروماتین بخصوص هیستونها از مواردی است که باید مورد بررسی قرار گیرند. از آنجا که پروتئینهای متصل شونده به DNA دارای موتیف‌های خاص مثل Zinc finger یا Leucin Zipper و غیره هستند، مطالعات بیشتری لازم است که نشان دهد آیا پروتئین LMG نیز دارای چنین موتیف‌هایی هست یا نه که باید در مطالعات بعدی مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

1- Pearson EC., Butler PJ., Thomas JO., Higher-order structuer of nucleosome oligomers from short-reapt chromatin, EMBO J 1983., 2(8): 1367-72, 887.

2- Hayes JJ., Hansen JC., Nucleosomes and the chromatin fiber, Curr Opin genet Dev., 2001, 11(2): 124-9.

3- Durand Todish H, Baltimore D., Molecular Cell biology., 3 rd ed., Inc New York, Scientific American book, 1986, PP: 183-188.

4- Wolfe AP., Guschin D., Chromatin structural features and targets that regulat transcription, J. Struc Biol, 2000, 129(2-3): 102-22. 43q.

5- Clark B.F.C. Towards a total human protein map, Nature, 1981, 292(5823): 491-492.

6- Michiteru YOSHIDA., Yoshihiro OHTAKI., Takasashi FUJITA., et al. Sequential Grouping of chromosomal protein from Pig Thymus, J Biochem 1980, 88: 425-436.

7- Goodwin GH., Johns EW., Isolation and characterization of two calf thymus chromatin nonhistone proteins with high contents of acidic and basic amino acids, Eur. J. Biochem 1973, 40:215-219.

8- Jean pierrer Durand, Francoise, Jucques Pier, et al., condition for the extraction of protease-free LMG proteins from calf thymus, Biochemistry International, 1990, 22(5): 929-938.

9- Prestayko AW., Crane PM., Bush H., Phosphorylation and DNA binding of nuclear rat liver protein soluble at low inonic strength, biochemistry, 176, 15: 315-320.

10- Ewa Wiland, Antoni Horst. Changes of low mobility group (LMG) proteins of spleen cells in rats immunized with lipopolisaccharides from E.col, Bull.pol.Acad.Sci. 1984, 32(12): 15-19.

11- Ewa Wiland, Barbara. Siemieniako, Wesiaw H. Binding of low mibility group protein from rat liver chromatin with histoes studied by chemical cross-linking. Biochemical and Biophysical Research Communication, 1990, 166(1): 11-21.

12- Ewa Wiland, Barbara Siemieniako, Wieslaw H., Trzeciak, Binding of low mobility Group proteins with DNA examined in homologous system by Gel Retardation Assay, Cell biology International,1993, 17(1):PP: 45-53.

13- Quesada P., Farina B., Leone E., Purification of nonhistone acceptor protein for ADP-ribose from mouse testis nucleus, Biochem. J., 1984,221:223-233.

14- Durnell JP., Buchonnean M., Pierri J., Non-Denaturing Electrophretic and chromatoraphic characterization of low mobility group (LMG) nonhistone chromatin proteins from calf thymus, Biochemistry International, 1985, 10(5): 705-803.

15- Lowry EF., Hartree. Determination of protein a modification of the lowry method that gives a linear photometric response, Analytical biochemistry, 1972, 48: 422-427.

16- Laemmli Uk., Cleavage of structural of protein during the assembly of bacteriophage T_4, Nature, 1970, 277: 680-685.

17- Hartley BS., Strategy and Tactic in protein chemistry, Biochem. J. 1970, 119: 805-822.

18- Bruce and Albert Clenn Herrick. DNA-Cellulose chromatography, Methods of Enzymology, 1971, 21: 199-217.

19- Reeves R., Structure and function of the HMG1(Y) family of architectural transcription factors, Environ Health Perspect; 2000; 108 Suppl 5: 83-9.

20- Murphy FV. Churchill ME., Nonsequence-specific DNA., recognition: a structural perspective, Strcture Fold Des, 2000, 15, 8(4): PP: 83-9.

21- Liu F., Chau KY., Arlotta P., et al., The HMG 1 proteins: dynamicroles in gene activation, development, and tumorgenesis, Immunol Res, 2001, 24(1): 13-29.

22- Teny CS., Teny CT., Allfrey VG., Studies of nuclear acidic proteins, Evidence for their phosphorylation, tissue specificity, selective binding to deoxyribonucleic and stimulation effects on transcription J Biool Chem, 1971, 246: 3597-3609.

ISOLATION OF A FRACTION OF PROTEIN FROM RAT LIVER AND ITS INTERACTION WITH DNA

A. Rabani Chadegani, Ph.D [I] **S. Falah, Msc* [II]

ABSTRACT

In eukaryote cells, DNA is complexed with a series of basic proteins making units of chromatin structure named nucleosomes. In addition, nonhistone proteins with different function are the components of chromatin. Among these proteins, a group with a low mobility on gel electrophoresis have been identified and named LMG. In this study a LMG protein with a molecular weigh of 160 kd. Was isolated from rat liver by preparative gel electrophoresis and electroelution techniques. The interaction of this protein with DNA was investigated using uv/vis spectroscopy and single and double stranded DNA-cellulose affinity chromatography. The results show that the binding of purified LMG protein to DNA increased absorbance of DNA at 210 and 260 nm. The affinity of LMG to double stranded DNA was higher than single stranded DNA. From the results presented above, it is concluded that LMG is a possibly regulatory protein in which by its interaction unwinds DNA molecule and may participate in some DNA functions such as transcription and replication.

Key Words: 1) Chromatin 2) Nonhistone proteins 3) Intraction

This article is the summary of the thesis of PhD of S.Falah under supervision of A.Rabani, Ph.D, 2001.
I) *Ph.D, Professor of biochemistry-Biophysic, Reaserch center of Tehran University, Tehran, Iran.*
II) *Instructor of Iran University of Medical Sciences and Health Services, Tehran, Iran(*Corresponding author)*