

مطالعه میان کنش سالویژنین با DNA

نویسندگان: زهره حبیبی^{۱*}، زهیر محمدحسن^۲، شکوفه نوری^۳، ولی‌اله مظفری^۴،
مریم یوسفی^۵، مهدی محمدی^۵، لیلا حسینی^۶

- ۱- استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۲- استاد، گروه ایمنی شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۳- استادیار، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه بهشتی، تهران، ایران
- ۴- استادیار، گروه گیاه شناسی، گروه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع، کرج، ایران
- ۵- دانشجو دکترا، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران
- ۶- استادیار، گروه بیوفیزیک، دانشگاه زنجان، ایران

E-mail: zohre1340@hotmail.com

* نویسنده مسئول: زهره حبیبی

چکیده

مقدمه و هدف: بررسی میان‌کنش سالویژنین با DNA به منظور شناسایی ساختار مولکولی آثار ضد سرطانی سالویژنین

مواد و روش‌ها: سالویژنین از *Tanacetum canescens* و DNA از تیموس گوساله جدا و خالص‌سازی شد؛ سپس میان‌کنش سالویژنین با DNA در بافر تریس ۰/۰۵M، PH برابر ۷/۴ و دمای ۲۵°C با روش‌های مختلف مطالعه شد.

نتایج: طیف‌های جذبی DNA در حضور غلظت‌های مختلف هریک از لیگاندهای بالا نشان داد که DNA با سالویژنین میان‌کنش می‌کند و با تشکیل کمپلکس، جذب در طول موج ۲۶۰nm افزایش می‌یابد. تغییرات جذب DNA بر اثر لیگاند نشان‌دهنده تغییرات ساختاری در آن است؛ همچنین با کمک داده‌های به‌دست‌آمده از کاهش نشر کمپلکس DNA با اتیدیوم برماید توسط لیگاند بالا و آنالیز اسکاچارد، مشخص شد که ساختار کاهش نشر از طریق مهار غیررقابتی است؛ یعنی اتصال سالویژنین به DNA با مکانیزم غیرفروروندگی و به‌احتمال از طریق اتصال به شیار کوچک صورت می‌گیرد.

نتیجه‌گیری: نتیجه می‌گیریم که سالویژنین که بعنوان یک داروی ضد سرطان شناخته شده است یکی از مکانیسم‌های عمل آن برهمکنش با آپ‌آ است.

واژگان کلیدی: سالویژنین، DNA، میان‌کنش

دوماهنامه علمی-پژوهشی
دانشگاه شاهد
سال هیجدهم - شماره ۹۲
اردیبهشت ۱۳۹۰

دریافت: ۱۳۸۹/۱۱/۶
آخرین اصلاح‌ها: ۱۳۹۰/۲/۷
پذیرش: ۱۳۹۰/۲/۸

مقدمه

اتصال مولکول‌های مختلف به DNA از جمله پروتئین‌های تنظیمی شرایطی را فراهم می‌آورد که طی آن، سلول به پاسخ‌گویی نسبت به شرایط محیطی قادر می‌شود که از جمله این پاسخ‌ها تغییر در دسترسی به توالی‌های خاص یا القا خمیدگی در ساختار DNA است (۱). پدیده میان‌کنش DNA و لیگاند که طی آن، یک کمپلکس بزرگ‌تر به وجود می‌آید، نقشی مهم در پدیده‌های زیستی، مانند بیان ژن یا همانندسازی DNA، بازی می‌کند. شمار زیادی از لیگاندهای طبیعی و سنتزی شناسایی شده‌اند که قابلیت میان‌کنش با DNA را دارند. بسیاری از این ترکیب‌ها توانایی شناسایی توالی‌های خاص از DNA را دارند (۲، ۳).

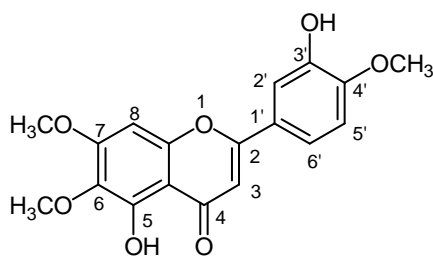
چنین مولکول‌هایی از نظر درمانی، ترکیب‌هایی ارزشمند محسوب می‌شوند. (۴، ۵) بررسی‌ها نشان داده‌اند که شیار کوچک DNA دارای یک لایه آب بوده، عرض این شیار در رشته‌های غنی از جفت بازهای A.T کم است؛ در نتیجه، اتصال اختصاصی دارو به DNA دست‌کم در یکی از دو شیار اتفاق می‌افتد و اهمیت آن دو، ویژگی بازها (Sequence-Selectivity) است (۶، ۷) و از طرفی، مشخص شده‌است که مولکول‌های کوچکی که ویژگی توالی (sequence-specific) دارند، به‌طور ترجیحی در شیار کوچک متصل می‌شوند، به‌احتمال، دلیل آن وجود سطح تماس بهتر در این شیار و مطلوب بودن میان‌کنش و اندروالس است (۵، ۱۰). بسیاری از این ترکیب‌ها جایگاه‌های غنی از A.T را برای اتصال ترجیح می‌دهند (۸، ۹).

دلایل بررسی اتصال مولکول‌های کوچک به DNA را می‌توان به دو دسته دلایل تجربی و بنیادی تقسیم کرد. از دلایل تجربی آن، کارایی بسیاری از مولکول‌های کوچک در جایگاه ترکیب‌های دارویی است که دانستن نحوه

اتصال آنها به DNA برای شناخت دقیق ساختار عمل آنها و همچنین توسعه و پیشرفت اصول طراحی ترکیب‌ها با فعالیت بالا ضروری است (۸)؛ اما از جنبه بنیادی بررسی اتصال این ترکیب‌ها به DNA، نظام تعریف‌شده-ای را به دست می‌دهد که آشنایی با اصول انرژی آزاد تشکیل کمپلکس‌های بیومولکولی را میسر می‌سازد. (۹، ۱۰، ۱۱)

از جمله لیگاندهایی که به‌طور گسترده، ساختار میان-کنش آن با DNA بررسی شده‌است، ترکیب‌های فلاوونوئیدی، قابل اشاره‌اند (۱۲، ۱۳، ۱۴). امروزه داروهای ضدسرطان گوناگونی در جهت درمان یا بهبود استفاده می‌شوند که هدف این داروها اغلب، مولکول DNA است (۱۲). به‌طور عمده این داروها پس از واکنش موجب پایدارشدن ساختارهای موقت در DNA یا القای ساختارهای جدید یا پوشاندن جایگاهی در DNA را موجب می‌شوند (۱۵، ۱۶).

ترکیب‌های موجود در گیاهان در علوم پزشکی و درمانی اهمیت فراوانی داشته‌اند؛ برای نمونه برای سالویژنین‌ها تأثیرهای ضدسرطانی، ضدجوش‌زایی و تعدیل ایمنی دیده شده‌است (۱۷). یکی از اثرهای مهم بیولوژیک آنها جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی و ممانعت از ازدیاد و تقسیم این سلول‌هاست، درحالی‌که بر سلول‌های طبیعی هیچ اثری ندارد (۱۸). بیشتر تحقیقات انجام‌شده در زمینه اثرات تشکیل‌دهنده‌های مختلف مربوط به مطالعه آثار سلولی آنهاست، اما تأثیر و اجزای آن بر ساختارهای مولکول‌های زیستی تاکنون بررسی نشده‌است. در این تحقیق، اثرهای یک فلاوونوئید (سالویژنین) استخراج‌شده از گیاه *Tanacetum canescens* بر ساختار DNA در جایگاه یکی از ساختارهای مولکولی محتمل در اعمال آثار ضدسرطانی به طریق آزمایشگاهی بررسی می‌شود (۱۹).



(۱)

مواد و روش ها

و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت های مرک و سیگما خریداری شد.

برای به دست آوردن ضریب جذب مولی، محلولی ذخیره غلیظ از ترکیب های مورد آزمایش در بافر تریس تهیه شد؛ در ادامه، رقت هایی مختلف از محلول ها فراهم آمد. با رسم نمودار جذب مولی برای هریک از نمونه ها به دست آمد.

تمام اندازه گیری های طیف سنجی نوری در این تحقیق با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر دو پرتوی شیمادزو مدل ۳۱۰۱ انجام شد. بافر تریس ۰/۰۵ مولار با PH برابر ۷/۴ در دمای اتاق برای تمام مطالعات میان کنش ها انتخاب شد. بررسی میان کنش سالوینین با DNA از طریق طیف سنجی نوری در این روش محلول DNA با غلظت مشخص با محلول سالوینین تیترا شده، سپس طیف جذبی DNA در محدوده ۲۰۰nm تا ۵۰۰ nm مورد بررسی قرار گرفت.

اندازه گیری های فلوریمتری با اسپکتروفلوریمتر شیمادزو مدل RF-۵۰۰۰ انجام شد. مطالعه فلوریمتری میان کنش اتیدیوم بر مایند با DNA در غیاب و حضور سالوینین بر طبق روش استروتکمپ در سال ۱۹۹۴ انجام شد (۲۱). طول موج برانگیختگی اتیدیوم بر مایند ۵۲۵ nm و طول موج نشری آن ۵۸۴ nm در شرایط آزمایش تعیین شد.

نتایج

نتایج حاصل از عصاره گیری گیاه

از گیاه *T. canescens* فلاوونوئید ۵- هیدروکسی ۷،۶،۴-تری متوکسی فلاون (۱) خالص سازی شد؛ نام

به منظور جداسازی و خالص سازی سالوینین، ۵۰۰ گرم از اندام های هوایی و خشک شده گیاه به مدت ۲۴ ساعت در کلروفرم خیسانده شد؛ سپس حلال با استفاده از تبخیرکننده چرخان تبخیر شد. برای چربی گیری، عصاره به دست آمده در حداقل متانول حل شده و در فریزر به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفت؛ پس از صاف کردن و تبخیر حلال با تبخیرکننده چرخان، عصاره باقی مانده به شکل یک عصاره غلیظ سبزرنگ به دست آمد و برای جداسازی اجزای آن از کروماتوگرافی ستونی و برای پرکردن ستون از سیلیکاژل مرک (۶۰/۰/۰۶-۰/۰۹mm) استفاده شد. برای شستشوی ستون، حلال غیرقطبی پترولیوم اتر به کار گرفته شد و سپس با افزایش دی اتیل اتر قطبیت افزایش یافت. حجم حلال هایی که در هر نوبت اضافه می شد ۱۰۰ml و حجم اجزای جمع آوری شده در هر ارلن ۵۰ml بود. در نهایت، ستون با متانول شسته شد تا تمامی اجزا باقی مانده از ستون خارج شود. از اجزای به دست آمده کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از ورقه های آلومینیمی پوشیده از سیلیکا ژل تهیه شد. اجزای مشابه به هم اضافه شدند و برای خالص سازی بیشتر دوباره از کروماتوگرافی ستونی (با ستون های کوچک تر) و کروماتوگرافی لایه نازک (با استفاده از صفحات شیشه ای) استفاده شد برای شناسایی نمونه های خالص شده از روش های مختلف NMR و طیف جرمی استفاده شد.

DNA با وزن مولکولی بالا بر اساس روشی که در گذشته ارائه شده بود، از تیموس گوساله استخراج و خالص سازی شد (۲). مواد شیمیایی، نظیر اتیدیوم بر مایند

(گروه کربونیل) به $\delta = 182 \text{ ppm}$ را سبب می‌شود؛ در صورتی که اگر به جای OH، گروه OCH_3 در این موقعیت قرارگیرد، C-4 می‌باید در حدود $\delta = 176 \text{ ppm}$ ظاهر می‌شد؛ بدین ترتیب در پایین‌ترین میدان، C-4 در $182/66 \text{ ppm}$ ظاهر شده، پس از آن به ترتیب پیام‌های زیر مشاهده می‌شوند: C-2 در $164/01 \text{ ppm}$ ، C-4' در $153/02$ ، C-7 در $158/71$ ، C-9 در $153/22$ ، C-5 در $153/02$ ، C-6 در $132/57$ ، C-2' و C-6' در $128/00$ ، C-1' در $123/50$ ، C-3' و C-5' در $114/51$ ، C-10 در $106/10$ ، C-3 در $104/08$ ، C-8 در $90/57$. سه گروه متوکسی در موقعیت C-6، C-7 و C-4' به ترتیب در $60/87 \text{ ppm}$ ، $56/33$ و $55/55$ ظاهر شده‌اند.

ویژگی ساختاری DNA تیموس گوساله (ctDNA) با غلظت 75 میکروگرم بر میلی‌لیتر، نسبت حاصل از جذب در 260 نانومتر به 280 نانومتر، نشان‌داد نمونه‌های استخراج شده خالص‌اند (ctDNA=1.86).

مطالعه میان‌کنش سالویژنین - DNA با استفاده از طیف سنجی نوری

در بررسی طیف سنجی نوری مشخص شد، افزودن سالویژنین به DNA، افزایش جذب در طول موج nm 260 را سبب شد (نمودار 1)، تغییرهای پیک در 260 nm از القای تغییرات ساختمانی در DNA در اثر میان‌کنش حکایت دارد.

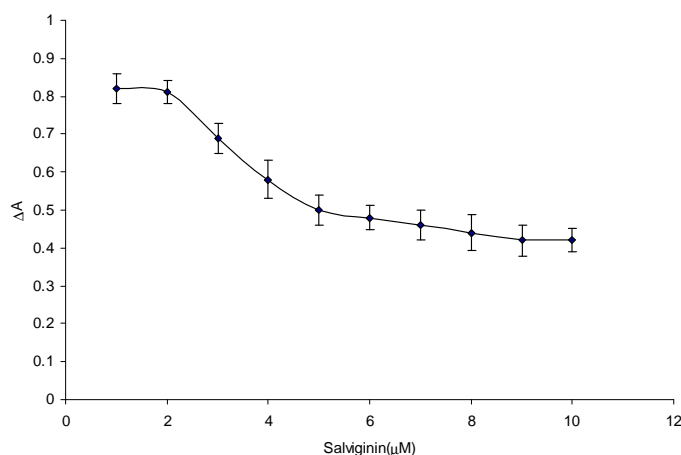
دیگر این ترکیب سالویژنین است. شکل ظاهری این ترکیب به صورت کریستال‌های زردرنگ با نقطه ذوب 185° است و از فرکشن‌های 14-16 (از مجموع 25 فرکشن) در قطبیت حلال پترولیوم اتر 90 درصد- اتیل استات 10 درصد جداسازی و شناسایی شد.

تفسیر طیف $^1\text{H NMR}$ سالویژنین

هیدروژن‌های حلقه B به صورت یک سیستم اسپینی AX در $\delta = 7/84 \text{ ppm}$ و $\delta = 7/01 \text{ ppm}$ با ثابت جفت شدن $8/5 \text{ Hz}$ که به ترتیب مربوط به هیدروژن‌های 5'، 3' و 2' است، ظاهر می‌شود. پیام مربوط به هیدروژن‌های H-3 در $\delta = 6/62 \text{ ppm}$ و $\delta = 6/57 \text{ ppm}$ به ترتیب در $3/99 \text{ ppm}$ آشکار می‌شوند؛ سه گروه متوکسی نیز در $3/94$ و $3/91$ دیده می‌شوند؛ پیک مربوط به چربی هم در $\delta = 1/26 \text{ ppm}$ مشاهده می‌شود. پیام مربوط به OH فنولی (C-5) که در بسیاری از موارد در بالاتر از 12 ppm ظاهر می‌شود، (به دلیل پیوند هیدروژنی درون مولکولی با گروه کربونیل) در طیف غایب است. برای صحت وجود OH فنولی از ترکیب مورد نظر طیف IR گرفته و وجود OH تأیید شد.

تفسیر طیف $^{13}\text{C NMR}$ ترکیب سالویژنین

وجود OH در موقعیت کربن شماره 5 با مقایسه طیف $^{13}\text{C NMR}$ به دست آمده با مقالات منتشر شده اثبات شدنی است. وجود OH در این موقعیت، دشیلد شدن C-4



نمودار 1. منحنی تغییرهای جذب DNA با غلظت 0.1 mM در 260 nm اثر تیتراژ با سالویژنین

بررسی اثر سالویژنین بر اتصال اتیدیوم برماید (EtBr) به DNA

$$\frac{v}{[D]} = nk - vk \quad v = [D]_b / [DNA]_t$$

از این مقدار می‌توان، مقدار عددی n (حداکثر تعداد جایگاه اتصال لیگاند، روی ماکرومولکول) و k (ثابت پیوندی ذاتی) را تعیین کرد.

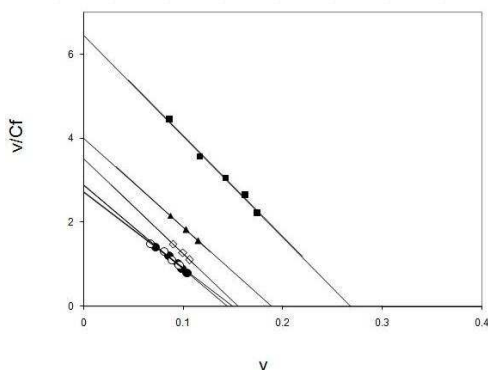
سپس بر اساس روش ارائه‌شده با استروکتکمپ (۹) نمودار اسکاچارد برای اتصال اتیدیوم برماید به DNA در غیاب و حضور لیگاند رسم شد.

$$v/C_f = nK - vK$$

به طوری که v نسبت لیگاند پیوندشده به غلظت (جفت باز) DNA، C_f غلظت لیگاند آزاد، n حداکثر مقدار v, K ثابت پیوندی ذاتی اتصال اتیدیوم به DNA است. با رسم نمودار تجربی v/C_f بر حسب v مقدار عددی n یا حداکثر تعداد جایگاه‌های پیوندی بر جفت بازهای DNA، از نقطه تقاطع نمودار با محور x به دست می‌آید؛ همچنین ثابت پیوندی ذاتی، K از ضریب زاویه نمودار خطی مذکور به دست می‌آید. معادله اسکاچارد فقط برای سیستم‌هایی با جایگاه‌های پیوندی یکسان و غیروابسته به کار می‌رود.

اتیدیوم برماید یک داروی ضدتریپانوزومی (نوعی انگل تک سلولی) است که سنتز DNA را در بسیاری از ارگانیسم‌ها مهار می‌کند (۱۰). بر اثر اتصال اتیدیوم برماید به DNA، نشر فلورسانس اتیدیوم برماید افزایش می‌یابد. در صورت حضور لیگاند دیگری در محیط که برای اتصال به DNA با اتیدیوم برماید رقابت کند، تغییراتی در نشر اتیدیوم ایجاد می‌شود که از طریق آن می‌توان به ساختار اتصال لیگاند دوم پی برد (۹). شرط اول در این آزمایش، آن است که لیگاند مورد مطالعه در طول موج‌های برانگیختگی یا نشری اتیدیوم برماید تداخل جذب و نشر نداشته باشند، در این مطالعه، شرط مذکور در مورد سالویژنین صادق است؛ بنابراین به منظور بررسی مکانیزم میان‌کنش سالویژنین با DNA، از این روش استفاده شد، یعنی به کمپلکس DNA-EtBr مقادیر متفاوتی از لیگاند اضافه شد و تغییرهای نشر EtBr مورد مطالعه قرار گرفت.

معادله اسکاچارد بدین صورت است:



نمودار ۲. منحنی‌های اسکاچارد دیده می‌شود و تغییرهای پارامترهای n و K در جدول پایین نشان داده شده است.

جدول ۱. مقادیر n, K به دست آمده در اتصال اتیدیوم بر مایند به ctDNA در حضور غلظت‌های سالویژنین

ctDNA		غلظت سالویژنین (μM)
Ka (μM^{-1})	n	
22.639	0.28	0.5
21.188	0.18	0.8
18.123	0.14	1.1

بحث

هیدروفوب لیگاند از محلول به شیار کوچک است و در مرحله بعد، پیوندهای مولکولی غیرکوالان میان لیگاند و گروه‌های موجود در شیار برقرار می‌شود (۶).

تاکنون خواص مختلف فیزیوژنیک برای سالویژنین گزارش شده‌است که یکی از مهم‌ترین آنها، خاصیت ضدسرطانی آن است (۱۰).

بررسی‌های اتصال ساختاری DNA نشان داده‌است که هر دو شیار کوچک و بزرگ آن می‌توانند به عنوان پذیرنده پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک عمل کنند (۱). شیار کوچک DNA، یک لایه آب داشته، عرض این شیار در رشته‌های غنی از جفت بازهای A.T کم اما ساختار سلولی و مکانیزم‌های مولکولی این اثرها هنوز ناشناخته‌است. یکی از ساختارهای مولکولی محتمل برای اعمال آثار، همانند سایر داروهای ضدسرطان، میان‌کنش سالویژنین با DNA از طریق ایجاد کمپلکس با آن و اعمال آثار ساختاری بر DNA است.

در این تحقیق، سالویژنین از *Tanacetum Canescens* تخلص شد و اثرهای ساختاری آنها بر DNA با روش‌های گوناگون مورد مطالعه قرار گرفت. تغییرات طیف جذبی DNA در طول موج ۲۶۰nm نشان‌دهنده القای تغییرهای ساختاری در آن با سالویژنین در اثر تشکیل کمپلکس و افزایش جذب در این ناحیه بیانگر نوعی باز شدن ساختار DNA و ناپایداری آن است. با افزایش غلظت لیگاند، غلظت کمپلکس نیز زیاد می‌شود تا اینکه DNA اشباع شود و تغییرهای جذب به حدی ثابت برسد.

مولکول DNA در محلول آبی به فرم ساختاری B وجود دارد. شیار بزرگ DNA به طور کامل، وسیع بوده، دارای گروه‌های عاملی متعددی در لبه جفت بازهاست؛ در حالی که شیار کوچک بسته‌تر است و تعداد کمتری از گروه‌های عاملی را در بر دارد. علاوه بر فرم طبیعی B، وجود فرم‌های متعدد ساختاری دیگر در مولکول DNA نشان‌دهنده نوعی انعطاف‌پذیری در ساختار آن است (۱). اتصال مولکول‌های مختلف به DNA از جمله پروتئین‌های تنظیمی، شرایطی را فراهم می‌آورد که طی آن، سلول به پاسخ‌گویی نسبت به شرایط محیطی قادر می‌شود که از جمله این پاسخ‌ها تغییر در دسترسی به توالی‌های خاص یا القای خمیدگی در ساختار DNA است (۲). به وجود آمدن تغییر در ساختار DNA به احتمال در کنترل بیان ژن مؤثر است؛ لذا ایجاد تغییرهایی از این نوع می‌تواند هدفی برای استفاده از مولکول‌های کوچکی باشد که به DNA متصل می‌شوند (۲). مدت زمان زیادی است که مطالعات گوناگونی روی نحوه میان‌کنش مولکول‌های کوچک با DNA انجام گرفته، به احتمال، این ترکیب‌ها پس از این میان‌کنش‌ها، پایداری ساختارهای موقت در DNA یا القای ساختاری جدید یا پوشاندن جایگاهی در DNA را سبب می‌شوند که در آن صورت، فرایندهای طبیعی که در این جایگاه فعالیت دارند، تغییر می‌کند (۲، ۵ و ۹).

برخلاف سایر انواع اتصال‌ها، میان‌کنش در شیار کوچک، تغییر زیادی در ساختار DNA نیاز ندارد. بر اساس شواهد ساختاری موجود، پیشنهاد شده‌است که طی فرایند اتصال، تغییرات ساختاری کمی در DNA ایجاد می‌شود در نتیجه، مدل فرضی اتصال این ترکیب‌ها به DNA دو مرحله‌ای است؛ مرحله اول، انتقال

منابع

1. Parkin DM Clayton D Black RJ Masuyer E Friedl HP Ivanov E et al. Childhood leukemia in Europe after Chernobyl: 5 year follow-up. *Br J Cancer*-12-1006; 73; 1995.
2. Geierstanger B.H Wemmer D.E complexes of the minor groove of DNA: *Annu. Rev. Biophys. Biomol Struct* 463-493;24; 1995.
3. Nelson S.M Lennette R.F Denny A.w DNA and chromosome-varied targets for chemotherapy *Cell and Chromosome* ;2004.
4. Chaires J.B Drug-DNA interactions *Current: Opini. Struct. Biol* 314-320; 8; 1998.
5. Han H Hurlley L.H G-quadruplex DNA: A potential target for anti-cancer drug design: *Tips* 136-42; 21;2000.
6. Ren J Charies B.J sequence and structural selectivity of nucleic acid binding ligands: *Biochemistry* 16067-16075; 38; 1999.
7. Chaires J.B Energetics of Drug-DNA interaction: *Biophys. Chem* 201-215; 64; 1998.
8. Bailly C Chaires J.B Sequence-specific DNA minor groove binders: Design and synthesis of Netropcin and Distamycin analogus. *Bioconjugat. Chem* 13-523; 95; 1998.
9. Ren J Jenkins T.C Chaires J.B Energetics of DNA interaction reactions: *Biochem*:8439-8447;;39;2000.
10. Smolian I.V Demidov V.V Frank-Kamenetskii M.D Pausing of DNA polymerases on dulex DNA templates due to ligand binding in vitro: *J.Moi. Biol*, 1113-1125;326; 2003.
11. Wemmer D.E Designed sequence-specific minor groove ligands: *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, 439-461;29; 2000.
12. Ninaber A Goodfellow J.M DNA conformation and dynamics: *Radiat. Environ. Biophy*, 23-29;38; 1999.
13. Kikuta E Matsubara R Katsube N Koike T kimura E Selective recognition of consecutive G sequence in double-stranded DNA by a zinc(ii)- macrocyclic teraamine complex appended with an anthraquinone: *J. Inorg. Biochem*, 239-249; 82;2000.
14. Kelly J Tossi A McConnell D Uigin Oh *Nucl Acids: Res* 6017:13;1985.<http://www.photobiology.com/photoiupac2000/pierard/Interactionmain.html>
15. Friedman K.A.G Manning G.S Polyelectrolyte effect on site-binding equilibria with application to interaction of drug with DNA. *Blpolymerase*, 2671-714;23; 1984.
16. Record M.T Lohman T.M Dahaseth P.J Thermodynamic analysis of ion effect on the binding and conformational equilibria of proteins and nucleic acids: the roles of ion association or release, screening, and ion effects on watter activity. *Moi. Biol*, 45-58;107; 1976.
17. Bloomfile V.A Crotheres D.M Tinco I *Physical- Chemistry of nucleic acid*. 35-40;20; 1974.

به منظور بررسی چگونگی مکانیزم میان کنش از لیگاندها شناخته شده اتیدیوم بر مایند استفاده شد. اتیدیوم بر مایند با ساختار فروروندگی با DNA میان کنش می کند (۱۰)؛ به عبارت دیگر، حلقه فناتریدیونیوم این ترکیب میان حلقه بازها در دو رشته DNA جای می گیرد و رج بندی بازها را بر هم می زند؛ این واکنش، افزایش نشر فلورسانس اتیدیوم را سبب می شود. اگر لیگاندها دیگری در محیط حضور داشته باشند که جایگزین اتیدیوم بر مایند شود و میان جفت بازهای DNA فرورود یا اینکه به شیارهای DNA متصل شود، در هر حال، موجب فرونشانی نشر اتیدیوم را موجب خواهد شد، لیگاندها مذکور در حالت اول از طریق خارج کردن اتیدیوم از جایگاه های اتصال و در حالت دوم به دلیل اتصال به نواحی نزدیک به آن روی DNA، از طریق انتقال انرژی، فرونشانی نشر اتیدیوم را سبب می شود. در دو حالت می توان فرونشانی نشر را بررسی کرد و با رسم نمودارهای اسکاچارد به مکانیزم میان کنش پی برد. در صورتی که لیگاندها دوم نیز همانند اتیدیوم میان جفت بازهای DNA قرار گیرد، نمودار اسکاچارد، نمایانگر مهار رقابتی خواهد بود، یعنی n ثابت و K متغیر است؛ چنین رفتاری در مورد اسپریمین، اسپریمیدین و اسپریمین بیس آکریدین مشاهده شده است (۱۰)؛ اما اگر هر دو پارامتر K و n تغییر کنند، مهار از نوع غیر رقابتی و میان کنش از طریق اتصال به شیارهای DNA با مکانیزم غیر فروروندگی است. همان طور که در جدول شماره ۱ ملاحظه می شود بر اثر میان کنش سالویژنین با DNA، هر دو پارامتر تغییر کرده است؛ یعنی سالویژنین با ساختار غیر فروروندگی و به احتمال از طریق شیار کوچک به DNA متصل می شود.

18. Baguley B.C DNA intercalating anti-tumour agent. *Anti-cancer. Drug. Desig*, 1 35:6;1991.
19. Ciolkowski M.L Fang M.M Lund M.E. A surface Plasmon resonance method for detecting multiple modes of DNA-Ligand interactions. *J. Pharmaceuti. Biomed. Ana*, 1037-1045:22; 2000.
20. Ibrahim M.S Voltammetric Studies of the interaction of Noglamicin antitumor drug with DNA. *Analy.Chim.Acta*. 63-72:443; 2001.
21. Dixon D.W Kim A.S kumar V., Obara G., Marzilli G. Land Schinaz. R.F. Amino- and hydroxytetraphenyl porphyrins with activity against the human immunodeficiency virus. *Antiviral. Chem. Chemother*, 279-282:3; 1992.
22. Graves D.E Vela L.M Intercalative binding of small molecules to nucleic acids. *Biochem* 9221-9233:38; 1999.

Daneshvar

Medicine

*Scientific-Research
Journal of Shahed
University
Seventeenth Year,
No.92
April, May
2011*

Received: 26/1/2011

Last revised: 27/4/2011

Accepted: 28/4/2011

Interaction of salvigenin with DNA

Zohre Habibi^{1*}, Zuhair M. Hassan², Shokoofe Noori³, Valiollah Mozafari¹, Maryam Yoosefi¹, Mehdi Mohammadi¹, Lila Hassani⁴

1. Department of Chemistry, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
2. Department of Immunology, School of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Department of Biochemistry, School of Medical Sciences, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran
4. Department of Biophysics, Zanjan University, Iran.

E-mail: zohre1340@hotmail.com

Abstract

Background and Objective: To evaluate interaction of salvigenin with DNA and the molecular mechanism of its anti-cancer effect.

Materials and Methods: Salvigenin from *Tanacetum canescens* and DNA from calf thymus were isolated and purified. Then, salvigenin interaction with DNA in Tris buffer (0.05 M, pH equal to 4.7 and the temperature at 25 °C) was studied by different methods.

Results and Conclusion: DNA absorption spectra in the presence of various concentrations of each of these ligands showed that the DNA with salvigenin has interaction and complex formation and the absorption wave length at 260 nm increased. Under the effect of changes in DNA uptake ligand showed structural changes. Also, using information obtained from the suppression with ethidium bromide of DNA complex by ligand skachard, above analysis indicated that the mechanism of suppression of publication is through non-competitive inhibition and it means that connecting mechanism of salvigenin is non-intercalated with DNA and probably through connection small grooves.

Key words: Salvigenin, DNA, Interaction