تأثیر داروی ضد تومور دانومایسین بر روی پروتئین هیستون H_1 با استفاده از روش طیف سنجی

عذرا ربانی چادگانی*، سید جلال زرگر و سایه عبدالصمدی

تهران، دانشگاه تهران، مرکز تحقیقات بیوشیمی بیوفیزیک

تاریخ دریافت: ۸٤/۰۵/۲۵ تاریخ پذیرش: ۸۵/۰٤/۱۲

چکیده

در این مطالعه میانکنش داروی ضد تومور دانومایسین با هیستون H_1 در شرایط قدرت یونی مختلف با استفاده از روش طیف سنجی UV/Vis و طیف سنجی فلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان می دهد که دانومایسین میزان جذب هیستون H_1 در ۲۱۰ نانومتر را کاهش داده و میزان ملکول های پروتئین غیر طبیعی شده وابسته به غلظت دارو است. ضمناً با افزایش غلظت دارو در محیط میزان ثابت اتصال افزایش و انرژی آزاد غیر طبیعی شدن کاهش می یابد. افزایش قدرت یونی محیط اثرات دارو بر هیستون H_1 را تشدید می نماید. میانکنش دارو با هیستون H_1 طیف نشری فلوئورسانس H_1 را کاهش داده و ایجاد هیپوکرومیسیتی می کند. افزایش نمک در محیط نیز شدت هیپوکرومیسیتی را افزایش میدهد. نتایج پیشنهاد می نماید که در اتصال دارو به کروماتین هیستون H_1 نیز بعنوان هدف دارو میتواند در نظر گرفته شود.

واژه های کلیدی : دانومایسین ، هیستون ها ، کروماتین، طیف سنجی

*نویسنده مسئول، تلفن تماس: ۶۶٤۹۹٤۲۲-۰۲۱، پست الکترونی: rabbani@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

هیستونها دسته ای از پروتئینهای تشکیل دهنده ساختار کروماتین سلولی هستند که دارای میزان بالایی از اسیدهای آمینه قلیایی بوده و ملکول بیش از ۵۰ درصد باردار است. این پروتئینها تقریباً در تمام سلولهای عادی یافت می شوند و بطور کلی از پنج نوع پروتئین مختلف تشکیل یافته اند ($H_4,H_3,H_{2B},H_{2A},H_1$) (۳و۱۰). پروتئینهای هیستونی از طریق بارهای مثبت خود با بارهای منفی روی DNA میانکنش کرده و کمپلکس نوکلئوپروتئینی را می سازند. دایمر H_{2A} – H_{2B} و تترامر H_4-H_3 با هم اکتامری را تشکیل می دهند که همراه ۱٤۰ جفت باز DNA بخش هسته مرکزی (Core Particle) نوکلئوزومها (nucleosomes) را می سازند. در حالیکه هیستون H_1 در ناحیه رابط بین نوکلئوزومی به DNA متصل شده و موجب فشرده شدن نوکلئوزومها می گردد (۳).

هیستون H_1 غنی از اسید آمینه لیزین بوده و در ساختار خود یک تیروزین، یک فنیل آلانین داشته و فاقد تریپتوفان می باشد. ساختار پروتئین شامل سه بخش اصلی نوک ، سر و دم است که بترتیب بخش N– انتهایی، بخش میانی ملکول و بخش C–انتهایی H_1 را می سازد (شکل 1B). اسید های آمینه قلیایی در بخش نوک و دم متمرکز بوده و نقاط اصلی میانکنش با DNA را تشکیل می دهند. بخش سر که ردیف اسید آمینه های آن در موجودات مختلف حذف شده است با DNA و هیستونهای هسته مرکزی اتصال برقرار می نماید(۲و٦).

Archive of SID
www.SID.ir

دانومایسین (Daunomycin) از مؤثرترین آنتی بیوتیکهای آنتراسیکلین (Anthracycline antibiotics) است که بعنوان داروی ضدتومور در معالجه انواع سرطانها خصوصاً لوکمیها (Leukemia) استفاده می شود. ساختار دانومایسین در شکل C ۱ نشان داده شده است. هدف اصلی دارو در سلولها DNA می باشد که طی آن دارو از طریق حلقه تتراسیکلین خود وارد جفت بازهای DNA شده و در آن intercalate می شود(۹و١٤). در مورد اتصال این دارو به پروتئینهای کروماتین خصوصاً هیستون H_1 مطالعاتی صورت گرفته و نتایج نشان می دهند که این دارو علاوه بر DNA قادر است به هیستونها نیز متصل شده (۱و۱۸) و احتمالاً از طریق ایجاد cross-link بین DNA و هیستونها مانع از فرآیندهای رونویسی و همانندسازی گردد (۸ و۱۱).

در این مطالعه اثر داروی دانومایسین بر روی هیستون H_1 با استفاده از روشهای اسپکتروسکوپی UV/Vis و فلوئورسانس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

هیستون H_1 با استفاده از روش Sanders(۱۷) تهیه و سپس بر روی ستون کربوکسی متیل سفادکس C25 تخلیص گردید. مقدار پروتئین با روش تغییر یافته Lowry (۱۳) و خلوص آن بوسیله الکتروفورز بر روی ژل SDS (۱۲) تعیین گردید. هیستون H_1 خالص شده در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار pH=۷ حل و پس از تنظیم pH مورد استفاده قرار گرفت.

دانومایسین (Sigma) در غلظت ۲ میلی گرم در لیتر در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار pH=۷ حل و در ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره گردید.

اسید آمینه تیروزین هنگام آزمایش در بافر فوق حل و غلظتهای مناسب از آن تهیه گردید. در برخی موارد به بافر فسفات، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) در غلظت یک میلی مولار اضافه گردید، همچنین در موارد لازم از کلرورسدیم چهار مولار برای تهیه غلظتهای مختلف نمک در بافر استفاده شد. کیسه های دیالیز برای مدت ۳ ساعت در محلول EDTA ۰/۱ مولار جوشانده و پس از شستشو با آب مقطر در یخچال نگهداری شد.

اثر دانومایسین بر هیستون H_1 : غلظت ثابتی از هیستون H_1 (۲۵ میکرومولار) را در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار ۷ =pH تهیه و داروی دانومایسین در غلظتهای مختلف (صفر تا ۲۰۰ میکرومولار) به آن اضافه شد. نمونه ها بمدت ٤٥ دقیقه در حرارت اطاق اینکوبه و سپس تغییرات جذب با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر (UV260 Shimadzu) اندازه گیری و محاسبات لازم انجام گردید. از روابط زیر جهت محاسبات استفاده گردید.

$K= [D]/ [N]$ که در آن [N] غلظت پروتئین طبیعی (native) و [D] غلظت پروتئین دناتوره شده است. با توجه به تناسب غلظت یک ماده با میزان جذب آن، برای هر یک از حالات گذرا ثابت تعادل محاسبه گردید (١٤). $K=Y/ (1-Y)$ ، در این رابطه Y میزان غیرطبیعی شدن پروتئین را در لحظه مورد نظر نشان می دهد. با توجه به مقادیر بدست آمده مقدار ΔG از رابطه $\Delta G =-RT \ lnK$ محاسبه گردید. آزمایش در حضور غلظتهای مختلف نمک صفر تا ۰/٦ مولار نیز در شرایط مشابه انجام گرفت.

طیف سنجی فلوئورسانس: غلظت معینی از هیستون H_1 (۷/۵ میکرومولار) در بافر فسفات ۲۰ میلی مولار و EDTA یک میلی مولار تهیه و پس از تهییج در طول موج ۲۹۵ نانومتر طیف نشری فلوئورسانس بین ٤۰۰-۳۰۰ نانومتر رسم گردید. سپس غلظتهای مختلفی از دانومایسین (صفر تا ۱۷/۵ میکرومولار) بترتیب در نمونه وارد و طیفهای مخلوط H_1 و دانومایسین رسم شد. برای مقایسه از محلول اسید آمینه تیروزین در غلظت ۲ درصد استفاده شد. زمان اینکوباسیون برای هر نمونه ۳۰ دقیقه و سرعت scan برابر ٦۰ نانومتر بر دقیقه و slit های تهییجی و نشری هر یک برابر ۱۰ نانومتر بودند. برای اندازه گیری از دستگاه

Archive of SID
www.SID.ir

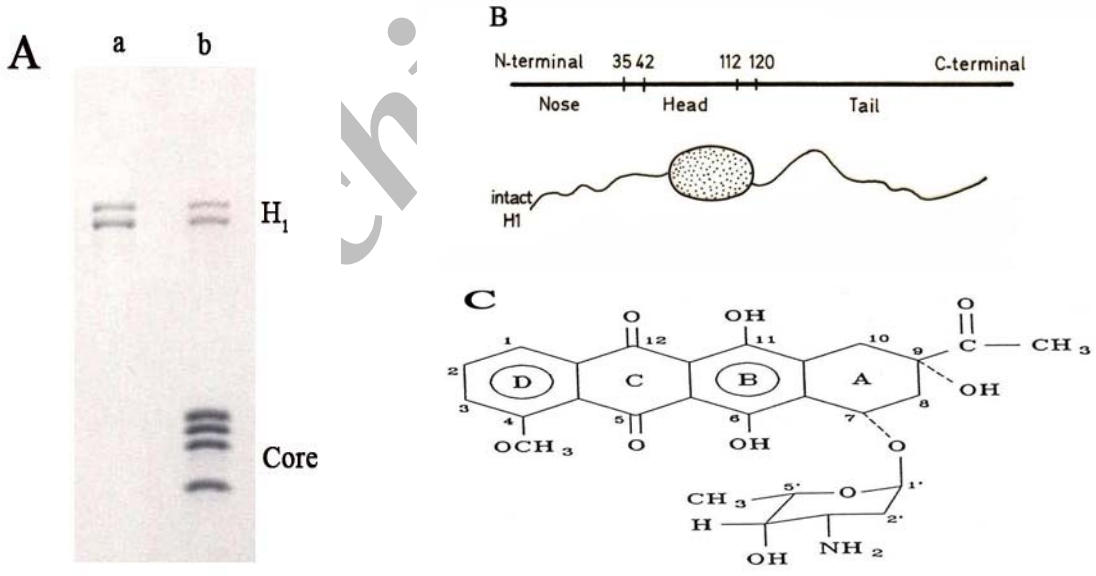
اسپکتروفتومتر فلوئورسانس Hitachi مدل MPF-4 استفاده گردید.

جهت رسم طیف نشری فلوئورسانس دارو نمونه پس از تهییج در طول موج ٤٨٥ نانومتر طیف در محدودهٔ طول موج ٤٧٠–٤٥٠ نانومتر رسم گردید. ضمناً در همه موارد حداکثر شدت نشر فلوئورسانس (I_{max}) تعیین و منحنیهای مربوطه رسم گردید. برای مطالعه اثر شرایط قدرت یونی محیط بر میانکنش H_1 و دارو، از نمک کلرور سدیم استفاده و با وارد کردن غلظت معینی از آن در نمونه ها طیفها رسم شد.

نتایج

در سلولهای یوکاریوت DNA در اتصال با پروتئینهای هیستونی و غیر هیستونی است که مجموعاً ترکیب نوکلئوپروتئین نوکلئوزوم ها را می سازند. با اینکه هدف اصلی داروی دانومایسین، DNA است ولی پروتئینهای متصل شده به آن نیز در این فرآیند باید نقشی ایفا نمایند. هیستون H_1 از بزرگترین هیستونهاست که با اتصال به مناطق DNA رابط موجب فشردگی نوکلئوزومها و ایجاد ساختارهای Higher-order می شود. جهت بررسی اثر داروی ضدتومور دانومایسین بر روی هیستون H_1، این پروتئین تهیه و پس از اثر دادن غلظتهای مختلف دارو، میانکنش بین آنها با استفاده از روشهای مختلف مورد مطالعه قرار گرفت.

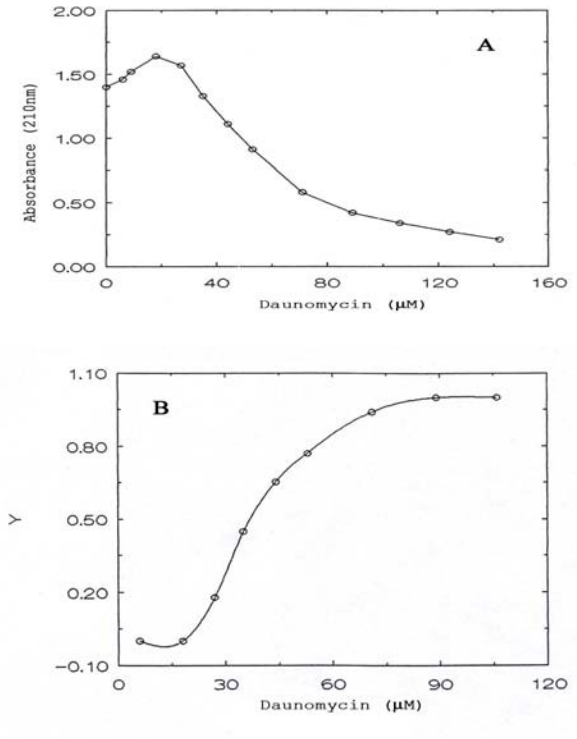
شکل ۱ طرح الکتروفورزی هیستون H_1 خالص شده بر روی ژل SDS (۱A) و ساختار آن که شامل سه بخش نوک، سر و دم است (۱B) نشان داده شده است. همچنین ساختار داروی دانومایسین که شامل یک حلقه تتراسیکلین و قند دانوزآمین است در شکل ۱C نمایش داده شده است.



شکل ۱: A) طرح الکتروفورزی هیستون H_1 خالص شده (a) در مقایسه با هیستون کل (b). B) ساختار هیستون H_1 که در آن سه بخش نوک (nose)، سر (head) و دم (tail) مشخص شده است. C) فرمول شیمیایی دانومایسین

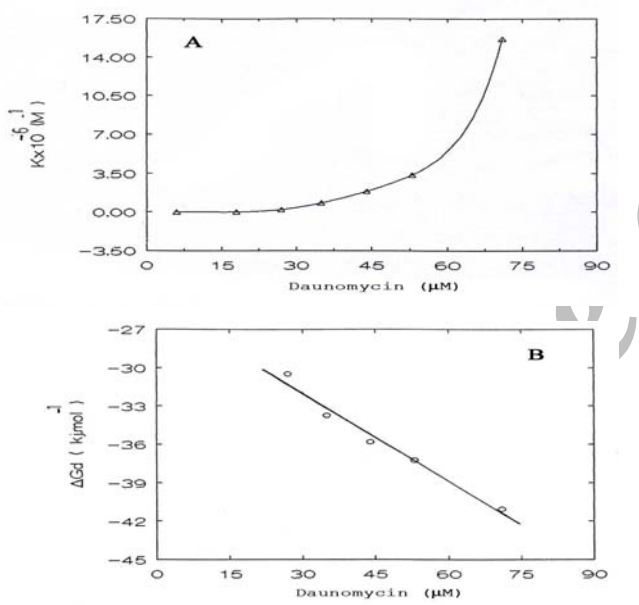
www.SID.ir

هیستون H_1 با غلظتهای مختلف دارو اینکوبه و سپس جذب نمونه ها در ۲۱۰ نانومتر که جذب شاخص هیستون H_1 است اندازه گیری گردید (شکل ۲A). بطوریکه مشاهده می شود با وجودیکه میزان جذب در غلظتهای کم دارو موجب افزایش جذب H_1 می شود ولی با افزایش مقدار دارو، جذب H_1 بشدت کاهش می یابد. با استفاده از رابطه $Y=A_{abs}-A_N/A_D-A_N$، مقدار Y محاسبه و منحنی مربوطه رسم گردید. شکل ۲B میزان ملکولهای پروتئین غیر طبیعی شده (Y) را بر حسب غلظتهای مختلف دانومایسین نشان می دهد. بطوریکه مشاهده می شود منحنی بصورت یک نمودار سیگموئیدی است که. در غلظتهای کم دارو (تا ۲۰ میلی مولار) پروتئین حالت طبیعی (Native) خود را حفظ می کند و سپس با افزایش غلظت داروغیر طبیعی شدن پروتئین آغاز می شود تا جایی که منحنی به حد اشباع می رسد.



شکل ۲: تغییرات میزان جذب هیستون H_1 پس از تأثیر غلظتهای مختلف دانومایسین (A) و نمودار Y بر حسب غلظت دارو پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای اطاق (B).

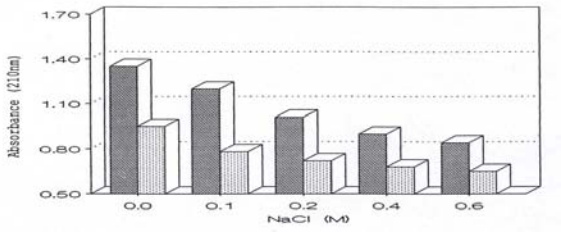
مقدار K و ΔG با بترتیب استفاده از روابط ، $K=Y/1-Y$ و $\Delta G_d = -RT \ln K$ محاسبه و نتایج در شکل ۳ نشان داده شده است. تغییرات ثابت اتصال K بر حسب غلظتهای مختلف دارو (شکل۳A) نشان می دهد که با افزایش غلظت دارو مقدار K نیز افزایش می یابد ولی این افزایش تا غلظت حدود ٤۰ میکرومول دارو به آهستگی پیش می رود ولی غلظتهای بالاتر شیب تند را در میزان K نشان می دهند. تغییرات انرژی آزاد غیر طبیعی شدن هیستون H_1 بوسیله دانومایسین (ΔG_d) نیز در شکل ۳B نمایش داده شده است، بطوریکه مشاهده می شود، با افزایش غلظت دارو مقدار ΔG_d کاهش می یابد.



شکل ۳: تغییرات ثابت اتصال دارو به پروتئین بر حسب غلظت دارو(A) و تغییرات ΔG_d میانکنش دانومایسین با هیستون H_1 (B).

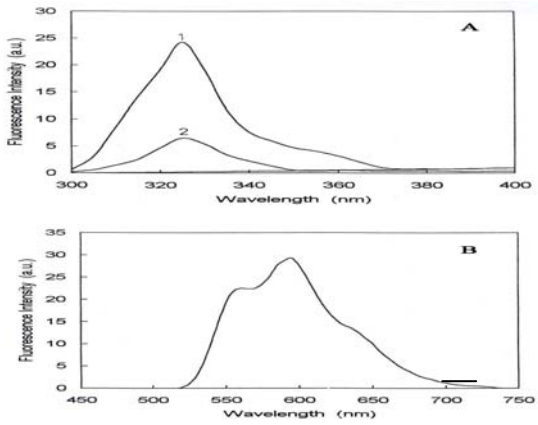
جهت بررسی نقش احتمالی قدرت یونی محیط بر فرآیند اثر دانومایسین بر هیستون H_1، تجربهٔ فوق در حضور غلظتهای مختلف نمک کلرورسدیم در شرایط مشابه انجام و نتایج در شکل ٤ نشان داده شده است. بطوریکه مشاهده می شود، با اینکه جذب هیستون H_1 در حضور نمک کاهش می یابد، در حضور دارو این کاهش در جذب تشدید می گردد.

www.SID.ir



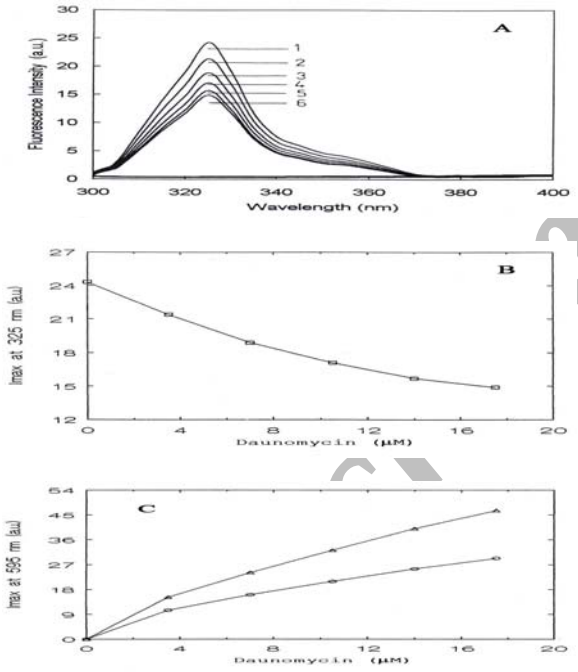
شکل٤: تغییرات میزان جذب هیستون H_1 پس از انکوباسیون با دانومایسین بر حسب غلظتهای مختلف نمک کلرورسدیم
هیستون H_1 هیستون H1 انکوبه شده با دارو

بمنظور بررسی میانکنش دانومایسین با هیستون H_1 با استفاده از روش طیف سنجی فلوئورسانس ابتدا طیف نشری پروتئین در بافر فسفات پس از تهییج در ۲۹۵ نانومتر در محدوده ٤۰۰-۳۰۰ نانومتر رسم شد. طیف نشری اسیدآمینه تیروزین در شرایط مشابه رسم و بعنوان شاهد در نظر گرفته شد. بطوریکه در شکل۵A مشاهده می شود هیستون H_1 یک پیک شاخص در ۳۲۵ نانومتر دارد که مطابق با طیف نشری تیروزین است. همچنین طیف نشری دارو نیز بین ۷۵۰-٤۵۰ نانومتر رسم و در شکل ۵B نمایش داده شده است. این طیف شامل یک قله در ۵۹۵ نانومتر و یک شانه در ۵۵۰ نانومتر می باشد.



شکل ۵: (A) طیف نشری فلوئورسانس هیستون H_1 (۷/۵ میکرومولار) تهییج شده در طول موج ۲۹۵ نانومتر (شماره ۱) و مقایسه آن با طیف نشری اسید آمینه تیروزین در شرایط مشابه (شماره ۷).
(B) طیف نشری فلوئورسانس دانومایسین (۱۷/۵ میکرومول) تهییج شده در طول موج ٤۸۵نانومتر.

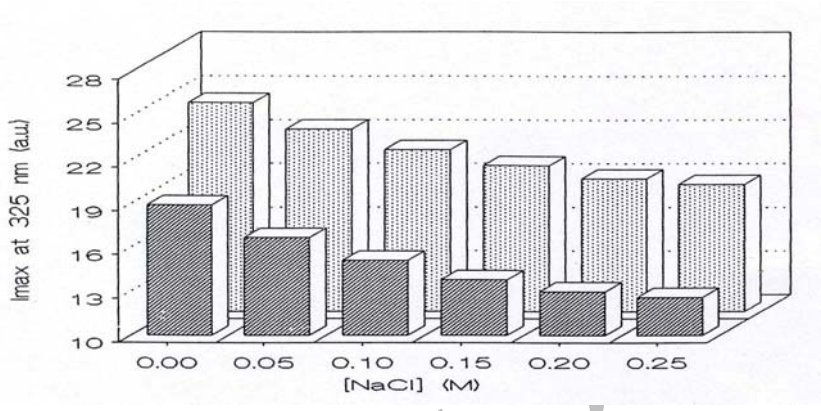
به غلظت ثابتی از هیستون H_1 (۷/۵ میکرومول) غلظتهای مختلف دارو (۳-۱۸ میکرومول) اضافه و پس از ۱۵ دقیقه انکوباسیون طیف نشری هر یک رسم گردید. نتایج در شکل ٦ نشان داده شده است. بطوریکه ملاحظه می شود، وارد کردن دارو موجب کاهش در طیف نشر فلوئورسانس پروتئین می گردد (hypochromicity). رسم تغییرات حداکثر نشر فلوئورسانس (I_{max}) در مقابل غلظتهای مختلف دارو کاهش را بوضوح نشان می دهد. بررسی تغییرات شدت نشر فلوئورسان دانومایسین (ناحیه ۵۹۵ نانومتر) در حضور و عدم حضور هیستون H_1 نشان میدهد که میزان I_{max} افزایش می یابد و شیب نمودار در مقایسه با حالت کنترل زیاد می شود (شکل٦C).



شکل٦:(A) نمایش تغییرات طیف نشری فلوئورسانس هیستون (۷/۵ میکرومولار) پس از انکوباسیون با غلظتهای مختلف دانومایسین در دمای اطاق بمدت ۳۰ دقیقه در بافر ۲۰ میلی مولار، pH=۷ و ۱ میلی مولار EDTA شماره های ۱ الی ٦ بترتیب غلظتهای صفر، ۳/۵، ۷، ۱۰/۵، ۱٤ و ۱۷/۵ میکرومولار دارو را نشان می دهند. (B) تغییرات حداکثر نشر فلوئورسانس هیستون H_1 بر حسب غلظتهای مختلف دانومایسین (C) نمایش تغییرات شدت نشر فلوئورسانس دانومایسین پس از انکوباسیون با هیستون H_1 (۷/۵ میکرومولار)(△) و مقایسه با حالت شاهد (○)

www.SID.ir

بمنظـور بررسـی تـأثیر قـدرت یـونی محـیط بـر نشـر فلوئورسـانس، آزمـایش فـوق در حضـور و عـدم حضـور غلظتهـای مختلـف نمـک کلرورسـدیم ۲۵۰ mM –۵۰ در دمای اطاق انجام و طیفهای مربوطه رسم گردیـد. نتـایج در شکل ۷ نشان می دهد که با افزایش غلظت نمک در محیط، هیپوکرومیسیتی طیف نشر فلوئورسانس هیستون H_1 القـاء شده توسط دانومایسین، تشدید گشته و کاهش حداکثر نشر فلوئورسانس این پروتئین شدت می یابد.



شکل ۷: نمایش تغییرات شدت فلوئورسانس هیستون H_1 در غلظت ۷/۵ میکرومـولار پـس از انکوباسـیون بـا ۷ میکرومـولار دانومایسـین بـر حسـب غلظتهای مختلف نمک کلرورسدیم. هیســـــتون H_1 هیستون H_1 انکوبه شده با دارو.

بحث

آنتی بیوتیکهای آنتراسیکلین از مشهورترین داروهـای ضـد تومور می باشند که کاربرد وسیع در شیمی درمـانی دارنـد. دانومایسین با نام تجاری دانوروبیسین (Daunorubicin) از مهمترین این داروهاست که در درمـان سـرطانها خصوصـاً سرطان خون مورد استفاده قـرار مـی گیـرد. هـدف اصـلی دانومایسین در سـطح هسـته سـلول، ملکـول DNA اسـت بطوریکه دارو با ساختار ویژه خود قادر است در بین جفت بازهـای DNA نفـوذ نمـوده (Intercalation) و سـاختار و عمـل DNA: ماننـد همانندسـازی و رونویسـی را مختـل سازد(۱و۸و۱٤). از آنجا که در هسته سلولهای یوکـاریوت، DNA در اتصال بـا بسـیاری از پروتئینهاسـت کـه رویهـم شبکه نوکلئوپروتئینی را می سازند و از طرفـی پروتئینهـای قلیایی مانند هیستونها در اتصال به DNA ساختارهای ویـژه نوکلئـوزومی را تشـکیل مـی دهنـد، نقـش پروتئینهـای کروماتین در میانکنش دارو با کروماتین محـرز مـی گـردد. اتصال داروهـای آنتراسـیکلین بـه کروماـتین (٤و٥) بطـور وسـیع مطالعـه شـده ولـیکن اطلاعـات در مـورد نقـش پروتئینهای هیستونی بسیار محدود است.

هیستون H_1 تفـاوت زیـادی بـا سـایر هیسـتونها دارد. ایـن پروتئین بزرگتر از چهار پروتئین دیگـر اسـت(۲۱KDa) و به نواحی DNA رابـط متصـل مـی شـود(۳). اتصـال ایـن پروتئین به DNA اساساً از طریـق N و C انتهـایی صـورت می گیرد و بخش مرکزی ملکول (سـر)، بـا Core Particle اتصالاتی را بر قرار می نماید. پروتئین H_1 جـذب شـاخص در ۲۱۰ نـانومتر دارد و یعلـت کـم بـودن اسـیدهای آمینـه حلقوی جذب ۲۸۰ آن قابل اندازه گیری نمی باشد.

میانکنش دانومایسین با هیستون H_1 وابسته به غلظت اسـت بدین معنی که در غلظت کم دارو (۱۰> میکرومول) میـزان جذب H_1 را بطور محسوس افـزایش مـی دهـد ولـیکن بـا افزایش غلظت دارو، اتصال دارو به پروتئین سـیب کـاهش

Archive of SID
www.SID.ir

جذب و هیپوکرومیسیتی می شود (۱۸). در این حالت می توان گفت که اتصال دارو مانند عمل یک عامل غیرطبیعی کننده (Denaturant) است بطوریکه در غلظتهای کم آن، پروتئین در مقابل غیرطبیعی شدن مقاومت نشان می دهد ولی در غلظتهای بالا، موجب غیرطبیعی شدن پروتئین می شود. محاسبهٔ مقادیر ثابت اتصال و تغییرات انرژی آزاد نشان می دهد که هر چه میزان دارو در محیط زیادتر باشد ثابت تعادل تشکیل کمپلکس پروتئین- دارو افزایش می یابد در حالیکه تغییرات انرژی آزاد به مقادیر منفی تر سوق پیدا می کند که نشان دهنده تمایل واکنش برای انجام خودبخودی است.

وارد کردن نمک در محیط موجب کاهش جذب هیستون H_1 می گردد. این امر بدلیل اتصال یونهای سدیم و کلر حاصل از یونیزه شدن نمک با ملکول پروتئین است که احتمالاً با اتصال خود موجب فشردگی در ملکول پروتئین شده و جذب ۲۱۰ نانومتر را کاهش می دهند، با وارد شدن دارو در محیط این افزایش تشدید می گردد. این امر می تواند بدلیل وارد شدن دارو در بین بخشهای فشرده پروتئین باشد و یا اینکه در حضور دارو میانکنشهای -H_1 H_1 تقویت شده و در کل میزان جذب را کاهش دهد.

اسیدهای آمینه حلقوی تریپتوفان، تیروزین و فنیل آلانین، سه فلوئور (Fluor) شرکت کننده در ساختار پروتئینها می باشند که در پدیده فلوئورسانس شرکت می کنند. طول موج نور تهییج کننده و طول موج نور نشر شوندهٔ هر یک از این اسیدهای آمینه با یکدیگر تفاوت دارد (۷). هیستون H_1 فاقد تریپتوفان بوده و منحصراً یک اسید آمینه تیروزین و یک اسید آمینه فنیل آلانین دارد که هر دو در ناحیه کروی پروتئین (سر) قرار دارند (۲). مطالعات طیف سنجی فلوئورسانس هیستون H_1 منحصراً نور فلوئورسانس ساطع شده در ناحیه اسید آمینه تیروزین را نشان می دهد. وارد نمودن غلظتهای مختلف داروی دانومایسین به محلول هیستون H_1 موجب کاهش طیف نشری آن در ناحیه تیروزین می شود. وارد کردن نمک در محیط میزان هیپوکرومیسیتی را افزایش می دهد. کاهش میزان فلوئورسانس هیستون H_1 پس از انکوباسیون با دانومایسین می تواند بدلیل نفوذ ملکولهای دارو از طریق حلقه تتراسیکلین خود به ناحیه کروی (سر) پروتئین که خاصیت آبگریزی دارد و تغییر بنای فضایی آن باشد. میانکنش هیستون H_1 با دانومایسین همچنین وابسته به قدرت یونی محیط است. افزایش میزان نمک در محیط میزان اتصال را تشدید می نماید.

مطالعات نشان داده است که دانومایسین اساساً به کروماتین فاقد هیستون H_1 متصل می شود و یا اینکه باعث جابجایی برخی از پروتئینها می گردد (٤). بررسی تأثیر دانومایسین بر کروماتین در حضور و عدم حضور هیستون H_1 نشان داده است که اتصال دارو در غلظتهای پایین ابتدا باعث باز شدن کروماتین شده ولی در غلظتهای زیاد موجب فشرده شدن و تجمع نوکلئوزومها می گردد (١٦ و ١٥). همچنین مطالعات دناتوراسیون حرارتی نشان داده است که اتصال دارو موجب پایداری پروتئین H_1 می شود و فرآیند وابسته به قدرت یونی محیط است (۱۹). با توجه به موارد فوق می توان پیشنهاد نمود که در ساختار کروماتین علاوه بر ملکول DNA، هیستون H_1 نیز بعنوان هدف می تواند در نظر گرفته شود. مکانیسم قابل پیشنهاد این است که دانومایسین ابتدا به هیستون H_1 متصل شده و باعث آزاد شدن H_1 از کروماتین می گردد. در این حالت دارو فرصت می یابد تا به نواحی DNA رابط متصل شده و در پی آن دارو بین DNA و پروتئینهای کروماتین پل زده (Cross-link) و بدین طریق کروماتین را فشرده نماید.اینکه در این فرآیند کدامیک از پروتئینهای کروماتین نقش مؤثرتر و اصلی تر را دارند و اینکه محلهای اصلی اتصال دارو کدام بخش از پروتئین است از مواردی است که نیاز به بررسیهای وسیع تر دارد و هم اکنون در دست اجرا می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

تشکر و قدردانی: از سرکار خانم مرضیه یوسف مصبوغ که در انجام آزمایشات یاری نموده اند تشکر و قدردانی می شود. بودجه طرح از طرف معاونت پژوهشی دانشگاه تهران تأمین شده است.

منابع

۱- ربانی چادگانی عذرا و زرگر سیّد جل . ۱۳۷۸ . میانکنش آنتی بیوتیکهای آنتراسیکلین با هیستون H_1 کروماتین. مجله زیست شناسی ایران، جلد ۸، شماره ۱ تا ٤: ۱۳-۲۲.

2- Barbero J. L., Franco L. and Montero F. 1982. Influence of the N-and C-terminal

tails on the structure of the globular head of histone H_1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107: 842-847.

3- Bradbery E. M., Maclean N. and Mattews H. R. 1981. DNA chromatin and chromosomes. Black Well Sci. Pub., Oxford London Chapt. 1-2.

4- Cera C., Palu G., Magno S. M. and Palumbo M. 1991. Interaction between second generation anthracyclines and DNA in the nucleosomal structure. Nucleic Acids Res. 19: 2309-2314.

5- Chaires J. B., Dattagupta N. and Crothers D. M. 1993. Binding of daunomycin to calf thymus nucleosomes. Biochemistry 22: 284-292.

6- Chapman G. E., Hartman P. G., Gary P.D., Bradbury E. M. and Lee D. R. 1978. A Nuclear-Magnetic-Resonance study of the globular structure of the H_1 histone. Eur. J. Biochem. 86: 35-44.

7- Freifelder D. 1982. Physical Biochemistry. 2nd edition, Chapter 15, pp 537-572, W.H. Freeman and Company, Inc., New York.

8- Fritzsohe H., Wahnert V., Chaires J. B., Dattagupta N., Schlessinger F. B. and Crothers D. M. 1987. Anthracycline antibiotics interaction with DNA and nucleosomes and inhibition of DNA synthesis, Biochemistry 26: 1996-2000.

9- Gabbay E. J., Grier D., Fingerle R. E., Reimer R., Lery R., Pearce S. W. and Wilson W. B. 1976. Interaction specificity of the anthracyclines with deoxyribonucleic acid. Biochemistry 15(10): 2026-2070.

10- Johns E. W. 1982. The HMG Chromosomal Proteins, Academic Press, London.

11- Kersten W., Kersten H. and Szybalski W. 1966. Physiochemical properties of complexes between DNA and antibiotics which affect ribonucleic acid synthesis, Biochemistry 5: 236-244.

12- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins the Assembly of the head of bacteriophage. Nature 227: 680-685.

13- Lowry O. H., Roserough N. J., Farr A. I. and Randall R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

14- Privalov P. L. 1979. Stability of Proteins: Small globular proteins. Adv. Protein Chem. 33: 167-241.

15- Rabbani A., Iskandar M. and Ausio J. 1999. Daunomycin induced unfolding and aggregation of chromatin. J. Biol. Chem. 274: 18401-18406.

16- Rabbani A., Finn R. M. and Ausio J. 2004. The anthracycline antibiotics: antitumor drugs that alter chromatin structure. BioEssays 27: 50-56.

17- Sanders C. 1977. A method for the fractionation of the High-Mobility-Group non-histone chromosomal proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 78: 1034-1042.

18- Zargar S. J. and Rabbani A. 2002. Interaction of daunomycin antibiotic with histone H_1: ultraviolet spectroscopy and equilibrium dialysis studies. Int. J. Biol. Macromol 30: 113-117.

19- Zargar S. J. and Rabbani A. 2000. Interaction of daunomycin antibiotic with histone H_1: thermal denaturation and fluorescence studies. Int. J. Biol. Macromol. 28: 75-79

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of daunomycin antitumor drug on histone H1: UV/Vis and fluorescence spectroscopy studies

Azra Rabbani, Saeid Jalal Zargar, Sayeh Abdosamadi

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

Abstract

In this study the interaction of antitumor antibiotic, daunomycin with histone H1 in different ionic strengths was investigated employing UV/Vis and fluorescence spectroscopy. The results show that binding of daunomycin to histone H1 reduces protein absorbance at 210 nm and the amount of denatured protein is dependent on drug concentration. By increasing drug concentration, binding constant is increased whereas denatured free energy is decreased. Increasing the ionic strength intensifies the effect. Fluorescence spectroscopy also shows that the interaction of daunomycin with histone H1 reduces the intensity of the fluorescence at tyrosine position and produces hypochromicity. The results suggest that daunomycin binds to histone H1 and quenches tyrosine residue in the protein. In the chromatin, histone H1 can also be considered as a target for antitumor anticancer drugs.

Key words: Daunomycin, Histones, Chromatin, Spectroscopy

Archive of SID

www.SID.ir