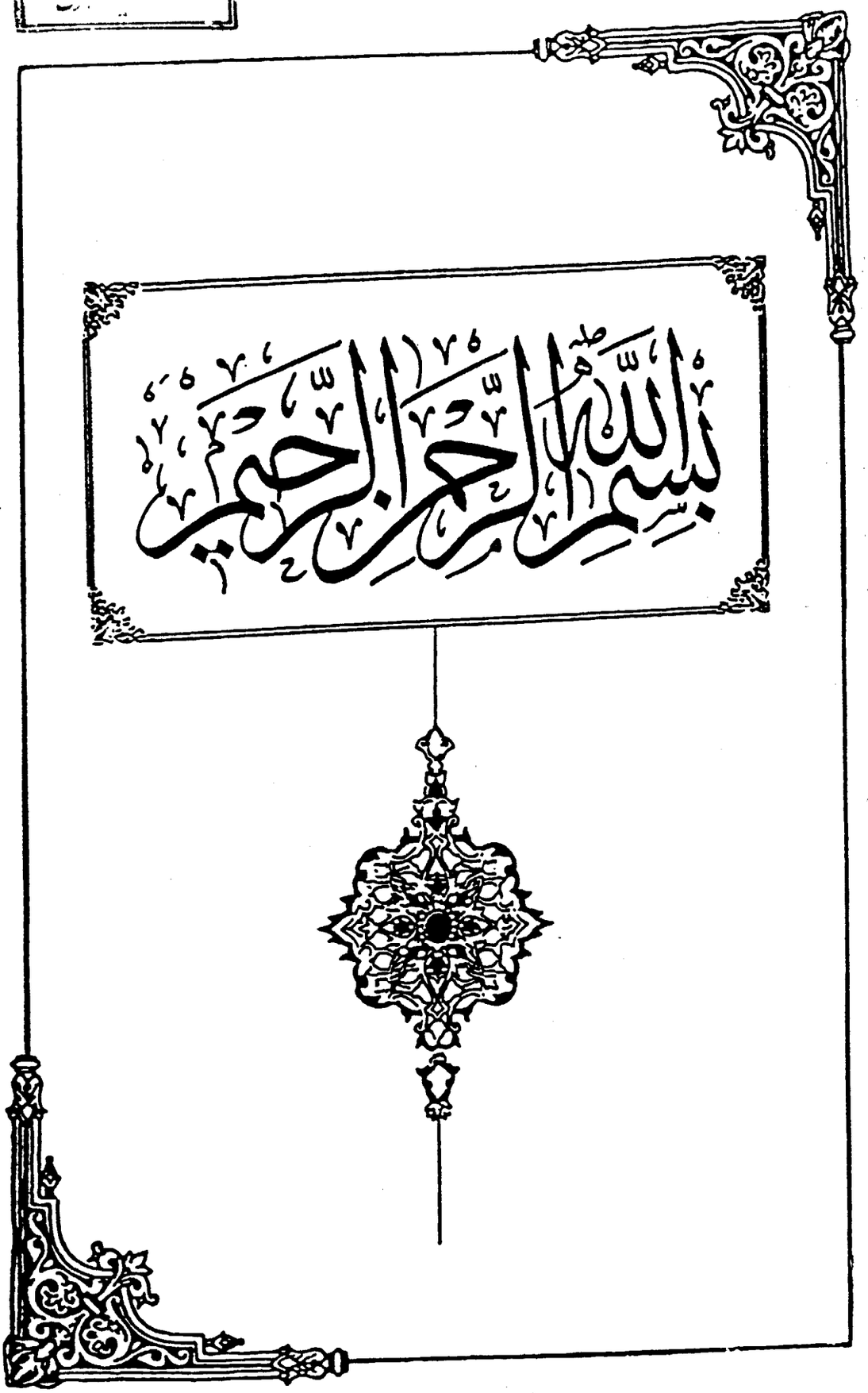
مرکز اطلاعات ... ایران
...



۳۱۸۳۱

۱۳۷۹ /۸/ ۸

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
قسمت مدارک

دانشگاه تهران

مرکز تحقیقات بیوشیمی – بیوفیزیک

پایان‌نامه:

برای دریافت درجه دکترای تخصصی (Ph.D.)

در رشته بیوشیمی

عنوان :

بررسی میانکنش داروی ضد سرطان دانومایسین با پروتئین کروموزومی هیستون H_1

استاد راهنما:

سرکار خانم دکتر عذرا ربانی

-8751

نگارش :

سید جلال زرگر

شهریور ۱۳۷۹

۳۱۸۳۱

أَعوذُ بِاللّهِ مِنَ الشَّيطانِ الرَّجيم، بِسمِ اللّهِ الرَّحمٰنِ الرَّحيمِ وَ بِهِ نَستَعينَ اِنَّهَ خَيرُناصِرٌ وَ مُعينٌ وَ صَلَّى اللّهُ عَلَى مُحَمَّدٍ وَآلِهِ الطّاهِرينَ

حمد و سپاس بیکران خالق حکیم و سبحانی را که هدایت نمود ما را، چه بسا هدایت نمی‌شدیم، قادر کریم و رحمانی که همواره بندگانش را از دریای بی‌پایان لطف و کرم خویش متنعم فرمود و قطرهٔ بسیار کوچکی از اقیانوس لایتناهی علم و دانش خود را بهره و روزی ما گردانید.

خدای من، معبود من، پناه من، محبوب من، همهٔ هستی من، ای عزیز جاوید؛ تو خود گواهی که این کار تحقیقی را با نام و یاد تو آغاز نمودم و عطر خوش و روح‌افزای ذکر تو و چهارده ستارهٔ درخشانت، مشعل فروزان راهم و گره‌گشای مشکلاتم در این دوران پر فراز و نشیب زندگی بود. اکنون نیز با حمد و ثنای بیکران تو آن را به پایان می‌برم و با تمام تار و پودم فریاد برمی‌آورم که تمامی مدارج و افتخاراتم از آن تو و مرهون عنایات واسعهٔ توست چرا که من بدون تو هیچم و بی‌توای رئوف مهربان، من از خود چیزی ندارم.

بارالها، مرا در زمره بندگان صالحت قرار ده و با مقرّبین درگاهت محشور فرما.

با درود و سلام فراوان به محضر یگانه منجی عالم بشریت، دوازدهمین اختر تابناک آسمان ولایت و امامت، قلب عالم امکان، حضرت ولی‌عصر عجّل اللّه تعالی فرجه الشّریف،

با درود بیکران به روان پاک بنیانگذار جمهوری اسلامی ایران، حضرت امام خمینی قدّس سرّه الشّریف،

با سلام به حضور ولی امر مسلمین جهان و رهبر معظم انقلاب اسلامی ایران، حضرت آیت اللّه خامنه‌ای مدّظلّه العالی،

با سلام و صلوات بر ارواح طیبه و ملکوتی کلیه شهیدان راه حق و حقیقت، از بخون خفتگان ارتفاعات سر به فلک کشیدهٔ مریوان و پیرانشهر تا شهیدان بی‌مزار صحرای سوزان فکّه و شلمچه. درود بی‌پایان به روان پاک آن مرغان آغشته به عشقی که چون جایشان در این دنیا نبود از خاک تا افلاک پرکشیدند و از ملک به ملکوت رسیدند، و با سلام و درود بر تمامی آزادگان سرافراز، مفقودین عزیز، جانبازان قهرمان، خانواده معظم این عزیزان و همهٔ افتخار آفرینان خطّهٔ ایران زمین در طول هشت سال دفاع مقدس و نبرد بی‌امان علیه استکبار جهانی (۱۳۵۹ تا ۱۳۶۷ هجری شمسی).

«مَنْ لَمْ یَشْکُرِ الْمَخْلُوقَ لَمْ یَشْکُرِ الْخَالِقَ»

اکنون که آخرین مرحله تحصیلات دانشگاهی خود را بپایان می‌برم برخود فرض می‌دانم تا از زحمات تمامی عزیزانی که به انحاء گوناگون مرا در طول مدت تحصیل یاری نموده‌اند قدردانی نمایم:

از استاد بسیار عزیز و ارجمندم سرکار خانم دکتر عذرا ربانی که از بدو آشنایی تا به امروز، پیشرفت و موفقیتهای علمی خود را مدیون زحمات بیدریغ و مرهون توجهات خاص ایشان می‌دانم و همواره از راهنمائیهای خردمندانه و توصیه‌های ارزندهٔ ایشان در طول انجام مراحل آزمایشگاهی و نیز در تدوین و تنظیم این پایان‌نامه بهره‌مند بوده‌ام کمال تشکر و قدردانی را می‌نمایم.

از اساتید گرانقدر: جناب آقای دکتر حسین نادری منش، جناب آقای دکتر بیژن فرزامی، جناب آقای دکتر بهرام گلیایی، جناب آقای دکتر عزت ا... کیهانی، جناب آقای دکتر ناصر قائمی و جناب آقای دکتر عبدعلی ضیایی که قبول زحمت فرموده، مطالعه و داوری این پایان‌نامه را تقبل نمودند، ممنون و سپاسگزارم.

از اعضاء محترم هیئت علمی مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک دانشگاه تهران که افتخار کسب فیض از محضر علمی ایشان در دو مقطع تحصیلی کارشناسی ارشد و دکتری نصیبم گشت بسیار متشکرم.

از دوستان بسیار خوب و صمیمی‌ام در آزمایشگاه بیوشیمی - بیوفیزیک ۲، خواهران گرامی خانمها: شبانی، جعفری، قدم، فلاح ، فرآورده، رضوی، عبدالصمدی، قاسمی، صدری، صراف و برادر عزیزم جناب آقای بغدادی سپاسگزاری می‌نمایم.

از همکاری صمیمانه استاد گرامی جناب آقای دکتر صبوری، سرکار خانم

رضایی کارشناس محترم آزمایشگاه تجهیزات عمومی و دوست عزیزم جناب آقای شاهرخ صفریان در خصوص استفاده بهینه از روشهای میکروکالریمتری، دناتوراسیون حرارتی و طیف‌سنجی فلوئورسانس نهایت تشکر را دارم.

از زحمات کارکنان محترم واحدهای مختلف مرکز تحقیقات بیوشیمی - بیوفیزیک از جمله : آموزش، امور دانشجویی، دفتر امور دانشجویان شاهد و ایثارگر، کتابخانه، اموراداری ، ماشین‌نویسی، تکثیر، رایانه، کارپردازی، حسابداری، عکاسی، طراحی، الکترونیک، تأسیسات، شیشه‌گری، انبار، سانتریفوژ، خدمات، غذاخوری و انتظامات بی‌نهایت سپاسگزارم.

از همکاران ارجمندم در دفتر امور دانشجویان شاهد و ایثارگر مرکز برادران بزرگوار: جناب آقای مهدی تقوایی، جناب آقای سید امید رعنایی سیادت، جناب آقای مهران میراولیایی و جناب آقای نجیم‌الدین فلاحتی ممنون و متشکرم.

از مساعدت و همکاری صمیمانه دوستان گرامی و عزیزم: جناب آقای دکتر مرتضی ستاری، جناب آقای سیدفضل ا... موسوی و جناب آقای علیرضا نظری در طول انجام این پایان‌نامه بسیار سپاسگزارم.

تقدیم به :

استاد عالیقدر، معلم متواضع و آموزگار بسیار عزیزم، خواهر مکرّمه سرکار خانم دکتر عذرا ربّانی که توفیق کسب فیض از گنجینهٔ گرانبهای علم و دانش ایشان نصیبم گردید. براستی که در امر تحقیق و پژوهش، هرآنچه که می‌دانم از او آموخته‌ام و هر آنچه که نمی‌دانم باید از او بیاموزم، از درگاه خداوند تبارک و تعالیٰ، صحت و سلامت و توفیقات روزافزون آن استاد فرزانه را در راه خدمت به نظام مقدس جمهوری اسلامی بویژه اعتلای امور آموزشی و پژوهشی دانشگاهها و موسسات آموزش عالی کشور مسئلت می‌نمایم.

تقدیم به :

همسر فداکار، ایثارگر و مهربانم که کمکهای فراوان، صبر و بـردباری، و گـذشت و اسـتقامت او مـوجبات انـجام ایـن پایان‌نامه را فراهم آورد.

تقدیم به :

فرزندان دلبند و نورچشمان عزیزم سیدحسین و سیدسجاد که در این راه سختی‌های زیادی را متحمل شدند و من امیدوارم سـربازان شـایسته‌ای بـرای آقـا امـام زمـان (عـج) بـاشند.

تقدیم به :

پدر ارجمند و بزرگوار و مادر عزیز و مهربانم که همواره خورشید وجودشان روشنی‌بخش زندگی‌ام، نگاه پر مهرشان گرمی‌بخش وجودم و دعای خیرشان بدرقهٔ راهم بوده است.

تقدیم به :

خواهران گرامی و برادران عزیزم که در طول دوران تحصیل از مساعدتهای بی‌شائبه آنان برخوردار بوده‌ام.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

چکیده فارسی ..... ب

چکیده انگلیسی ..... ج

فصل اول : مقدمه ۱

الف - کروماتین ۲

ب - آنتراسیکلین‌ها ۲۰

هدف ۳۶

فصل دوم : مواد و روشها ۳۸

الف - مواد ۳۹

ب - روشها ۴۱

۱- طیف سنجی ماوراء بنفش ۴۱

۲- طیف‌سنجی فلوئورسانس ۴۴

۳- غیرطبیعی شدن حرارتی ۴۷

۴- دیالیز تعادلی ۴۹

۵- میکروکالریمتری ۵۱

فصل سوم : نتایج ۵۴

فصل چهارم : بحث ۱۴۹

منابع ۱۶۱

چکیده:

هیستون H_1 پروتئینی است با وزن مولکولی ۲۱ کیلو دالتون که نسبت به اسیدآمینه لیزین بسیار غنی بوده و در شکل‌گیری و ثبات ساختمان کروماتین نقش مهمی را عهده‌دار می‌باشد. دانومایسین یکی از مشهورترین داروهای آنتراسیکلین است که خاصیت آنتی‌بیوتیکی دارد و در معالجه سرطانهای مختلف از طریق شیمی درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. مطالعات دانشمندان نشان داده است که هدف اصلی این دارو در هسته سلول، DNA بوده و در نتیجه فرآیندهای حیاتی مهمی نظیر همانندسازی DNA و رونویسی RNA و بدنبال آن تقسیم و تکثیر سلولی را مهار می‌نماید.

در مطالعهٔ حاضر میانکنش دانومایسین با هیستون H_1 در شرایط قدرت یونی مختلف، در بافر فسفات ۲۰ میلی‌مولار (pH=۷) و ۱ میلی‌مولار EDTA در دمای اطاق مورد بررسی قرار گرفت و بدین منظور روشهای طیف سنجی ماوراء بنفش، طیف سنجی فلوئورسانس، غیرطبیعی شدن حرارتی، دیالیز تعادلی و میکروکالریمتری مورد استفاده واقع شدند. نتایج بدست آمده نشان می‌دهند که دانومایسین میزان جذب هیستون H_1 در طول موج ۲۱۰ نانومتر و میزان نشر فلوئورسانس آن را در طول موج ۳۲۵ نانومتر کاهش داده و سبب هیپووکرومیسیتی طیف جذبی و طیف نشری این پروتئین می‌شود. این دارو نقطه ذوب (Tm) هیستون H_1 را نیز افزایش می‌دهد. لازم بذکر است که این اثرات با افزایش غلظت نمک کلرور سدیم در محیط (افزایش قدرت یونی محیط) تشدید می‌گردد. مطالعات دیالیز تعادلی از وجود دو جایگاه یکسان و غیر مستقل برروی هیستون H_1 برای اتصال دانومایسین حکایت می‌نماید بطوریکه اتصال مولکولهای دارو به این جایگاهها بصورت تعاونی مثبت صورت می‌پذیرد و این درحالیست که با افزایش قدرت یونی محیط، از میزان متعاون بودن این فرآیند کاسته می‌شود. محاسبه برخی از پارامترهای ترمودینامیکی نظیر تغییرات انرژی آزاد، آنتالپی و آنتروپی میانکنش دانومایسین با هیستون H_1، از مقادیر منفی برای ΔG و مقادیر مثبت برای ΔH و ΔS حکایت دارد. در مجموع نتایج حاصل از این تحقیق پیشنهاد می‌نماید که پروتئین هیستونی H_1 می‌تواند بعنوان هدفی جدید برای داروی ضد سرطان دانومایسین در نظر گرفته شود.

ABSTRACT:

Histone H_1 is a very lysine rich histone fraction of chromatin which appears to play an important role in the compaction and stability of the structure of chromation. This protein is not involved in the core particle part of nucleosmes but it binds to linker DNA between successive nucleosomes and subsequently facilitates the folding of the higher-order 30 nm chromatin fiber.

Daunomycin is an antitumor anthracycline antibiotic widely used as a chemotherapeutic agent for the treatment of various cancers. In this present study we have investigated the interaction of daunomycin with the purified calf thymus histone H_1 in solution using five sensitive techniques of ultraviolet and fluorescence spectroscopy, thermal denaturation, equilibrium dialysis and microcalorimetry in 20 mM phosphate buffer pH 7.0 and 1 mM EDTA under several ionic strengths at room temperature. The results show that daunomycin decreases the absorbance of H_1 at 210 nm and its fluorescence emission at 325 nm, induces hypochromicity in the absorbance and emission spectrums of this protein, also the Tm of histone H_1 is increased in the presence of the drug. Increasing ionic strength elevates these effects. Histone H_1 has two binding sites for daunomycin, the drug molecules bind to them in a positive cooperative manner and Hill coefficient is m= 2.03. Moreover thermodynamic parameters represent a negative ΔG and positive ΔH and ΔS values , The results suggest that histone H_1 can be considered as a target for daunomycin binding at the chromatin level.

فصل اول

مقدمه

مقدمه

الف - کروماتین (Chromatin):

سلولهای زنده از نقطه نظر ساختمان به دو دسته کلی پروکاریوت (Prokaryote) و یوکاریوت (Eukaryote) تقسیم می‌شوند. تفاوت اصلی این دو دسته سلول در چگونگی توزیع اطلاعات وراثتی و مکانیسم تنظیم بیان ژن در آنها می‌باشد.

سلولهای پروکاریوت فاقد هسته بوده، اجزای هسته در سراسر سیتوپلاسم پراکنده می‌باشند و ماده ژنتیکی در ناحیه مرکزی سلول بخش فشرده و متراکمی را پدید می‌آورد که نوکلوئید (Nucloid) نامیده می‌شود. در مقابل در سلولهای یوکاریوت که دارای هسته کامل (Pure nuclei) می‌باشند، ماده ژنتیکی به همراه ترکیباتی دیگر به شکل کمپلکس پیچیده‌ای درون هسته سلول جای می‌گیرد و بوسیله غشایی دولایه از سیتوپلاسم جدا می‌گردد. این غشاء دارای منافذی (Nuclear pores) می‌باشد که امکان برقراری ارتباط میان اجزای هسته و سیتوپلاسم را مهیا می‌سازند (۱-۳).

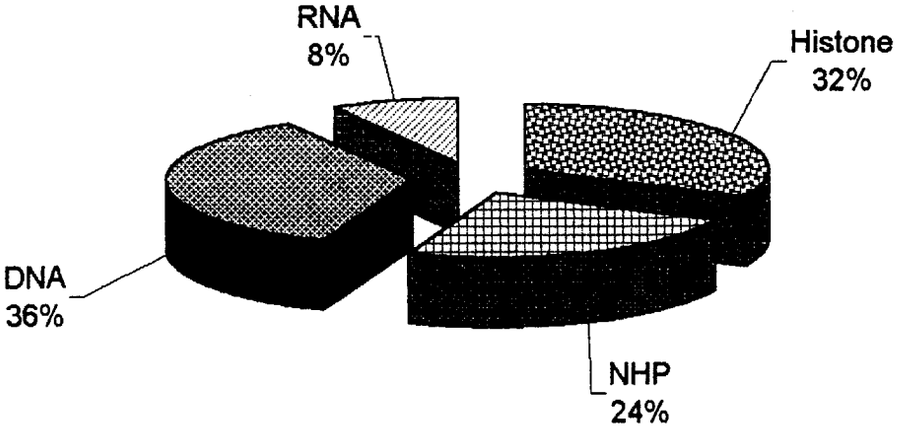
ماده ژنتیکی سلولهای یوکاریوت در مرحله انترفاز (Interphase) بصورت شبکه‌ای گسترده سراسر هسته را می‌پوشاند چون در این حالت بوسیله رنگهای قلیایی رنگ‌پذیر می‌باشد، کروماتین (Chromatin) نامیده می‌شود. این شبکه در برخی از مناطق توسط یک لایه پروتئینی موجود در لایه درونی غشاء هسته بنام Lamina که از سه زیر واحد تشکیل می‌گردد به غشاء هسته متصل می‌باشد (۱ و ۳). در مرحله متافاز و زمان تقسیم سلولی، این شبکه گسترده پس از متراکم شدن و تاخوردگیهای بسیار به یک سری اجسام میله‌ای شکل تبدیل می‌شود که در این حالت کروموزوم (Chromosome) اطلاق

می‌گردد (۱ و ۴-۷).

اجزای تشکیل دهنده کروماتین :

کروماتین یک ترکیب کمپلکس نوکلئوپروتئینی (Nucleoprotein) است که از مشارکت دو دسته از مهمترین ماکرومولکولهای حیاتی یعنی اسیدهای نوکلئیک و پروتئینها شکل می‌گیرد. مجموعه ترکیبات موجود در ساختمان کروماتین، دو دسته اصلی پروتئین‌های هیستونی (Histone Proteins) و غیر هیستونی (Non Histone Proteins) ، و اسیدهای نوکلئیک DNA و RNA را شامل می‌شود (۱، ۳، ۶ و ۸).

در سلولهای مختلف نسبت وزنی DNA به پروتئین‌های هیستونی تقریباً ثابت و برابر ۱/۱-۱/۳ می‌باشد و این در حالیست که نسبت DNA به پروتئین‌های غیرهیستونی متغیر بوده (۰/۸-۰/۲) و این نسبت برحسب میزان فعالیت و نوع سلول از بافتی به بافت دیگر متفاوت است. بطور کلی سلولهایی که فعالیت متابولیکی بالایی دارند و از نظر بیان ژن فعالترند دارای مقادیر بیشتری از پروتئین‌های غیرهیستونی می‌باشند. فراوانی نسبی هریک از ترکیبات چهارگانه شرکت کننده در ساختمان کروماتین در شکل (۱-۱) نشان داده شده است (۹ و ۱۰).



شکل (۱-۱) : فراوانی نسبی ترکیبات تشکیل‌دهنده کروماتین