

۲۷۴۵۲

۱۳۷۸ / ۹ / ۲۰



دانشگاه تهران

مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک

"پایان نامه"

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد بیوفیزیک

عنوان:

اثر داروهای ضد تومور بر پروتئین‌های Core کروماتین

به راهنمایی:

استاد ارجمند سرکارخانم دکتر عذرا ربانی

توسط:

نعمه ساری صراف ۴۵۶۱

شهریور ماه ۱۳۷۸

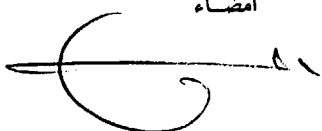
۲۷۴۵۲

بسمه تعالی

گواهی می‌شود آقای خانم نغمه ساری صراف دانشجوی مقطع کارشناسی ارشد رشته بیوفیزیک در تاریخ ۷۸/۶/۱۰ از پایان نامه خود دفاع نموده و نمره ۱۹/۵ را احراز نمودند.

نام و نام خانوادگی استاد راهنما: سرکار خانم دکتر عذرا ربانی چادگانی

امضاء



نام و نام خانوادگی استاد مشاور:

امضاء

نام و نام خانوادگی استاد مشاور:

امضاء

نام و نام خانوادگی استاد ناظر: جناب آقای دکتر عزت‌اله کیهانی

امضاء



نام و نام خانوادگی استاد ناظر: جناب آقای دکتر بهرام گلیانی

امضاء



نام و نام خانوادگی مدیر گروه: جناب آقای دکتر غلامحسین ریاضی

امضاء



و مگوئید «حقیقت را یافته‌ام»؛

بگوئید «حقیقتی را یافته‌ام» ...

و ژرفای دانش خود را با چوبی یا ریسمانی اندازه مگیرید؛

زیرا که خویشتن، دریایی است بی‌کران و بی‌بُن ...

و اگر می‌خواهید خدا را بشناسید پس در حل معماها مکوشید؛

کافی است به گرداگرد خود بنگرید تا او را ببینید...

جبران خلیل جبران

## تقدیم به

مادرم؛ همراه همیشگی تلاش‌هایم...  
پدرم؛ هم‌نورد بزرگ صعودهایم...  
و برادرم؛ دوست خوب همه لحظه‌هایم...

همواره حق شناس و سپاسگزارشان خواهم بود.

با تشکر و قدردانی فراوان از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر عذرا ربانی که همواره از راهنمایی‌ها و توجهات ایشان برخوردار بوده و از دانش، دقت و صبر فراوانشان بسیار آموختم.

از هیأت محترم داوران، جناب آقای دکتر عزت الله کیهانی، و جناب آقای دکتر بهرام گلیایی، که قبول زحمت فرموده و مطالعه و داوری این پایان‌نامه را پذیرفتند کمال تشکر را دارم.

با احترام و تقدیر از همکاران آزمایشگاهی عزیزم خانم شبانی، خانم جعفری، خانم قدم، آقای زرگر، آقای بغدادی، خانم رضوی، خانم فلاح، خانم عبدالصمدی و خانم فرآورده و همچنین دوستان دیگر بخصوص خانم قاسمی که همواره از محبت و یاری ایشان بهره‌مند بوده‌ام.

از کلیه کارکنان محترم در قسمتهای مختلف مرکز؛ آموزش، امور دانشجویی، دبیرخانه، کتابخانه، زیراکس، کارگاه طراحی، عکاسی، سانتریفوژ، کادر فنی، رستوران، خدمات، نگهبانی و سایر همکاران محترم مرکز که به نحوی مرا در انجام کارهای مربوط به این پایان‌نامه یاری دادند سپاسگزارم.

## فهرست مطالب

عنوان	مطالب
چکیده فارسی	.....
مقدمه	۱.....
(۱) کروماتین	۱.....
(۲) هیستون‌ها	۲.....
(۳) اتصالات هیستون‌ها	۵.....
(۴) ساختمان کروماتین	۶.....
(۵) آنتراسیکلین‌ها	۸.....
(۶) اکتینومایسین D	۱۱.....
(۷) اتصال داروهای آنتراسیکلین به DNA	۱۳.....
(۸) اتصال داروهای آنتراسیکلین به کروماتین	۱۸.....
هدف	۲۲.....
مواد و روش	۲۳.....
(۱) مواد	۲۳.....
(۲) روش‌ها	۲۵.....
نتایج	۲۹.....
بحث	۷۶.....
چکیده انگلیسی	.....
منابع و مآخذ	۸۴.....

## چکیده فارسی

از جمله معروف ترین آنتی بیوتیک های ضد سرطان، می توان به آدریامایسین، دانومایسین و اکتینومایسین D اشاره کرد. این داروها در معالجه سرطان از طریق شیمی درمانی مورد استفاده قرار می گیرند. هدف اصلی این داروها در سلول، مولکول DNA است. از آنجا که مولکول DNA در داخل هسته سلول به صورت برهنه و آزاد نیست بلکه در اتصال با ترکیبات دیگری مثل پروتئین های هیستونی و غیرهیستونی می باشد، میان کنش این داروها با پروتئین های هیستونی می تواند میان کنش این پروتئین ها با DNA و در نتیجه میان کنش داروهای مذکور را با DNA تحت تأثیر قرار دهد. هیستون core به عنوان هسته اصلی نوکلئوزوم می تواند یکی از اهداف این داروها در هسته سلول به شمار آید. لذا در این مطالعه میان کنش آدریامایسین، دانومایسین و اکتینومایسین D با هیستون core در شرایط مختلف محیطی از نظر غلظت نمک با یکدیگر مقایسه شده و تعدادی از ایزترم های اتصال داروها به هیستون core نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

نتایج حاصل را می توان به صورت زیر خلاصه نمود:

۱- افزایش غلظت آدریامایسین سبب کاهش جذب هیستون core شده و در طیف جذبی آن هیپوکرومیستی ایجاد می کند. این اثر احتمالاً در نتیجه دسترسی یافتن دارو به کروموفورهای جذبی پروتئین و ایجاد میان کنش با آنهاست که سبب کاهش جذب هیستون core می شود. با افزایش غلظت نمک نیز همین الگو دیده می شود.

۲- افزایش غلظت دانومایسین و اکتینومایسین D تا غلظت ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر سبب افزایش جذب هیستون core و ایجاد هیپرومیستی در طیف جذبی آن می شوند



ولی سپس از آن جذب را کاهش می دهند. به نظر می رسد که در غلظت های پایین، این دو دارو به درون هستون core نفوذ کرده و سبب کاهش فشردگی در آن می شوند. ولی با افزایش غلظت هر یک از دو دارو، با دسترسی یافتن به کروموفورهای جذبی و ایجاد میان کنش با آنها، میزان جذب هستون core کاهش می یابد. تفاوت در غلظتی از دارو که بیشترین میزان هیپرکرومیستی را باعث می شود ناشی از تفاوت ساختار مولکولی آنهاست. همچنین با افزایش غلظت نمک نیز همین الگوها به صورت واضحی دیده می شود.

۳- منحنی های اسکاچارد برای میان کنش آدریامایسین، دانومایسین و اکتینومایسین D با هستون core از نوع تعاونی مثبت می باشند و ضریب هیل بزرگتر از یک نیز این تعاونی مثبت را تأیید می کند.

همچنین ثابت اتصال دارو به هستون core برای آدریامایسین  $6/5 \times 10^5$  و برای اکتینومایسین  $8 \times 10^5$  D به دست آورده شد، و  $\Delta G^\circ$  فرآیند اتصال آدریامایسین و اکتینومایسین D به هستون core دارای مقادیر منفی است که بیانگر گرمازا بودن میان کنش می باشد.

۴- با تغییر غلظت نمک، منحنی های اسکاچارد میان کنش این داروها با هستون core دچار تغییراتی می شود. از جمله اینکه در مورد میان کنش آدریامایسین و دانومایسین با هستون core، افزایش غلظت نمک سبب افزایش  $I$  ماکزیمم می شود و در میان کنش اکتینومایسین D با هستون core، کمترین میزان  $I$  ماکزیمم و بیشترین میزان  $I/C_F$  در غلظت ۰/۱ مولار نمک دیده می شود.

# فصل اول

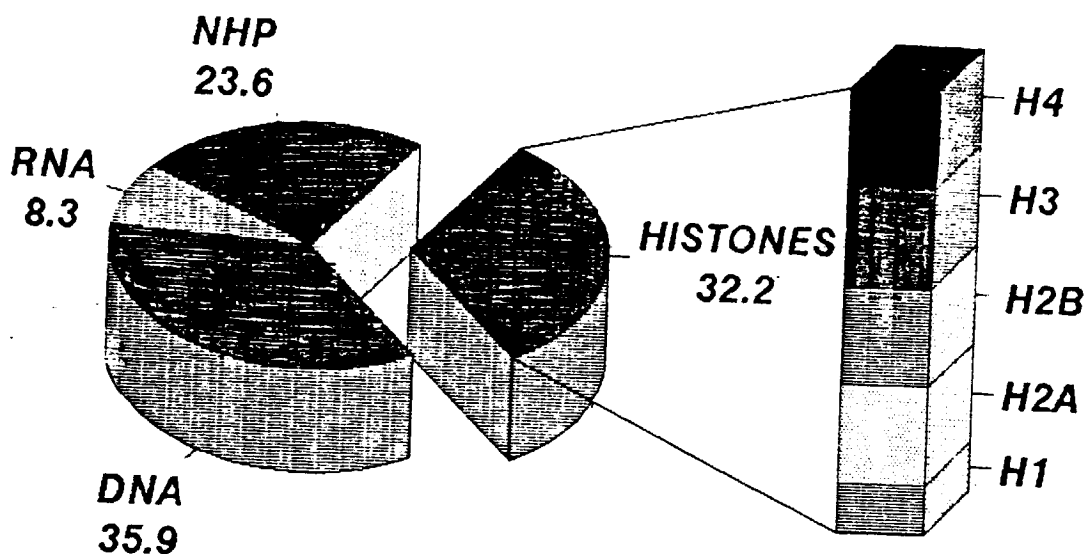
## مقدمه

## (۱) کروماتین

سلول‌ها از نظر ساختمانی به دو دسته تقسیم می‌شوند: پروکاریوت (prokaryot) و یوکاریوت (eukaryot). در پروکاریوت‌ها بین ناحیه حاوی ماده ژنتیکی و سیتوپلاسم سلول حد و مرزی وجود ندارد و ماده ژنتیکی ناحیه متراکمی را در بخش مرکزی سلول اشغال می‌کند که به آن نوکلئوئید (nucleoid) گفته می‌شود. اما در سلول‌های یوکاریوت، ماده ژنتیکی به همراه مواد دیگری در هسته سلول قرار داشته و توسط غشای دولایه هسته از سیتوپلاسم جدا می‌شود (۱). کروماتین (chromatin) در سلول‌های پروکاریوت و یوکاریوت در فعالیتهای سلولی - همانند سازی (replication)، رونویسی (transcription) و... - نقش اساسی دارد. اما در سلول‌های یوکاریوتی نسبت به پروکاریوتی پیچیده‌تر است و در اینترfaz به صورت شبکه در تمام هسته پراکنده بوده و بعد از تاخوردگی و فشرده شدن به کروموزوم (chromosome) تبدیل می‌شود (۵-۲).

در سلول‌های یوکاریوت، ترکیبات تشکیل دهنده کروماتین عبارتند از DNA و پروتئین‌های کروماتین که به دو گروه اساسی پروتئین‌های هیستونی و غیرهیستونی تقسیم می‌شوند (۵).

در این سلول‌ها نسبت هیستون به DNA تقریباً ثابت است (بین ۱/۱ تا ۱/۳) ولی نسبت بین DNA و پروتئین‌های غیرهیستونی متغیر است و در سلول‌هایی که فعالیت سوخت و سازی بیشتری دارند، نسبت پروتئین‌های غیرهیستونی بیشتر است (۷).



شکل ۱: ترکیبات تشکیل دهنده کروماتین

## ۲) هیستون‌ها

پروتئین‌های هیستونی اولین بار در سال ۱۹۴۳ توسط محققین بررسی شده و خصوصیات آنها مورد مطالعه قرار گرفت. نیمی از اسید آمینه‌های تشکیل دهنده این مولکول‌ها باردار بوده و از این میزان ۲۵ تا ۳۰ درصد را بارهای مثبت تشکیل می‌دهند، اما این توزیع بارهای مثبت در هیستون‌های مختلف متفاوت است. این پروتئین‌ها غنی از لایزین و آرژینین هستند. نقطه ایزوالکتریک آنها در محدوده ۹-۱۲ قرار دارد و جزو پروتئین‌های قلیایی به حساب می‌آیند. همچنین در آنها تریپتوفان وجود ندارد و میزان تیروزین در آنها کم است (۱ و ۸).

تقسیم بندی هیستون‌ها با توجه به خصوصیات مختلف آنها انجام می‌شود برای مثال هیستون‌ها با توجه به مقادیر اسیدهای آمینه قلیایی به سه گروه تقسیم می‌شوند (۹).

(Lys - rich histones)

(۱) هیستون‌های غنی از لایزین ( $H_1$ )

۲) هیستون‌های کمی غنی از لایزین ( $H_2A - H_2B$ ) (slightly Lys - rich histones)

۳) هیستون‌های غنی از آرژینین ( $H_3 - H_4$ ) (Arg - rich histones)

در سال ۱۹۶۸، گروه جونز (Jones) هیستون‌ها را به ۵ دسته اصلی تقسیم کرد. این تقسیم بندی در سال ۱۹۷۵ توسط Bradbury تصحیح شده و به نام‌های امروزی شان خوانده شد. ۵ دسته اصلی هیستون‌ها عبارتند از  $H_1, H_2A, H_2B, H_3$  و  $H_4$ .

هیستون  $H_1$  بزرگترین هیستون هاست. با وزن مولکولی ۲۲۵۰۰ دالتون و ۲۱۶-۲۰۶ اسید آمینه. ۲۵ تا ۲۸ درصد اسید آمینه‌های آن باردار هستند و ۱۶-۱۴ درصد اسید آمینه‌ها را Lys تشکیل می‌دهد His و Cys ندارد و میزان Asp و Glu در آن کم است. (۱۱۰ و ۱۱۱)

در ساختمان آن یک انتهای آمین با حدود ۴۰ اسید آمینه، یک بخش میانی کروی با اسید آمینه‌های هیدروفوب و یک بخش انتهایی کربوکسیل با ۱۰۰ اسید آمینه دیده می‌شود. ( $H_1$ ) (۱۲) در بافتها و گونه‌های مختلف مقادیر متفاوتی دارد و دارای ویژگی گونه‌ای (species - specific) است (۱۳).

هیستون  $H_2A$  با ۱۲۹ اسید آمینه و هیستون  $H_2B$  با ۱۲۵ اسید آمینه مشابه هم هستند.  $H_2A$ ، ۱۳۹۶۰ دالتون وزن و  $H_2B$ ، ۱۳۷۷۰ دالتون وزن دارد. در این دو پروتئین، انتهای آمین طولتر و با بار مثبت بیشتری می‌باشد. قسمت میانی مولکول دارای اسید آمینه‌های هیدروفوب و کلافی شکل است. انتهای کربوکسیل کوتاه است. محل اصلی اتصال آنها به DNA، انتهای آمین می‌باشد (۱۳).

هیستون H<sub>3</sub> با وزن مولکولی ۱۵۰۰۰ دالتون، یک زنجیر با ۱۳۵ اسید آمینه دارد و غنی از Arg است در دو انتها واجد دو آلانین می باشد و همچنین در ساختمان آن برخلاف سایر هیستون ها اسید آمینه Cys دیده می شود. H<sub>3</sub> در موجودات پست حاوی یک Cys و در موجودات عالی حاوی ۲ عدد Cys است. هیستون H<sub>4</sub>، ۱۰۲ اسید آمینه و ۱۱۰۰۰ دالتون وزن دارد. هر دوی این هیستون ها واجد یک ناحیه انتهای آمین با بار مثبت زیاد، یک دم کوتاه در انتهای کربوکسیل و یک ناحیه کلافی میانی واجد اسیدهای آمینه هیدروفوب هستند (۱۳ و ۱۴).

Delange و همکارانش نشان دادند که هیستون ها در طی تکامل حفاظت شده هستند. H<sub>4</sub> در خوگ و گوساله تنها در ۲ اسید آمینه از ۱۰۲ اسید آمینه اختلاف دارند (۱۵). اما این حفاظت شدگی در طول تکامل در همه هیستون ها یکسان نیست. H<sub>3</sub> و H<sub>4</sub> حفاظت شده تر از H<sub>2</sub>A و H<sub>2</sub>B هستند و H<sub>1</sub> در انواع مختلف توالی های متفاوتی دارد. در H<sub>2</sub>A، H<sub>2</sub>B و H<sub>1</sub> نواحی انتهایی غنی از lys و Arg بیشترین تنوع تکاملی را نشان می دهند در حالی که ناحیه کروی میانی محافظت شده تر است (۷ و ۶).

### ۳) اتصالات هیستون ها

هیستون ها از نواحی مختلف خود توانایی برقراری اتصال را میان خودشان و با DNA دارند. این اتصالات منجر به میان کنش های هیستون - هیستون و هیستون - DNA می شود. در میان کنش های H<sub>2</sub>A، H<sub>2</sub>B، H<sub>3</sub> و H<sub>4</sub> ناحیه انتهای کربوکسیل دخیل بوده و

ناحیه انتهای آمین اغلب ارتجاعی و در خارج سطح قرار می‌گیرد.  $H_2A$  و  $H_2B$  با هم، و  $H_3$  و  $H_4$  با هم می‌توانند هترو دایمر تشکیل دهند. حد فاصل این هترو دایمرها به هم شبیه بوده و به موتیف Hand shake معروف است. انتهای کربوکسیل در هیستون‌ها اغلب مارپیچ  $\alpha$  است. یک مارپیچ طویل مرکزی توسط لوپ‌هایی که در دو انتهای آن قرار دارد به دو مارپیچ کوتاه‌تر متصل می‌شود. این ساختمان به نام Histone fold معروف است. (۱۸) بین مارپیچ‌ها تماس‌های بین مولکولی وجود دارد و هر حلقه، یک قطعه بین مولکولی با ساختار  $\beta$  به نام پل  $\beta$  (bridge -  $\beta$ ) تشکیل می‌دهد (۱۹).

در مدل جدید، تترامر  $(H_3 - H_4)_2$  به صورت V شکل در قسمت میانی اکتامر هیستونی قرار دارد. دایمرهای  $(H_2A - H_2B)$  به صورت دو ناحیه پهن در دو کناره این ساختمان V شکل واقع شده‌اند. شیار و حفره‌های سطح اکتامر هیستونی منجر به یک پیچش چپ گردان می‌شوند که DNA به دور آن می‌پیچد. (۱۹) در این پیچ، ۱۶ قطعه لوپ مربوط به ۸ هیستون وجود دارد که پس از روند دوتایی شدن هیستون‌ها، ۸ قطعه پل  $\beta$  موازی تشکیل می‌دهند. هر پل  $\beta$  حداقل ۲ اسید آمینه یا بار مثبت دارد که برای تماس با DNA اختصاص پیدا کرده‌اند (۱۹ و ۲۰).

اولین ناحیه مارپیچی هر هیستون در انتهای آمین نیز دومین موتیف اختصاصی برای اتصال با DNA را ایجاد می‌کند (۲۱ و ۲۲).

#### ۴) ساختمان کروماتین

چنانکه قبلاً به آن اشاره شد، کروماتین متشکل از مجموعه DNA همراه با پروتئین‌های هیستونی و پروتئین‌های غیر هیستونی است. کورنبرگ (Kornberg) در سال ۱۹۷۴ از نتایج مطالعات مختلفی مثل Crosslinking هیستون‌ها (۲۳)، مشاهدات میکروسکوپی