

بررسی تمایل اتصال داروی ضد سرطان وینکریستین به پروتئین های هیستونی

کروماتین با استفاده از روشهای اسپکتروسکوپی

آزاده محمدقلی^{۱*}، عذرا ربانی چادگانی^۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۵

چکیده

وینکریستین داروی ضد سرطانی از خانواده وینکالکالوئید ها است که در درمان بسیاری از سرطان ها کاربرد دارد. کروماتین از واحد های نوکلئوزومی که ترکیبی از DNA و پروتئین های هیستونی است تشکیل یافته است. مطالعات قبلی نشان داده است که وینکریستین تمایل اتصال قوی به ترکیب نوکلئوپروتئینی کروماتین دارد تا DNA که نقش پروتئین های هیستونی را در این فرآیند روشن میسازد. لذا در این تحقیق تاثیر داروی وینکریستین بر پروتئین های هیستونی کروماتین در محلول با استفاده از روشهای مختلف اسپکتروسکوپی مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که اتصال دارو به کروماتین موجب خاموشی کروموفور های مربوط به آمینواسیدهای حلقوی هیستون ها میشود. اتصال دارو به هیستون های H1 بسیار قویتر از اتصال آن به هیستون های Core بوده بطوریکه ثابت اشترن ولمر و EC₅₀ نیز آنرا تأیید مینماید طیف هیستون H1 دارای یک پیک منفی در طول موج ۱۹۸ نانومتر بوده که مربوط به پیچه های نامنظم در ساختار پروتئین است. طیف هیستون Core دارای یک پیک منفی در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر می باشد که مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار پروتئین ها است که با افزایش غلظت دارو به شدت پیک منفی در هیستون H1 و Core اضافه می شود. همچنین کاهش جذب در طول موج ۲۱۰ نانومتر در هیستون H1 به صورت الگوی وابسته به غلظت می باشد. نتایج حاکی از اتصال قوی تر داروی وینکریستین به هیستون H1 نسبت به Core است که میتواند بدلیل اینکه در بخش رابط قرار دارد بیشتر در دسترس باشد.

واژه های کلیدی: کروماتین، هیستون H1، هیستونهای Core، وینکریستین، اسپکتروسکوپی

مقدمه

خانواده دارویی وینکالکالوئید دارای ترکیبات ضد توموری قوی هستند که از منابع طبیعی گرفته می شوند. در قرن هفدهم وینبلاستین و وینکریستین دو داروی طبیعی این خانواده از برگهای گیاه periwinkle از خانواده پرپوش (*Cathartus roseus*)

۱- گروه بیوشیمی، مرکز تحقیقات بیوشیمی و بیوفیزیک، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

* (نویسنده مسئول: عذرا ربانی چادگانی (arabbani@ut.ac.ir))

۲- گروه زیست شناسی، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

استخراج و مشخص شد دارای خواص ضد توموری و ضد میکروبی هستند (Sen and Maiti 1994; Chen et al, 2005).

ساختار شیمیایی گروه دارویی وینکا آلکالوئید دارای دو ساختار چند حلقه ای ویندولین و کاتارانتین می باشد. وینکا آلکالوئیدها ترکیباتی ضد سرطانی هستند که سبب بر هم خوردن میکروتوبولهای دوک میتوزی می شوند (Dumontet and Jordan, 2010; Shati and Elsaid, 2018; Jutras et al, 2018). در سال ۲۰۰۳ گروه Tang و همکاران با کمک بررسی میکروسکوپی بر روی سلول دیپلوئیدی هپاتوسیت موشی نشان دادند که اتصال وینکریستین به DNA سلولی موجب جا به جایی باز های DNA می شود (Tang et al, 2003). بسیاری از داروهای ضد سرطان دارای حلقه اندولی هستند که از طریق اتصال با شیار کوچک و یا وارد شدن بین جفت بازهای DNA عمل می کنند (Kumar et al, 2012). وینکریستین و وینبلاستین از طریق میانکنش با DNA دو رشته ای عملکرد خود را انجام می دهند (Gupta et al, 2011). هنگامی که DNA پلاسمید pBSK همراه با وینکریستین بر روی ژل آگارز قرار گرفت مشاهده شد که با افزایش غلظت وینکریستین میزان اتصال نیز افزایش مییابد. بدین ترتیب این یافته ها نشان می دهند که آلکالوئیدها اتصال خود به DNA را از طریق قرار گیری بین جفت بازها انجام می دهند (Kumar et al, 2012). میانکنش داروی وینکریستین با پلاسمید pET28 سبب تبدیل فرم خطی دارو به فرم لوپ مانند شده به طوریکه با افزایش غلظت دارو DNA به قطعات کوچکی تبدیل می شود (Zhu et al, 2004). اتصال DNA با وینکریستین توسط اسپکتروسکوپی infrared نیز بررسی شده و نشان می دهد که میانکنش بین DNA و وینکریستین از طریق جفت بازهای گوانین و سیتوزین انجام می شود. همچنین اتصال بین وینکریستین با فسفات اسکلت DNA نیز مشاهده شده است. مطالعات اسپکترسکوپی UV/Vis نشان داده است که اتصال DNA با وینکریستین سبب جابه جایی های کرومیک شده که نشان دهنده اینتر کاله شدن وینکریستین به داخل DNA دو رشته ای است (Tyagi et al, 2010).

کروماتین یک ترکیب نوکلئوپروتئینی متشکل از DNA و پروتئین های بسیار قلیایی به نام هیستون (Histone) است که شامل پنج نوع اصلی H1، H2A، H2B، H3، H4 می باشند. کروماتین از واحدهای تکرار شونده نوکلئوزومی ساخته شده است. هر نوکلئوزوم شامل اکتامر هیستونی، DNA و هیستون رابط همراه با H1 می باشد (Ordu et al, 2016; Cutter and Hayes, 2017). اکتامر هیستونی شامل دو دایمر H2B-H2A و یک تترامر H3-H4 و DNA که ۱/۷ دور حول اکتامر پیچ می خورد. هیستون H1 که به DNA رابط اتصال دارد سبب فشرده شدن نوکلئوزوم ها و ایجاد ساختارهای بالاتر کروماتین میگردد (Kowalski 2016; Rapkin et al, 2012; Bradbury et al, 2004). هیستونهای ناحیه اکتامری به هیستونهای Core معروفند. این هیستونها وزن مولکولی بین ۱۱ الی ۱۶ کیلو دالتون داشته، بسیار قلیایی بوده بطوریکه حاوی بیش از ۲۰ درصد از آمینواسیدهای لیزین و آرژنین هستند (Luger et al, 2012). از انجایی که در سلول ساختار کروماتین اساسا از DNA و پروتئین های هیستونی ساخته شده است بنابراین کروماتین موجود در هسته می تواند به عنوان جایگاه هدف برای اتصال این دارو باشد. در مطالعات قبلی ما نشان داده شده که وینکریستین نه تنها با DNA بلکه با ترکیب نوکلئوپروتئینی کروماتین تمایل اتصال دارد و حتی

اتصال به کروماتین بسیار قوی تر از اتصال به DNA است (Mohammadgholi et al, 2013). اتصال قویتر دارو به کروماتین میتواند ناشی از درگیر شدن دارو با پروتئین های هیستونی باشد. لذا در این تحقیق تمایل اتصال این دارو به پروتئین های هیستونی کروماتین H1 و Core، مورد بررسی قرار گرفته است تا بتوان اطلاعات بهتری در خصوص مکانیسم عمل این دارو در سلول بدست آورد که میتواند در طراحی داروهای ضد سرطان مفید باشد.

مواد و روش ها

داروی وینکریستین سولفات از هلال احمر ایران خریداری و در دمای ۴ درجه سانتیگراد و در تاریکی نگهداری شد. دارو قبل از استفاده در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ رقیق گردید. پروتئین های هیستونی H1 و Core از بافت تیموس گوساله مطابق روش Johns (1964) استخراج و تخلیص شده و خلوص آنها با استفاده از ژل SDS و وسترن بلات در مقابل آنتی بادی های ضد H1 و Core تعیین گردید. پروتئین های خالص شده در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ و محلول ذخیره یک میلی گرم در میلی لیتر از آنها تهیه شد.

تهیه کروماتین محلول

برای تهیه کروماتین محلول، هسته ها با روش برگن و همکارانش از کبد موش های صحرایی نر نژاد ویستار (vistar) تهیه شدند (Burgoyne et al, 1970). هسته های خالص شده در مقدار مناسبی از بافر هضم به صورت سوسپانسیون در آورده شد و مقدار DNA با استفاده از میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر تعیین شد. پس از تعیین غلظت، با استفاده از بافر هضم شامل ۰/۱ مولار کلرید پتاسیم، ۵۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7.2$ و ۱ میلی مولار کلرید کلسیم، محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه تهیه و محلول حاصل به مدت ۵-۳ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس به ازای هر میلی گرم از DNA، ۴ واحد آنزیم میکروکوکال نوکلئاز (Sigma) به نمونه اضافه گردید و نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پس از تمام زمان نمونه ها فوراً نمونه به روی یخ منتقل و با استفاده از محلول ۱۰۰ میلی مولار EDTA، محلول ۱۰ میلی مولار EDTA از نمونه تهیه گردید. سپس نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در ۵۰۰۰ و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفوژ شد. رسوب در مقدار مشخصی از محلول ۰/۲۵ میلی مولار EDTA به صورت سوسپانسیون در آورده شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد مخلوط شد و سپس به مدت ۵-۴ دقیقه در ۱۰۰۰۰ در همین دما سانتریفوژ گردید. در نهایت محلول رویی حاصل یا همان کروماتین محلول به یک ظرف استریل منتقل و برای انجام آزمایش های مختلف ذخیره گردید (Rabbani et al, 1999).

اسپکتروسکوپی UV-Vis

پروتئین های هیستونی H1 و مرکزی بطور جداگانه با غلظت ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه (ابتدا زمان های مختلف بکار برده شد و مشخص گردید ۶۰ دقیقه کافی است) و سپس مطالعات اسپکتروسکوپی UV-Vis انجام شد. میزان جذب حاصل از میانگینش داروی وینکریستین و هیستونها در طول موج ۲۱۰ نانومتر با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-210, Shimadzu (Japan) ثبت شد. همچنین میزان جذب نمونه های استاندارد دارو در طول موج ذکر شده نیز ثبت و از نمونه های تیمار شده با دارو کسر گردید.

اسپکتروسکوپی فلورسانس

محلول کروماتین در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl تهیه و میانگینش آن با داروی وینکریستین در دمای اتاق و به دور از نور انجام گرفت. به منظور مطالعات فلورسانس غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر از کروماتین استفاده شد. محلول حاصل از میانگینش کروماتین با داروی وینکریستین در طول موج ۲۷۸ نانومتر که مربوط به آمینو اسید های حلقوی پروتئین است، تهییج و طیف نشر فلورسانس آنها در محدوده ۳۵۰-۲۹۰ نانومتر با استفاده از دستگاه فلورسانس (Cary Eclipse, Varian, Australia) رسم شد. همچنین طیف نشر فلورسانس نمونه های استاندارد دارو در محدوده ذکر شده نیز رسم گردید و از نمونه کروماتین با دارو کسر گردید.

پروتئین های هیستونی (H1 و مرکزی بطور جداگانه) با غلظت ۲۵ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. نمونه های تیمار شده با دارو و کنترل در طول موج ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف نشر فلورسانس آنها در محدوده ۳۵۰-۲۹۰ نانومتر رسم شد. در طول انجام آزمایشات از کوت کوارتز با عرض یک سانتی متر استفاده شد. شدت نشر فلورسانس نمونه های دارو از کمپلکس پروتئین های هیستونی و دارو کسر شد. پس از انجام محاسبات و کسراتر خاموشی احتمالی دارو، منحنی های $I_0/I \times 100$ بر علیه غلظت های مختلف دارو رسم گردید بطوریکه I_0 و I به ترتیب شدت نشر فلورسانس پروتئین ها در غیاب و حضور غلظت مورد نظر دارو است. همچنین نمودار استرن-ولمر که نشان دهنده اثر خاموش کنندگی فلورسانس وینکریستین است نیز رسم شد. معادله استرن-ولمر به صورت $I_0/I = 1 + K_{sq}[Q]$ نمایش داده می شود که در آن I_0 و I به ترتیب شدت فلورسانس در غیاب و حضور غلظت مورد نظر دارو، K_{sq} ثابت خاموش کنندگی فلورسانس و $[Q]$ غلظت دارو به عنوان خاموش کننده می باشد (Gentili et al, 2008).

اسپکتروسکوپی CD

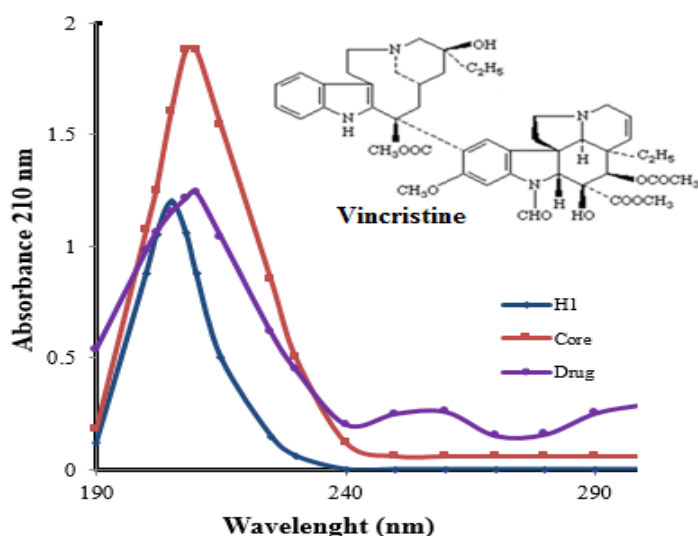
پروتئین های هیستونی با غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در حضور غلظت های مختلف دارو در بافر ۱۰ میلی مولار

Tris-HCl با $\text{pH} = 7/2$ به مدت ۴۵ دقیقه انکوبه شدند. محلول حاصل از میانکنش برای مطالعه تغییرات ساختارهای دوم استفاده گردید. مطالعه CD در ناحیه ۱۹۰ تا ۲۶۰ نانومتر (Far-UV) با استفاده از کورت کوارتز با عرض یک سانتی متر و تحت جریان مداوم گاز ازت و دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با کمک دستگاه CD (AVIV 215, USA) انجام شد. طیف نمونه ها از طیف نمونه های استاندارد دارو که در شرایط یکسان رسم گردید کسر و داده ها تحت عنوان θ (molar ellipticity) گزارش شد.

نتایج

جهت بررسی های اسپکتروسکوپی ابتدا لازم بود طیف جذبی پروتئین های H1 و مرکزی وهمچنین دارو رسم شود. همان طور که در شکل ۱ مشاهده می شود این پروتئین ها دارای یک قله جذبی در محدوده طول موجهای ۱۹۰-۲۳۰ نانومتر می باشند. داروی وینکریستین نیز دارای یک قله جذبی بلند در ۲۱۰ نانومتر و یک قله جذبی کوتاه در ناحیه ۲۹۵ و ۲۶۰ نانومتر می باشد.

همچنین فرمول شیمیائی وینکریستین نیز در شکل نشان داده شده است.



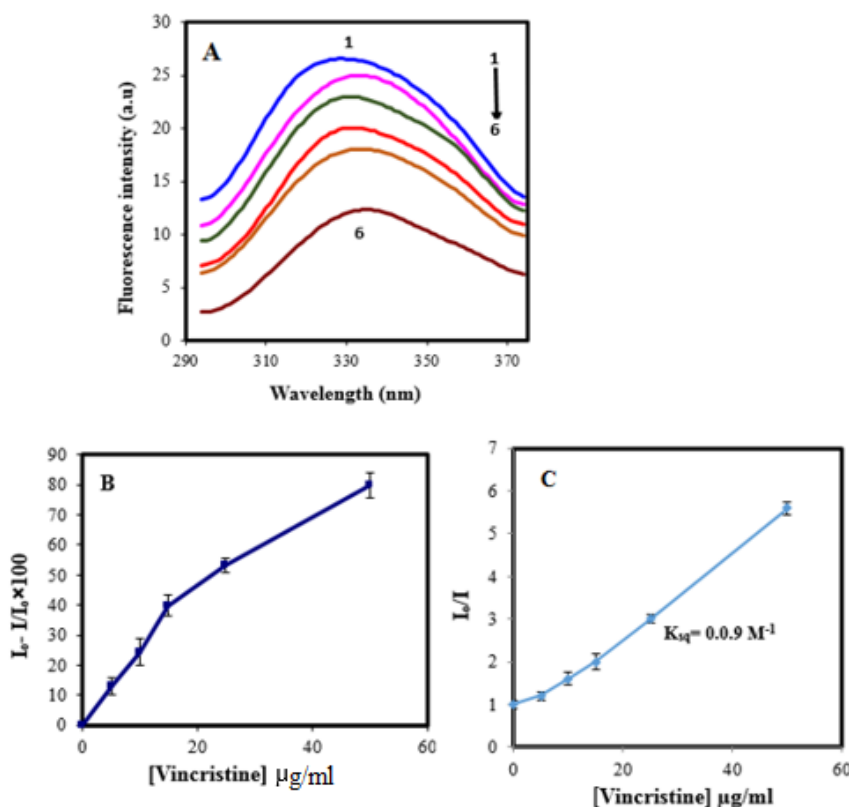
شکل ۱: ساختار شیمیائی، طیف جذبی داروی وینکریستین و طیف جذبی پروتئین های هیستونی H1 و Core بین ۱۹۰ تا ۲۹۰ نانومتر در محلول ۱۰ میلی مولار $\text{pH} = 7/2$ Tris-HCl.

بررسی اتصال دارو از طریق فلورسانس

اسپکتروسکوپی فلورسانس یک روش کارآمد در مطالعه لیگاند به بیوماکرومولکول هاست. بدین منظور نمونه های تیمار شده با دارو و کنترل در طول موج ۲۷۸ نانومتر تهییج و طیف تفاضلی آنها در محدوده ۲۹۰-۳۵۵ نانومتر رسم گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می شود کروماتین (شکل ۲A) دارای یک قله نشی در ۳۳۰ نانومتر است که مربوط به آمینو اسیدهای

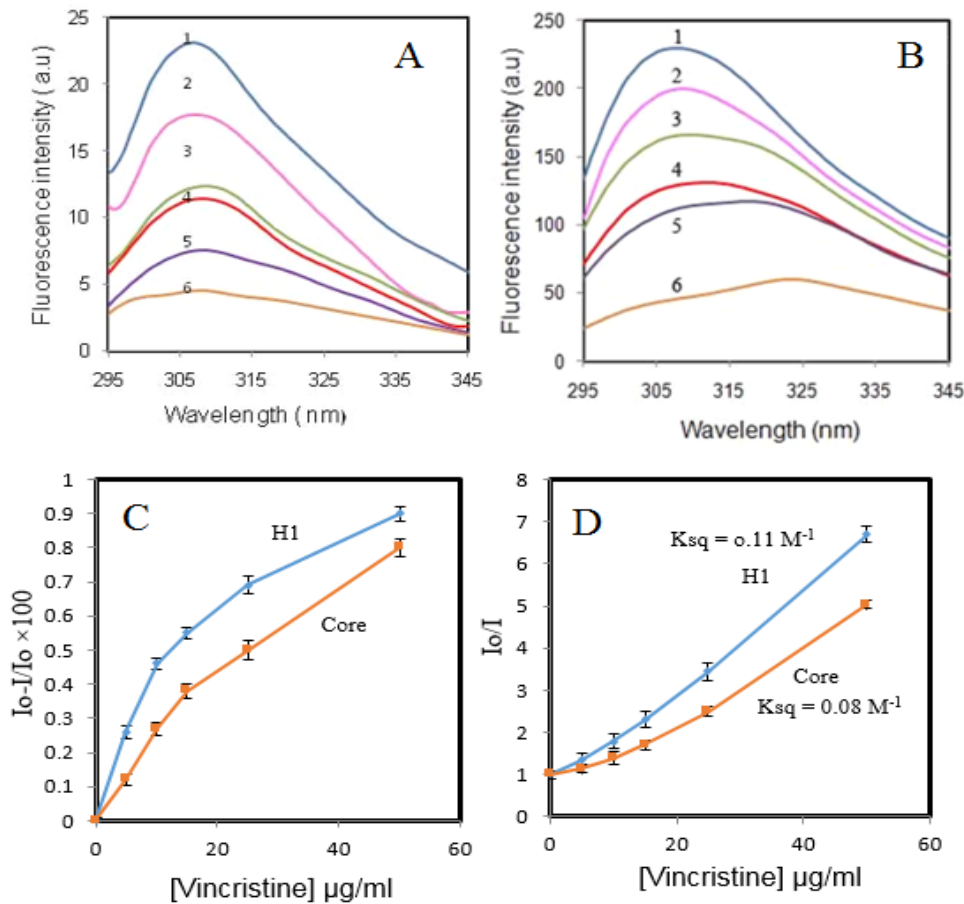
حلقوی در ساختار پروتئین های هیستونی می باشد. وینکریستین به صورت وابسته به غلظت، بدون آنکه در طیف کروماتین جابجایی ایجاد نماید موجب کاهش فلورسانس یا در واقع خاموشی فلورسانس کروماتین می گردد. شکل B

۲ تغییرات شدت فلورسانس به صورت $I_0/I \times 100$ برای کروماتین در غیاب و حضور غلظت های مختلف دارو نمایش داده شده است. این شکل به خوبی نمایانگر آن است که تمایل اتصال دارو تا غلظت ۱۲ میکروگرم در میلی لیتر با شیب تند و سریع است و پس از آن روند تا حدودی کند می گردد. شکل C نمودار استرن-ولمر که نشان دهنده اثر خاموش کنندگی لیگاند وینکریستین است ارائه شده است. معادله استرن-ولمر به صورت $I_0/I = 1 + K_{sq}[Q]$ نمایش داده می شود که در آن غلظت I_0 و I به ترتیب شدت نشر فلورسانس در غیاب و در حضور غلظت مورد نظر دارو، K_{sq} ثابت خاموش کنندگی فلورسانس و $[Q]$ غلظت خاموش کننده می باشد. در واقع ثابت استرن-ولمر K_{sq} بیان کننده حساسیت یک فلوئورفور نسبت به خاموش کننده می باشد. برای رسم نمودار استرن-ولمر مقادیر I_0/I محاسبه و سپس تغییرات I_0/I نسبت به غلظت خاموش کننده یا همان وینکریستین رسم گردید. شیب این نمودار در واقع K_{sq} است که به صورت مولار بیان می شود. K_{sq} برای کروماتین 0.09 می باشد.



شکل ۲: (A) تغییرات طیف نشری کروماتین پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف داروی وینکریستین شماره ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین. I_0/I (B) $I_0/I \times 100$ کروماتین در غلظت های مختلف دارو و (C) نمودار استرن ولمر کروماتین.

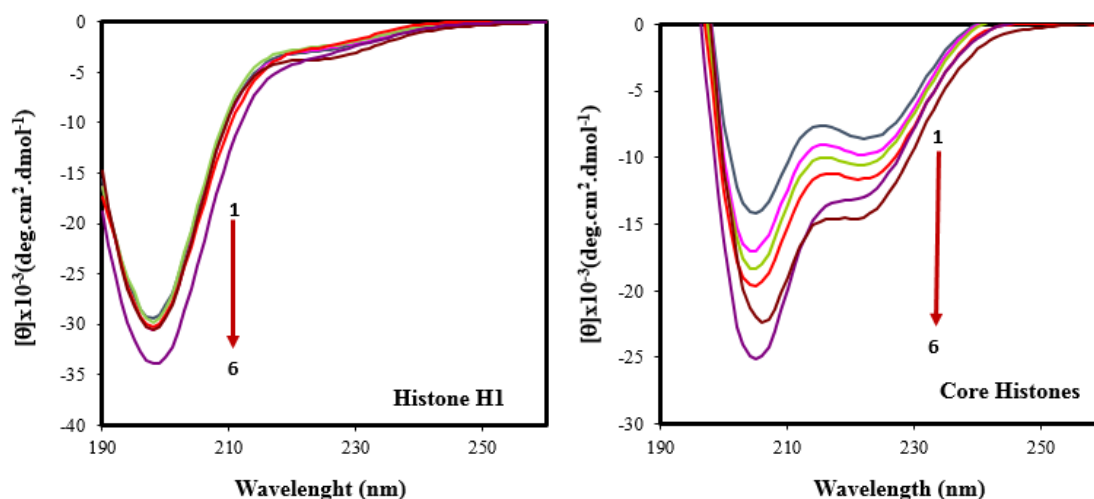
تغییرات شدت نشر فلورسانس کروماتین نشان دهنده این است که پروتئین های کروماتین در اتصال دارو به کروماتین دخالت دارند. بدین سبب میانکنش دارو با پروتئین های H1 و Core در محلول با استفاده از روش فلورسانس مورد بررسی قرار گرفت. هیستون های H1 (شکل ۳ A) و Core (۳ B) دارای یک قله منفرد در ۳۰۵ یا ۳۰۶ نانومتر می باشد که به آمینواسیدهای تیروزین موجود در ناحیه مرکزی این پروتئین ها مربوط است. وینکریستین به صورت وابسته به غلظت ، بدون آنکه در طیف H1 و Core جایی ایجاد نماید و موجب کاهش فلورسانس یا در واقع خاموشی فلورسانس H1 و Core می گردد. شکل ۳ C تغییرات شدت فلورسانس به صورت $I_0-I/I_0 \times 100$ و شکل ۳D. نیز نمودار استرن-ولمر را برای پروتئینهای هیستونی نمایش میدهد . بطوریکه مشاهده میشود برای هر دو پروتئین، تمایل اتصال دارو در غلظت های پائین دارو با شیب تند همراه بوده و سپس در غلظت های بالای دارو کند میشود که نشان دهنده اشباع شدن است جایگاه های اتصال است. همچنین K_{sq} برای هیستون H1 و Core به ترتیب ۰/۱۱ و ۰/۰۸ می باشد که نشان دهنده خاموش کنندگی قویتر دارو با H1 است.



شکل ۳: تغییرات نشر فلورسانس H1 (A) و Core (B) پس از انکوباسیون با غلظت های مختلف داروی وینکریستین. شماره ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین. (C) $I_0-I/I_0 \times 100$ و (D) نمودار استرن ولمر برای هیستون H1 و Core در غلظت های مختلف دارو میباشد.

بررسی اتصال دارو به هیستون های H1 و Core با استفاده از روش های اسپکتروسکوپی CD و UV

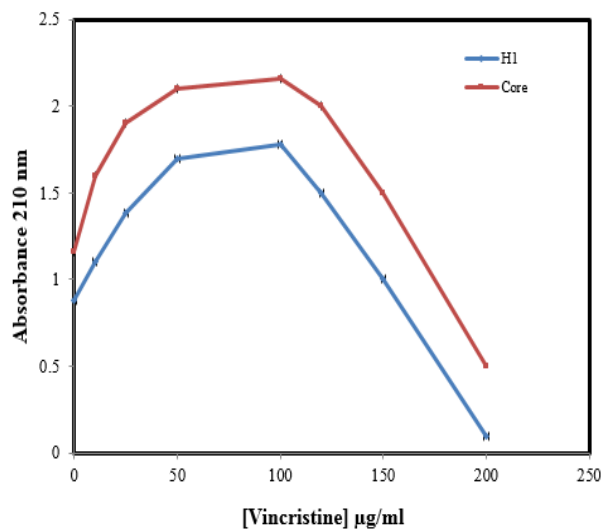
روش دو رنگ نمایی حلقوی (CD) یک روش بسیار ارزشمند برای بررسی ساختارهای ثانویه پروتئین ها است. با توجه به اینکه پیوندهای موجود در ساختار پروتئین ها در ناحیه Far-UV جذب دارند طیف CD ثبت شده در این ناحیه اطلاعات مفیدی را در زمینه ویژگی های ساختار ثانویه پروتئین ها نظیر مارپیچ آلفا و صفحات بتا فراهم می آورد. اتصال یک لیگاند به یک مولکول پروتئین می تواند از طریق ایجاد تغییرات در ساختار دوم پروتئین موجب ایجاد تغییرات مشخصی در طیف CD پروتئین گردد. بنابراین استفاده از دو رنگ نمایی حلقوی (CD) به منظور بررسی تغییرات ایجاد شده در ساختار دوم پروتئین هادر نتیجه اتصال به لیگاند بسیار مرسوم است (Kelly and Price, 2000). همانطور که در شکل ۴ مشاهده می شود، طیف CD هیستون H1 دارای یک ناحیه منفی در طول موج ۱۹۸ نانومتر می باشد که مربوط به پیچ های نامنظم در ساختار پروتئین می باشد. شدت ناحیه منفی در این پروتئین در حضور غلظت های مختلف تغییر چندانی نمی کند ولیکن در غلظت های بالاتر مقدار آن منفی تر میشود. طیف هیستون Core دارای ناحیه منفی در طول موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر می باشد میزان تغییرات با θ نمایش داده می شود که در دو محدوده مثبت و منفی متغیر بوده و مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار است (Clark et al, 1988., Bradbury et al, 1975). با افزایش غلظت وینکریستین ناحیه منفی در موج های ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر به شدت منفی تر می شود.



شکل ۴: طیف CD هیستون H1 (A) و Core (B) در حضور غلظت های مختلف داروی وینکریستین در محدوده Far-UV شماره های ۱ الی ۶ به ترتیب غلظت های ۰، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ میلی گرم در میلی لیتر داروی وینکریستین

بمنظور بررسی تغییرات جذب UV هیستون ها در حضور دارو، غلظت معینی از پروتئین H1 و Core باغلظت های مختلف دارو انکوبه و جذب نمونه ها در ناحیه ۲۱۰ نانومتر ثبت گردید. شکل ۵ تغییرات میزان جذب تفاضلی حاصل از میانکنش پروتئین H1 و Core با داروی وینکریستین را نشان می دهد. بطوریکه مشاهده می شود تا غلظت ۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر

میزان جذب به شدت افزایش مییابد و با افزایش غلظت داروکاهش چشمگیری در جذب کمپلکس H1 و دارو حاصل میشود. بنابراین می توان نتیجه گرفت در غلظت های پائین تر از ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر داروی وینکریستین تا حد زیادی سبب باز شدن پروتئین H1 شده و در حضور غلظت بالاتر دارو، پروتئین تا حدی فشرده می شود. این کاهش برای داروی وینکریستین به گونه ای است که میزان جذب H1 در نمونه کنترل (بدون دارو) ۰/۸۸ بوده که در حضور دارو تا حد ۱/۸ افزایش و سپس کاهش مییابد در صورتی که میزان جذب Core در نمونه کنترل (بدون دارو) ۱/۱۶ بوده که در حضور دارو به ۲/۳ افزایش و سپس به ۰/۱ کاهش مییابد.



شکل ۵: تغییرات میزان جذب پروتئین H1 و Core در طول موج ۲۱۰ نانومتر حاصل از میانگینش با داروی وینکریستین

بحث

کروماتین بعنوان یک ترکیب نوکلئوپروتئینی متشکل از DNA و پروتئین های هیستونی در هسته سلول، امروزه یکی از اهداف اصلی داروهای ضد سرطان می باشند و تا کنون اتصال برخی از داروها به کروماتین و هیستون ها مورد بررسی قرار گرفته است (Chaires et al. 1983; Rabbani et al, 2004a,b). مطالعات قبلی نشان میدهد که وینکریستین به DNA و کروماتین متصل می شود ولی تمایل اتصال به کروماتین بیشتر از DNA است (Mohammadgholi et al, 2013). لذا چنین بنظر رسید که احتمالاً ترکیبات هیستونی کروماتین در این اتصال نقش داشته باشند این رفتار با اتصال آنتراسایکلین ها به DNA و کروماتین کاملاً متفاوت است زیرا این داروها تمایل بیشتری به DNA نسبت به کروماتین دارند (Rabbani et al, 2004b; Rabbani et al, 1999). اما این رفتار مشابه با اثر داروی میتوزانترون است که تمایل بیشتری برای اتصال به کروماتین از خود نشان می دهد

(Hajihassan et al, 2011). بدین منظور در این مطالعه اثر دارو بر روی پروتئین های هیستونی H1 , Core در محلول مورد بررسی قرار گرفت و نتایج حاکی از تمایل اتصال دارو به این پروتئین ها خصوصا هیستون H1 است.

تغییرات جذب در ۲۱۰ نانومتر هیستون ها در حضور وینکریستین وابسته به غلظت دارو بوده و بالا رفتن جذب در غلظت های پائین نشان دهنده نفوذ حلقه های دارو به درون بخش گلوبولار پروتئین شده و موجب باز شدگی یا شل شدن در ساختار میشود ولی در غلظت های بالا فشرده گی در ملکول ایجاد شده و باعث میشود تا جذب کاهش یابد. این تغییر با شدت کمتر در اتصال دانوماپسین به هیستون ها نیز مشاهده شده است (Rabbani et al, 2004b).

کاهش شدت نشر فلورسانس ، بررسی قدرت اتصال با کمک I_0-I/I_0 و همچنین ضریب استرن ولمر نشان دهنده خاموشی کروموفورهای هیستون ها با دارو می باشد به طوریکه وینکریستین تمایل بالاتری به H1 نسبت به Core دارد طیف نشری ساطع شده از پروتئین های هیستونی H1 و Core دارای یک قله منفرد در ۳۰۵ یا ۳۰۶ نانومتر می باشد که به آمینواسید های حلقوی خصوصا تیروزین موجود در ناحیه مرکزی این پروتئین ها مربوط است (Cowgill et al 1976). هیستون H1 محتوی یک تیروزین (تیروزین ۷۲) است که در قسمت هیدروفوب پروتئین می باشد (Jordano et al, 1983) هیستونهای مرکزی حاوی تیروزین های بیشتری هستند بطوریکه هیستون H3 و H4 دو تیروزین و هیستون H2A و H2B دارای ۴-۳ تیروزین هستند که این آمینواسیدهای آروماتیک بیشتر در ناحیه هیدروفوب یا ناحیه گلوبولار هیستونها قرار گرفته اند (Isenberg et al, 1979) کاهش نشر فلورسانس و بررسی قدرت اتصال (EC_{50}) با کمک I_0-I/I_0 و همچنین ضریب استرن- ولمر نشان دهنده خاموشی اسید آمینه تیروزین می باشد به طوریکه وینکریستین تمایل بالاتری به هیستون H1 نسبت به Core دارد تخمین EC_{50} دارو برای H1 برابر ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر و برای Core مساوی ۱۸ میکروگرم در میلی لیتر است. این رفتار مشابه با اثر داروی میتوزانترون است که تمایل بیشتری برای اتصال به هیستون H1 دارد (Rabbani et al, 1999).

مطالعات اسپکتروسکوپی CD به منظور بررسی ساختار دوم پروتئین های H1 و Core در اتصال با دارو نشان می دهد که در حضور دارو بر شدت پیک منفی هیستون H1 در ناحیه ۱۹۸ نانومتر افزوده می شود و از آنجا که این پیک مربوط به پیچ های نامنظم در ساختار پروتئین می باشد (Clark et al, 1988; Bradbury et al, 1975) تغییرات خصوصا ر غلظت های پائین بسیار کم است که مشابه میانکنش هیستون H1 با داروهای دانوماپسین و آدریامایسین نشان داده است که اثر کمی بر روی ساختار دوم پروتئین H1 دارند (Rabbani et al, 2004a,b) است. بررسی های انجام شده بر روی هیستونهای Core نیز نشان دهنده افزایش پیک منفی در طول موجهای ۲۰۸ و ۲۲۲ نانومتر که مربوط به مارپیچ های آلفا در ساختار این پروتئین ها بوده و این امر نشان دهنده تغییر ساختار دوم پروتئین های مرکزی و افزایش ساختارهای آلفا هلیکس در آنها می باشد.

بطور کلی از نتایج فوق چنین بنظر میرسد که داروی وینکریستین که یک وینکا آلکالوئید است ، با پروتئین های هیستونی نیز میانکنش دارد و ترجیحا بخش آب گریز یا گلوبولار آنها را هدف قرار میدهد. تمایل بیشتر دارو به هیستون H1

میتواند باین دلیل باشد که این پروتئین نسبت به سایر هیستون ها در معرض محیط اطراف است. هیستون های Core با هم اکتامر هیستونی را میسازند که بوسیله DNA پوشیده شده و دسترسی به محیط اطراف محدود میگردد.

تشکر

منبع مالی معاونت پژوهشی دانشگاه تهران طرح شماره ۱۷۰۱۰۶۴/۶/۰۷ می باشد که بدینوسیله تشکر می شود.

منابع

- Bradbury, E.M; Cary, P.D., Chapman, G.E., Crane-Robinson, C., Danby, S.E., Boublik, M., Palau, J., Aviles, F. (1975) Histone Nomenclature, The structure and function of Chromatin. *Eur. J. Biochem.* 52: 605–613.
- Bradbury, E.M., Van Holde, K.E. Zlatanova, J., Leuba, S.H. (2004) Chromatin Structure and Dynamics: A Historical Perspective in Chromatin Structure and Dynamics. *New Compart Biochem.* 39: 1-11.
- Burgoyne, L.A., Wager, M.A., Atkinson, M.R. (1970) Calcium- dependent priming of DNA synthesis in isolated rat liver nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 39: 254 -259.
- Chaires, J.B., Dattagupta, N., Crothey, D.N. (1983) Binding of daunomycin to calf thymus nucleosomes. *Biochemistry* 22: 284-292.
- Chen, WH., Qin, Y., Cai, Z., Chan, CL., Luo, GA., Jiang, ZH. (2005) Spectrometric studies of cytotoxic protoberberine alkaloids binding to double stranded DNA, *Bioorg. Med. Chem.* 13: 1859–1866.
- Clark, D.J., Hill, C.S., Martin, S.R., Thomas, J.O. (1988) Alpha- helix in carboxy-terminal domains of histones H1 and H5. *EMBO J.* 7: 69–75.
- Cowgill, R.W., Chen, R.F., Edelhoch, H. (1976) Tyrosyl Fluorescence in *Biochemical Fluorescence Concepts*, Marcel Dekker Inc. 2: 441–486.
- Dumontet, C., Jordan, MA. (2010) Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 9: 790-803.
- Cutter, A.R. and Hayes, JJ. (2017) Linker histones: novel insights into structure-specific recognition of the nucleosome. *Biochem Cell Biol.* 95(2): 171-178.
- Gentili, P.L., Ortica, F., Favaro, G. (2008) Static and dynamic interaction of a naturally occurring photochromic molecule with bovine serum albumin studied by UV-visible absorption and fluorescence spectroscopy. *J Phys Chem B.* 112: 16793–16801.
- Gupta, S.P, Pandav, K., Pandya, P., Kumar, G.S, Barthwal, R. and Kumar, S. (2011) Methylene linker assisted DNA binding of Vinblastine and simpler analogs: Purine-pyrimidine specificity of indole derivatives. *Chem. Biol. Interface.* 1: 297–309.
- Hajihassan, Z., Rabbani-Chadegani, A. (2011) Interaction of mitoxantrone, as an anticancer drug, with chromatin proteins, core histones and H1, in solution. *International Journal of Biological Macromolecules.* 48: 87–92.
- Isenberg, I. (1979) Histones. *Ann. Rev. Biochem.* 48: 159–191.
- Jordano, J., Barbero, J.L., Montero, F., Franco, L. (1983) Fluorescence of histones H1. A tyrosinate-like fluorescence emission in *Ceratitis capitata* H1 at neutral pH values. *J. Biol. Chem.* 258: 315–320.

- Jutras, G., Belanger, K., Letarte, N., Adam, J.P., et al. (2018) Procarbazine, lomustine and vincristine toxicity in low-grade gliomas. *Current Oncol.* 25: e33-e39.
- Kelly, S. M., Price, N. C. (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Curr Protein Pept Sci.* 1: 349-384.
- Kowalski, A.(2016) Nuclear and nucleolar activity of linker histone variant H1.0. *Cell Mol Biol Lett.* 21:15.
- Kumar, S., Pandya, P., Pandav, K., Gupta, S. and Chopra, A. (2012) Structural studies on ligand–DNA systems: A robust approach in drug design. *J. Biosci.* 37(3): 553–561.
- Luger k., L. Dechassa M., J. Tremethic D. (2012) New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 13: 436-447.
- Mohammadgholi, A., Rabbani- Chadegani, A., Fallah, S. (2013) Mechanism of interaction of plant alkaloid vincristine in chromatin context: Spectroscopic study and comparison with DNA. *DNA and Cell Biology.* 32: 228-235.
- Ordu, O, Lusser, A, Dekker, NH. (2016) Recent insights from in vitro single-molecule studies into nucleosome structure and dynamics. *Biophys Rev.* 8: 33-49.
- Pandya, P., Gupta, S.P., Pandav, K., Barthwal, R., Jayaram, B., and Kumar, S. (2012) DNA binding studies of vinca alkaloids: experimental and computational evidence. *Nat Prod Commun.* 7: 305–309.
- Rabbani, A., Iskandar, M., Ausio, J. (1999) Daunomycin-induced unfolding and aggregation of chromatin, *J. Biol. Chem.* 274:18401-18406.
- Rabbani, A., Finn, R.M., Ausio, J. (2004a) The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. *Bio Essays.* 27: 50–56.
- Rabbani, A., Finn, R.M., Thambirajah, A., Ausio, J. (2004b) Binding of antitumor antibiotic daunomycin to histones in chromatin and in solution. *Biochemistry.* 43:16497–16504.
- Rapkin, L.M., Anchel, D.R., Li R., Bazell-Jones, D.P. (2012) A view of the chromatin landscape. *Micron.* 43: 150-158.
- Sen, A., Maiti M. (1994) Interaction of sanguinarine iminium and alkanolamine form with calf thymus DNA. *Biochem. Pharmacol.* 48: 2097–2102.
- Shati, A.A. and Elaid F.G. (2018) Hepatotoxic effect of subacute vincristine administration activates necrosis and intrinsic apoptosis in rats. *Arch Physiol biochem* 1: 1-11.
- Tang, H., Ye, Y., Li, T., Zhou, J., Chen, G. (2003) Study on Schiff base complexes-cellular DNA interactions by a novel system of Hadamard transforms fluorescence image microscopy. *Analyst.* 128: 974–979.
- Tyagi, G., Jangir, D K., Singh, P., Mehrotra, R. (2010) DNA Interaction Studies of an Anticancer Plant Alkaloid, Vincristine, Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *DNA and Cell Biology.* 29: 693-699.
- Zhu, Y., Zeng, H., Xie, J., Ba, L., Gao, X. and Lu, Z. (2004) Atomic Force Microscopy Studies on DNA Structural Changes Induced by Vincristine Sulfate and Aspirin. *Microsc Microanal.*, 10: 286–290.

Study of the binding affinity of anticancer drug, vincristine, to chromatin histone proteins by using spectroscopic methods

A. Mohammadgholi^{1,2}, A. Rabbani-Chadegani¹

Received:2017.09.17

Accepted:2018.11.26

Abstract

Vincristine is the most effective anticancer drug, widely used in the treatment of various cancers. Chromatin is composed of nucleosome units consisted of DNA and histone proteins. In the present study, for the first time the interaction of anticancer drug vincristine with histone H1 and core histone proteins in solution was investigated using fluorescence, UV and CD spectroscopy techniques. The results showed that in the presence of vincristine, fluorescence emission intensities were reduced in a dose dependent manner, representing quenching of the drug with aromatic residues located in the globular head domain of histone proteins. Stern-Volmer constant and binding affinity of the drug to histone H1 was higher than core histone proteins. The binding of vincristine to histones induced structural changes in circular dichroism spectra revealing increase of α -helix content of the histones. Moreover, vincristine increased UV absorbance of H1 and core histones at 210 nm (hyperchromicity). In conclusion it is suggested that vincristine, by its domains, can penetrate into globular head domain of histones. Also the binding affinity of vincristine to histone H1 is higher than to core histones, possibly because H1 is located in linker region which is more exposed and accessible to environment.

Keywords: Chromatin, Histone H1, Core histones, Vincristine, Spectroscopy

1- Department of Biochemistry, Institute of Biochemistry and Biophysics, University of Tehran, Tehran, Iran

2 - Department of Biology, Central Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

*(Corresponding authr:arabbani@ut.ac.ir)