مجله تازه های بیوتکنولوژی سلولی - مولکولی
دوره ششم، شماره بیست و سوم - تابستان ۱۳۹۵

Review Article
مقاله مروری

# استفاده از DNA کاتالیست ها: راه کاری نوین در درمان بیماری ها

فریبادهقانیان[۱]، زهره حجتی[۱]*، فاطمه جوادی زرنقی[۲]

۱. بخش ژنتیک دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

۲. بخش سلولی مولکولی و بیوشیمی دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان

## چکیده

DNA کاتالیست ها (دئوکسی‌ریبوریم ها، DNA آنزیم ها، DNA زایم ها)، مولکول های DNA تک رشته ای، کاتالیتیک و مصنوعی می باشند. با استفاده از تکنیک In vitro selection، DNA کاتالیست هایی با توانایی کاتالیز واکنش های برش RNA ، اتصال RNA و طیف وسیعی از دیگر واکنش های شیمیایی شناسایی شده است. DNA کاتالیست ها به صورت In vitro و به عنوان ابزارهای بیوشیمیایی و آنالیتیکی و هم چنین به عنوان سنسور مورد استفاده قرار می‌گیرند. این توالی های کاتالیتیک هم چنین به عنوان عوامل درمانی و به صورت In vivo به منظور هدف قرار دادن یک mRNAی اختصاصی نیز کاربرد دارند.

اگرچه سوال های مفهومی و عمل کردی زیادی در ارتباط با DNA کاتالیست ها باقی مانده است، اما آن ها به عنوان یک امید تازه در حوزه‌ی کاربردهای In vitro و In vivo مطرح می‌شوند. در این بررسی به مطالعه مفهوم و انواع مختلف DNA کاتالیست ها، تکنیک In vitro selection و کاربردهای درمانی آن ها پرداخته شده است. این مطالعه هم چنین به بررسی چالش ها و راه کارهای مقابله با آن ها در حوزه استفاده درمانی از DNA کاتالیست ها برای درمان بیماری های مختلف شامل سرطان ها، عفونت های باکتریایی و ویروسی می‌پردازد.

**کلمات کلیدی:** DNA کاتالیست ها، In vitro selection، کاربردهای درمانی، mRNAی هدف

## مقدمه

ماکرومولکول هایی با توانایی کاتالیز واکنش های شیمیایی به عنوان آنزیم شناخته می‌شوند. از سال ۱۹۸۵ میلادی پروتئین ها به عنوان کاتالیست های زیستی مطرح شدند. اما کشف و شناسایی کاتالیست های طبیعی RNA توسط توماس چِک[۱] و سیدنی آلتمن[۲] در اوایل سال ۱۹۸۰، برای اولین بار اسیدهای نوکلئیک را به عنوان کاتالیزورهای زیستی و طبیعی مطرح نمود (۱۶،۹). در این زمان اصطلاح ریبوزیم برای نام گذاری کاتالیست های طبیعی RNA مورد استفاده قرار گرفت. پس از آن تلاش های گسترده‌ای به منظور شناسایی ریبوزیم های مصنوعی با استفاده از تکنیک In vitro Selection انجام گرفت (۵). امروزه اصطلاح ریبوزیم برای هر دو گروه از RNA های کاتالیتیکی طبیعی و مصنوعی استفاده می‌گردد. پس از کشف و شناسایی ریبوزیم ها، بحث های گسترده‌ای در مورد توانایی کاتالیتکی DNA مطرح گردید. اما برخی از ویژگی های DNA، تصور نمودن آن به عنوان یک کاتالیست زیستی را به شدت دشوار می نمود. این ویژگی ها عبارتند از:

۱- DNA همواره در طبیعت به صورت ساختار مارپیچ دو رشته

نویسنده مسئول :
بخش ژنتیک دانشکده علوم، دانشگاه اصفهان، اصفهان
پست الکترونیکی: z.hojati@sci.ui.ac.ir

تاریخ دریافت :۱۳۹۴/۰۱/۱۶
تاریخ پذیرش : ۱۳۹۴/۰۸/۰۷

1 Thomas R. Cech
2 Sidney Altman

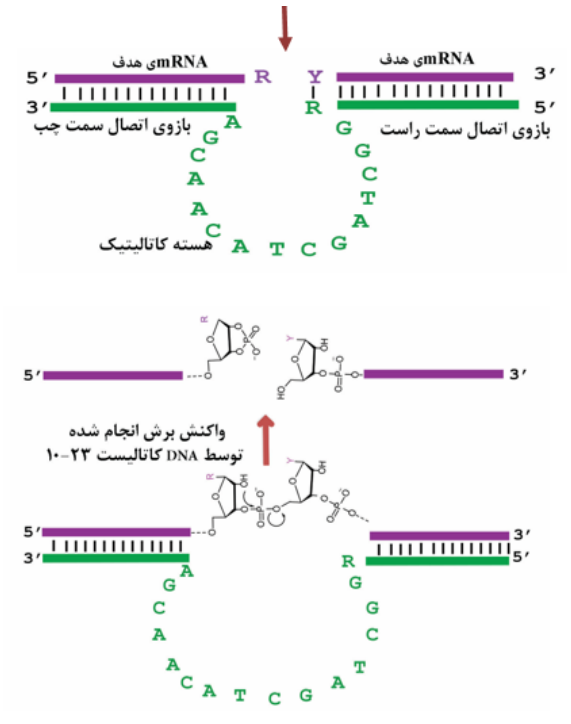


Archive of SID
www.SID.ir

ای[3] یافت شده و این ساختار پایدار از نظر دینامیکی فاقد شرایط مورد نیاز برای شروع یک واکنش کاتالیتیکی می باشد.

۲- ماکرومولکول DNA فاقد گروه های کاتالیتیکی فعال مثل گروه کربوکسیل[4] و سولفیدریل[5] در پروتئین ها و یا گروه ′۲-OH فعال در RNA می باشند. (۲۳)

با این وجود، در سال ۱۹۹۴ بریکر و جویس[6] اولین DNA کاتالیست مصنوعی را گزارش نمودند. آن ها ضمن بررسی کتابخانه ای از مولکول های DNA تک رشته ای و مصنوعی با استفاده از تکنیک In vitro Selection، موفق به کشف و شناسایی یک DNA کاتالیست با توانایی ایجاد برش در سوبسترایی از جنس RNA گردیدند. (۳۸) پس از آن اصطلاح دئوکسی ریبوزیم برای DNA کاتالیست های مصنوعی مورد استفاده قرار گرفت و تاکنون هیچ DNA کاتالیست طبیعی شناسایی نشده است. DNA کاتالیست ها با نام های دیگری مثل DNA enzyme، Catalytic DNA و DNAzymes نیز شناخته می‌شوند. در ارتباط با DNA کاتالیست ها، یافته های شیمیایی در راستای پیش‌بینی توالی نوکلئوتیدی خاص که واکنش ویژه ای را کاتالیز می‌کند کافی نمی باشد. (۳۱) علی رغم عدم توانایی پیش بینی توالی های نوکلئوتیدی منحصر به فرد، DNA کاتالیست های مصنوعی به راحتی توسط تکنیک In vitro Selection شناسایی می‌شوند. در این روش کتابخانه ای از توالی های دئوکسی ریبونوکلئوتیدی تصادفی چندین بار آزمایش شده تا تعدادی از توالی های فعال کاتالیتیکی به دست آیند. در مرحله بعد، توالی های شناسایی شده به منظور بررسی های ساختاری و عمل کردی مورد آنالیزهای بیش تر قرار می گیرند. DNA کاتالیست ها برای کاتالیز نمودن واکنش های مختلف از طریق تشکیل جفت بازهای واتسون کریک و به وسیله بازوهای اتصال[7] خود به سوبسترای الیگونوکلئوتیدی متصل می‌شوند. در این واکنش ها، توانایی کاتالیتیکی DNA کاتالیست ها به ناحیه خاصی از دئوکسی ریبوزیم به نام هسته کاتالیتیکی[8] مربوط می‌شود. بازوهای اتصال در دو طرف هسته کاتالیتیکی قرار گرفته و بر مبنای سوبسترای هدف طراحی می شوند (شکل ۱). (۳۷) تمام DNA کاتالیست ها برای عمل کرد خود به یون های فلزی یک، دو و یا سه ظرفیتی نیاز دارند. تاکنون انواع گسترده ای از DNA کاتالیست ها با توانایی کاتالیز نمودن انواعی از واکنش ها شناسایی شده و در حوزه های مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند. (۳۰) در این مطالعه به بررسی انواع DNA کاتالیست ها، کاربردهای مختلف آن ها در حوزه های متفاوت و تلاش های انجام شده در راستای بهبود عمل کرد DNA کاتالیست ها پرداخته می‌شود.




شکل ۱ تصویر شماتیک از ساختار DNA کاتالیست ۲۳-۱۰. الف) نواحی مختلف ساختاری و عمل کردی در یک DNA کاتالیست. ب) DNA کاتالیست ضمن اتصال به توالی mRNA هدف و تشکیل جفت باز از طریق بازوهای اتصال، واکنش برش را با استفاده از هسته کاتالیتیکی کاتالیز می نماید.

## استفاده از تکنیک In vitro selection به منظور شناسایی DNA کاتالیست های برش دهنده RNA[9]

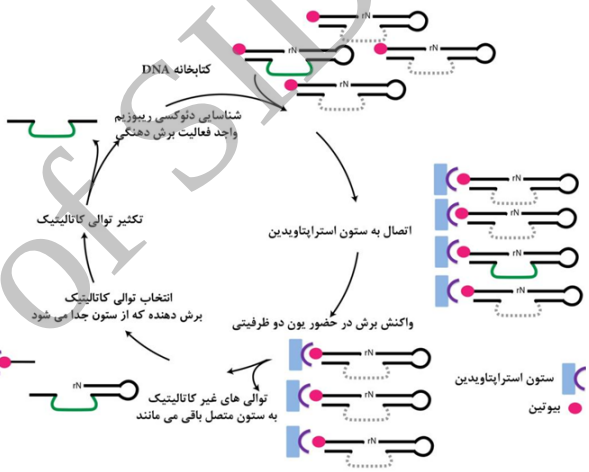
در طی اولین تلاش به منظور کشف DNA کاتالیست ها، پنج دور واکنش انتخاب به صورت تکراری منجر به شناسایی DNA کاتالیست های وابسته به $Pb^{2+}$ و دارای توانایی ایجاد برش در RNA گردید. به طور کلی روش In vitro selection با ساخت مجموعه ای از توالی های تصادفی DNA به نام کتابخانه DNA از طریق روش سنتز اتوماتیکی Solid-phase آغاز می‌گردد. ناحیه تصادفی به طور عموم ۸۰-۴۰ نوکلئوتید طول داشته و به صورت N40-N80 نشان داده می شود. این ناحیه به وسیله دو ناحیه ثابت برای اتصال پرایمرها احاطه شده که در راستای تکثیر ناحیه مذکور مورد استفاده قرار می گیرد. همان طور که در شکل ۲ نشان داده شده است، یک بخش بیوتین به

3 Double stranded helix
4 Carboxyl groups
5 Sulfhydryl groups
6 Breaker and Joyce
7 Binding arms
8 Catalytic core
9 Cleaving Deoxyribozymes



Archive of SID
www.SID.ir

انتهای توالی های طراحی شده اضافه می‌گردد. در این حالت، توالی های DNA فعال که قادر به ایجاد برش در سوبسترای خود می باشند به آسانی از توالی های غیر کاتالیتیکی جدا می شوند. به این صورت که در ضمن ایجاد برش بخش بیوتین حذف شده و بنابراین توالی های واجد فعالیت برشی به ستون استراپتاویدین متصل نشده و سایر توالی های غیر کاتالیتیک بر روی ستون باقی می مانند. در این مرحله، توالی های فعال جدا شده از ستون با استفاده از پرایمرهای ویژه ناحیه ثابت در طی واکنش PCR تکثیر می‌شوند. نتیجه نهایی این دور از واکنش انتخاب، شناسایی و جداسازی مجموعه‌ای از توالی های DNA واجد فعالیت برشی می باشد. در ادامه واکنش برای ۱۵-۵ دور دیگر انجام شده تا توالی های DNA به طور دقیق و اختصاصی تایید گردند. (۳۷،۱۰)




شکل ۲ تکنیک noitceles ortiv nI به منظور شناسایی AND کاتالیست‌های برش دهنده ANR. اساس این تکنیک جدا شدن بخش بیوتین در اثر فعالیت برشی توالی تصادفی مورد آزمایش می باشد. اما مرحله انتخاب را می توان با استفاده از سایر تغییرهای شیمیایی که منجر به جداسازی توالی های AND فعال می‌گردد نیز انجام داد. در اولین تلاش ها برای شناسایی AND کاتالیست ها از یک توالی نوکلئیک اسیدی که تمام از جنس AND بوده و تنها واجد یک پیوند ریبونوکلئوتیدی (Nr) می باشد، به عنوان سوبسترا استفاده می شد. در ادامه از توالی های حاوی بخش های ریبونوکلئوتیدی طویل تر استفاده گردید.

## انواع واکنش های کاتالیز شده توسط DNA کاتالیست ها

ایجاد برش در توالی های نوکلئوتیدی توسط DNA کاتالیست ها اولین واکنشی است که مورد شناسایی قرار گرفت (شکل ۱). تاکنون انواع زیادی از DNA کاتالیست های برش دهنده توالی های DNA وRNA با ویژگی های متفاوت شناخته شده‌اند. در ابتدا محققان گروهی از DNA کاتالیست های وابسته به $Pb^{2+}$ (شکل ۳،۱) را شناسایی نمودند و در ادامه موفق به شناسایی دئوکسی‌ریبوزیم وابسته به $Mg^{2+}$ به نام E2 (شکل ۳،۲) شدند. پس از آن DNA کاتالیست‌های وابسته به هیستیدین مثل HD2 (شکل ۳،۷) گزارش شدند. (۳۲) هیستیدین در طی واکنش به عنوان کوفاکتور عمل نموده و با توجه به وابسته بودن واکنش به pH، نیمه ایمیدازولی هیستیدین نقش اساسی را در طی واکنش ایفا می کند. هر سه گروه از DNA کاتالیست های شناسایی شده قادر به ایجاد برش در سوبسترایی که تمام توالی آن از جنس RNA است نمی باشند. (۳) مطالعه های بعدی نسل جدیدی از DNA کاتالیست ها با توانایی ایجاد برش در سوبسترای تمام RNA را معرفی نمودند. DNA کاتالیست های ۱۷-۸ و ۲۳- ۱۰ (شکل ۱) پس از ۸ و ۱۰ دور واکنش انتخاب شناسایی شدند و امروزه نیز به طور معمول از این دو DNA کاتالیست استفاده می‌شود. (شکل ۳،۳ و ۳،۴) در ادامه این سیر مطالعه گروهی از محققین به بررسی DNA کاتالیست های غیر وابسته به یون های دو ظرفیتی پرداختند. آن ها موفق به شناسایی DNA کاتالیست $Na^{+}$ شدند که در حضور یون تک ظرفیتی $Na^{+}$ فعال می‌باشد. (شکل ۳،۵) مطالعه بعدی منجر به شناسایی DNA کاتالیست bipartite گردید. این DNA کاتالیست نیز از طریق پیوندهای واتسون کریک با سوبسترای خود اینترکشن برقرار نموده، اما چندین نوکلئوتید جفت نشده در نزدیکی جایگاه برش را ترجیح می دهد (شکل ۳،۶). برخی از DNA کاتالیست ها نیز قادر به ایجاد سیگنال فلئورسانس در شرایط خاص pH و یا غلظت های فلزی خاص می باشند. pH6DZ1 یکی از انواع DNA کاتالیست های برش دهنده سیگنالینگ بوده که در مقایسه با سایر DNA کاتالیست ها ساختار دوم پیچیده‌تری دارد. (۲۸،۲)

DNA کاتالیست ها علاوه بر ایجاد برش در توالی های نوکلئوتیدی قادر به اتصال آن‌ها نیز می‌باشند. اولین گزارش در مورد DNA کاتالیست های واجد فعالیت اتصال[10] در مورد یک دئوکسی‌ریبوزیم با قابلیت اتصال دو سوبسترا از جنس DNA ارائه گردید (۱۱). در ادامه تحقیق های آزمایشگاهی به منظور شناسایی DNA کاتالیست هایی که قادر هستند اتصال را از یک سوبسترای RNA واجد انتهای ´۳-´۲ سیکلیک فسفات آغاز نمایند و با یک گروه ´۵-OH از RNA دیگر اینترکشن برقرار نمایند، انجام گردید. این گروه از DNA کاتالیست ها در نهایت یک پیوند فسفودی استر طبیعی ´۵-´۳ و یا یک پیوند غیر معمول ´۵-´۲ ایجاد می نمایند (۸). در ادامه، گروهی از DNA کاتالیست های اتصال دهنده RNA با عمل کرد بر روی

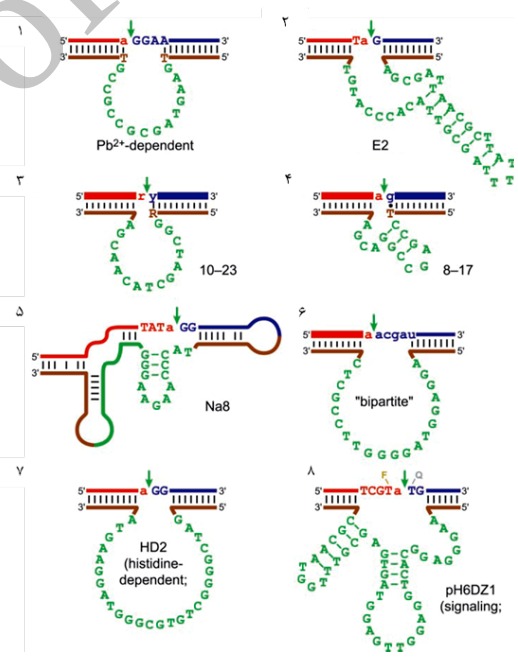
10 Ligating Deoxyribozymes



Archive of SID

www.SID.ir

سوبستراهای RNA تری فسفات نیز شناسایی شدند. برخلاف این آنزیم ها که می توانند در سوبستراهای RNA تری فسفات یک اتصال خطی طبیعی ´۵-´۳ و یا یک پیوند غیر معمول ´۵-´۲ ایجاد نمایند، برخی از DNA کاتالیست ها قادر هستند که اتصال شاخه دار[11] ایجاد نمایند. این گروه از DNA کاتالیست ها از طریق حمله نوکلئوفیلی یک گروه ´۲-OH داخلی ویژه به سمت گروه تری فسفات سوبسترای دیگر یک پیوند شاخه دار ۵-۲ ایجاد می کنند. (۲۵،۲۲) علاوه بر دو واکنش برش و اتصال که توسط DNA کاتالیست ها انجام می‌شود، برخی دیگر از واکنش ها که توسط DNA کاتالیست ها کاتالیز می شوند نیز شناسایی شده است. برای مثال برخی از DNA کاتالیست ها می توانند GTP را به عنوان یک سوبسترای کوچک و مجزا مورد استفاده قرار دهند. گروهی دیگر از DNA کاتالیست ها قادر هستند اتصالات نوکلئوپپتیدی از نوع تیروزین-RNA ایجاد نمایند. DNA کاتالیست هایی که DNA را فسفریله و یا آدنیله می کنند نیز از ATP به عنوان سوبسترا استفاده می نمایند. (۳۶،۳۵)




شکل ۳ مجموعه ای از DNA کاتالیست های برش دهنده. در این شکل ساختار دوم، هسته کاتالیتیکی و محل برش انواعی از DNA کاتالیست ها آورده شده است (۱۳).

## کاربردهای درمانی DNA کاتالیست ها

امروزه DNA کاتالیست ها در حوزه های مختلف شیمی، بیوشیمی، بیولوژی و زیست‌پزشکی مورد استفاده قرار می گیرند. برای مثال برخی از DNA کاتالیست های برش دهنده RNA به عنوان ابزارهای بیوشیمیایی و تحلیلی کاربرد داشته و برخی دیگر به صورت سنسورهای بیوشیمیایی مورد استفاده قرار می گیرند. (۱۱) تاکنون پیشرفت های زیادی در حوزه سنسورهای زیستی از جنس DNA کاتالیست ها صورت گرفته و موفقیت های گسترده ای کسب شده است. به علاوه، DNA کاتالیست های برش دهنده RNA در محیط های درون سلولی نیز عمل کرد داشته و امروزه به عنوان یک استراتژی درمانی مطرح می‌گردند. (۲۹) در مطالعه حاضر به بررسی جدیدترین یافته ها در حوزه کاربردهای درمانی DNA کاتالیست ها پرداخته می شود. DNA کاتالیست ۲۳-۱۰ در اکثر مطالعه های مربوط به کاربرد درون سلولی DNA کاتالیست ها مورد استفاده قرار گرفته است. این DNA کاتالیست به یک جایگاه برش ساده شامل نوکلئوتیدهای پورین و پیریمیدین مجاور نیاز داشته و به همین دلیل به راحتی برای هر RNA هدف قابل طراحی می باشند. (۴۰) به طور کلی DNA کاتالیست های برش دهنده RNA تاکنون در برخی از حوزه هایی درمانی مورد استفاده قرار گرفته اند که در ادامه به معرفی مهم ترین آن ها پرداخته می شود:

## کاربرد DNA کاتالیست ها در درمان بیماری های باکتریایی

یکی از کاربردهای DNA کاتالیست های برش دهنده RNA مربوط به هدف قرار دادن گونه های مقاوم به آنتی بیوتیک برخی از عوامل عفونت زای رایج مثل باکتری استافیلوکوکوس اورئوس می باشد. مقاومت به آنتی بیوتیک زمانی اتفاق می افتد که عامل عفونت زا یک پلاسمید و یا یک جهش را کسب نموده که به آن اجازه زنده ماندن در حضور آنتی بیوتیک را می دهد. از آن جایی که درمان با استفاده از انواع آنتی بیوتیک ها منجر به ایجاد سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک جدید و مقاومت multi-drug می شود، گسترش روش های درمانی جدید در این حوزه از اهمیت ویژه ای برخوردار است. DNA کاتالیست ها در سال های اخیر به منظور ایجاد روش های درمانی کار آمدتر مورد استفاده قرار گرفته‌اند و mRNA های کد کننده پروتئین های مسئول مقاومت به یک آنتی بیوتیک خاص را مورد هدف قرار داده و تجزیه می نمایند. به عنوان مثال در یک مطالعه و در سویه مقاوم به آنتی بیوتیک باکتری استافیلوکوکوس اورئوس، mRNA های مربوط به آنزیم بتا لاکتاماز و پروتئین PBP2[12] مورد هدف DNA کاتالیست ۲۳-۱۰ قرار گرفتند. آنزیم بتا لاکتاماز مسئول حساسیت باکتری نسبت به آنتی‌بیوتیک های بتا لاکتام می باشد. استفاده از این DNA کاتالیست ها در

11 Branched ligation

12 Penicillin-binding protein



Archive of SID

www.SID.ir

نهایت منجر به کاهش بیان mRNA هدف و افزایش حساسیت سویه های باکتری به آنتی بیوتیک مورد نظر گردید. (۱) علاوه بر این، در برخی از مطالعه ها به طور کلی باکتری بیماری زا و نه مقاومت باکتریایی مورد هدف قرار می‌گیرد. برای مثال در یک بررسی mRNAی کد کننده آنزیم ایزوسیترات لیاز باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس[۱۳] مورد هدف DNA کاتالیست ها قرار گرفته است. این آنزیم نقش مهمی در متابولیسم باکتری و فاز نهفته عفونت در ماکروفاژها داشته و به عنوان یکی از اهداف کلیدی در درمان سل مطرح می‌گردد. استفاده از این دئوکسی‌ریبوزیم در انتها منجر به کاهش بیان آنزیم ایزوسیترات لیاز و در نتیجه کاهش بقای باکتری در ماکروفاژها می شود. تاکنون بسیاری از mRNAهای باکتریایی با ویژگی بیماری زایی مورد هدف DNA کاتالیست های اختصاصی قرار گرفته اند و نتایج قابل توجهی را در کاهش مقاومت آنتی بیوتیکی و هم چنین کاهش بقای زیستی باکتری بیماری زا به همراه داشته اند. (۳۳)

## استفاده از DNA کاتالیست ها در درمان بیماری های ویروسی

DNA کاتالیست ها هم چنین به عنوان یک استراتژی درمانی برای مقابله با بیماری ها و عفونت های ویروسی نیز مطرح می شوند. تاکنون انواعی از DNA کاتالیست ها علیه mRNA های ویروس های متفاوت شامل HIV، هپاتیت C، هپاتیت B، آنفولانزا و Epstein-Barr virus طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفته اند. برای مثال، تاکنون برخی از مطالعه ها به مهار ویروس HIV با استفاده از DNA کاتالیست ها پرداخته اند و نتایج قابل توجهی حاصل شده است. یکی از مهم ترین نکته ها در طراحی DNA کاتالیست های کارآمد، یافتن نواحی مناسب برای هدف قرار دادن می باشد[۲۱]. این نواحی به عنوان اهداف DNA کاتالیست ها انتخاب شده و سپس DNA کاتالیست ها بر علیه آن ها طراحی می شوند. در ارتباط با ویروس HIV، یک ناحیه ۳۵۵ نوکلئوتیدی در انتهای ´۵ ژنوم ویروس HIV-1 مورد بررسی قرار گرفته است. این ناحیه شامل نواحی عمل کردی مهمی شامل TAR [۱۴]، سیگنال پلی‌آدنیلاسیون (poly-A)، جایگاه اتصال پرایمر[۱۵] (PBS) و ... می باشد. به علاوه ناحیه مورد نظر در بالادست جایگاه پیرایش اصلی[۱۶] قرار گرفته و بنابراین در تمام واریانت های mRNAی ویروسی وجود دارد. این ناحیه حفاظت شده ترین ناحیه در ژنوم HIV-1 در طول تکامل بوده و به همین دلیل در اکثر سویه های HIV-1 وجود دارد. طراحی DNA کاتالیست های مختلف علیه این نواحی عمل کردی منجر به شناسایی دو DNA کاتالیست گردید که قادر هستند به طور کارآمدی از بیان ویرس HIV در سلول های کشت داده شده جلوگیری نمایند. این بررسی ها بیان HIV در شرایط کشت سلولی را مهار نموده و موفقیت به دست آمده به عنوان یک استراتژی جدید در تولید داروهای ضد HIV برای درمان بیماران مطرح می‌شود. (۲۴،۲۰،۱۷)

در مثالی دیگر، DNA کاتالیست ها برای مهار ویروس آنفولانزا مورد استفاده قرار گرفتند. این ویروس از مهم ترین ویروس های بیماری زا در انسان و حیوان ها می باشد. به منظور طراحی DNA کاتالیست های کارآمد، مطالعه های گسترده ای بر روی ژنوم ویروس آنفولانزا انجام گرفته و محافظت شده ترین نواحی ژنوم به منظور طراحی DNA کاتالیست ها مورد هدف قرار گرفتند. نتایج این مطالعه ها به عنوان فرصتی جدید در حوزه درمان های ضد ویروسی مطرح می‌گردد. (۴)

## DNA کاتالیست ها و درمان سرطان

اهداف DNA کاتالیست ها تنها به mRNAهای ویروسی و باکتریایی محدود نمی شود. در سال های اخیر محققان از DNA کاتالیست ها برای هدف قرار دادن انواعی از mRNA های مرتبط با سرطان، بیماری های قلبی و عروقی و نقص های عصبی و ماهیچه ای در شرایط In vitro و هم چنین در محیط کشت سلولی استفاده نموده‌اند. در ادامه به بررسی DNA کاتالیست های مورد استفاده در تحقیق های سرطان پرداخته می شود. در ۲ انواع سرطان ها و انواع mRNAهای هدف که با استفاده از DNA کاتالیست ها در این سرطان ها مورد هدف قرار گرفته اند به همراه اثرهای بیولوژیکی DNA کاتالیست ها آورده شده است. (۶) انجام تحقیق های متعدد در شرایط In vitro و در محیط کشت سلولی و نتایج موفقیت آمیز به دست آمده، منجر به گسترش استفاده از DNA کاتالیست ها در مدل های حیوانی گردید. به عنوان مثال، نتایج برخی از مطالعه ها نشان داده است که DNA کاتالیست های ۲۳-۱۰ با هدف قرار دادن mRNAهای VEGFR، c-Jun و Egr-1 به طور قابل توجهی اندازه تومور را در مدل های موشی کاهش می دهد. این DNA کاتالیست ها به طور کامل اختصاصی علیه mRNAهای مورد نظر طراحی شده و با کاهش بیان mRNA ها از پیشرفت سرطان جلوگیری می نمایند. (۳۴) mRNAهای مختلف بر اساس نتایج مطالعه های آزمایشگاهی که در گذشته

13 Mycobacterium tuberculosis
14 Trans-activation response element
15 Primer binding site
16 Major splice site



Archive of SID

www.SID.ir

افزایش بیان mRNA را در پیشرفت سرطان تایید نموده‌اند انتخاب می شوند. در ابتدا، تلاش های صورت گرفته، mRNA هایی را مورد هدف قرار دادند که در اکثر سرطان ها دچار افزایش بیان می‌گردند. پس از آن mRNAهایی که در یک سرطان خاص به طور اختصاصی دچار افزایش بیان می‌شوند نیز مورد هدف قرار گرفتند. به این ترتیب DNA کاتالیست ها به عنوان راه کار درمانی جدید در جلوگیری از انواع سرطان ها مطرح شدند. (۳۰) در ادامه این سیر تحقیقاتی و با توجه به نتایج چشم گیر به دست آمده در مهار رشد تومورها در مدل های حیوانی، استفاده از DNA کاتالیست ها در انسان و در مطالعه های فاز I کلینیکی مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت در سال ۲۰۱۳، گروهی از محققان موفق به استفاده از DNA کاتالیست Dz13 در بیماران مبتلا به کارسینومای پوستی گردیدند. این مطالعه به عنوان یک کشف فوق العاده در حوزه درمان سرطان محسوب می‌شود. کارسینومای BCC [۱۷] یکی از رایج ترین کارسینوماها در میان سفید پوستان بوده و در حدود ۷۰٪ از سرطان های پوستی غیر ملانومایی را به خود اختصاص می دهد. DNA کاتالیست Dz13 به طور کامل اختصاصی *c-Jun* mRNA را هدف قرار می دهد که یکی از اجزای اصلی فاکتور رونویسی AP-1 [۱۸] می باشد. فاکتور AP-1 یک فاکتور آنکوژنیک بوده و در القای رگ زایی، تکثیر سلولی، رشد تهاجمی و متاستاز تومور و در مهار آپوپتوز نقش دارد. به طور کلی مطالعه های انجام گرفته نشان دهنده نقش کلیدی *c-Jun* در گسترش سرطان BCC بوده و آن را به عنوان یک هدف درمانی ایده‌آل مطرح می نماید. در ابتدا مطالعه های پیش بالینی[۱۹] انجام گرفته بر روی موش، رَت و میمون نشان داد که استفاده از Dz13 در این مدل های حیوانی به طور کامل ایمن بوده و فاقد اثرهای جانبی می باشد. در ادامه، اولین مطالعه استفاده از DNA کاتالیست ها در انسان و در فاز یک به منظور بررسی ایمنی و میزان تحمل و پذیرش داروی Dz13 در بیماران مبتلا به BCC انجام گرفت. در این مطالعه ۹ بیمار مبتلا به BCC مورد بررسی قرار گرفته و بیماران چهار هفته پس از دریافت تزریق درون توموری با دوز حداکثر ۱۰۰ میکروگرم از Dz13 مورد ارزیابی های قرار گرفتند. در تمام بیماران میزان بیان *c-Jun* mRNA کاهش یافته و هیچ گونه اثر جانبی دیده نشد. به علاوه، تزریق Dz13 منجر به افزایش بیان ژن های القا کننده آپوپتوز شامل کاسپاز ۳، کاسپاز ۸، کاسپاز ۹، *P53* و هم چنین کاهش بیان ژن های ضد آپوپتوز مانند *Bcl2* و *MMP-9* در تومور گردید. در پنج بیمار مورد بررسی نیز عمق هیستولوژیکی تومور در اثر دریافت Dz13 کاهش یافت. (۱۳،۱۲)

| مرجع | اثرات بیولوژیکی | ی هدف mRNA | سرطان |
|---|---|---|---|
| [43,44] | مهار تکثیر و متاستاز، مهار رگ‌زایی، افزایش آپوپتوز | LMP-1/ VEGFR-1 | کارسینومای حنجره |
| [45,46] | مهار تکثیر و متاستاز و تهاجم، مهار رگ‌زایی، افزایش آپوپتوز | EGR-1/ VEGFR-2/ MMP9 | سرطان پستان |
| [47] | مهار تکثیر و افزایش آپوپتوز | MMPs | سرطان ریه |
| [48] | مهار تهاجم | IGF-II | هپاتوکارسینوما |
| [49] | مهار تکثیر و افزایش radiosensitivity | Survivin | کارسینومای پانکراس |
| [50] | مهار تکثیر و متاستاز، مهار رگ‌زایی | Beta-1 integrin/Beta catenin/k-Ras | سرطان کلورکتال |
| [51] | مهار رگ‌زایی | Aurora kinase A | سرطان پروستات |
| [52] | مهار رگ‌زایی | c-Jun | اپیتلیوما |
| [53] | مهار تکثیر و متاستاز، افزایش آپوپتوز | Bcr-abl / PML/RARα | Leukocythemia |
| [54] | مهار رگ‌زایی و رشد تومور | c-Jun | ملانوما |
| [55] | مهار تهاجم | c-Jun | لیپوسارکوما |
| [56] | مهار تکثیر و مهاجرت سلولی | c-Jun | سرطان پوست |
| [57] | مهار تهاجم | uPAR | سارکومای استخوان |
| [58] | مهار تکثیر و مهاجرت سلولی | AKT1 | سرطان تیروئید |

جدول ۱ کاربردهای DNA کاتالیست‌ها در تحقیقات سرطان

## بحث

با وجود استفاده از DNA کاتالیست ها در درمان سرطان و در مطالعه های کلینیکی فاز یک انسان، هنوز چالش هایی در ارتباط با کاربردهای درمانی DNA کاتالیست ها مطرح می باشد. در مورد بیش تر DNA کاتالیست ها، حداکثر فعالیت در شرایط In vitro با استفاده از غلظت های خاصی از یون های فلزی دو ظرفیتی انجام شده در حالی که غلظت این یون ها در سلول بسیار کم تر می باشد. برای مثال در شرایط In vitro حداکثر فعالیت در حضور غلظت‌های یونی ۱۰۰-۱۰ میلی مولاری $Mg^{2+}$ انجام شده، در صورتی که غلظت $Mg^{2+}$

17 Basal cell carcinoma
18 Activating protein 1
19 pre-clinical



Archive of SID

www.SID.ir

در شرایط In vivo چیزی در حدود کم تر از یک میلی مولار است. در چنین حالتی از DNA کاتالیست هایی که در طی واکنش In vitro selection واجد بالاترین میزان فعالیت در حضور کم‌ترین میزان از $Mg^{2+}$ می‌باشند، استفاده می گردد. (۷) علاوه بر این، در ارتباط با DNA کاتالیست های برش دهنده، مطالعه هایی به منظور ایجاد تغییرهای نوکلئوتیدی [۲۰] در راستای افزایش قدرت جذب یون های فلزی و هم چنین استفاده از گروه های عاملی تغییر یافته به منظور کاهش نیاز به یون های فلزی انجام گرفته است. برای مثال، در مطالعه ای گروه آمینو به تک تک نوکلئوتیدهای موجود در ناحیه کاتالیتیک مرکزی DNA کاتالیست ۲۳- ۱۰انجام گرفت. در این بررسی افزودن گروه آمینو به نوکلئوتید A9 منجر به افزایش ۱۲ برابری در فعالیت کاتالیتیکی دئوکسی ریبوزیم گردید. (۱۵) علاوه بر مطالعه های صورت گرفته در مورد DNA کاتالیست های برش دهنده، تحقیق هایی در مورد افزایش سرعت عمل کرد DNA کاتالیست های اتصال دهنده از نوع branching نیز انجام شده است. در این مطالعه ها تاثیر لانتانیدها در عمل کرد DNA کاتالیست های branching مورد بررسی قرار گرفت. استفاده از غلظت ۱۰۰ میلی مولار تربیوم $Tb^{3+}$ به همراه غلظت ۷ میلی مولاری $Mg^{2+}$ منجر به افزایش $10^4$ برابری سرعت واکنش اتصال 2′,5′-branched RNA گردید. در ادامه این بررسی ها نشان داد که لانتانیدها به عنوان کوفاکتورهایی در واکنش سنتز RNA شاخه دار توسط DNA کاتالیست ها عمل می نمایند. تربیوم میل ترکیبی دئوکسی‌ریبوزیم برای $Mg^{2+}$ را افزایش داده و به این ترتیب آنزیم قادر است در غلظت های پایین‌تر $Mg^{2+}$ نیز عمل کرد داشته باشد. (۱۴)

همانند سایر روش های درمانی مبتنی بر نوکلئیک اسیدها مثل siRNA، تکنولوژی آنتی‌سنس و ریبوزیم ها، DNA کاتالیست ها نیز در مورد روش های انتقال با چالش های زیادی روبرو هستند. DNA کاتالیست ها حداقل ۱۲ نوکلئوتید طول داشته و از اسکلت بارداری تشکیل شده‌اند، که هر دو ویژگی ذکر شده کارآیی جذب سلولی آن ها را به شدت کاهش می‌دهد. در این راستا از تکنیک‌های الکتروپوریشن، وکتورهای بیانی ssDNA و کمپلکس نمودن DNA کاتالیست ها با دندریمرها استفاده می شود. (۲۷،۱۸) علاوه بر این، برای هدفمند نمودن فرآیند انتقال DNA کاتالیست ها به یک بافت خاص که از اهمیت ویژه‌ای در حوزه درمان برخوردار است، می‌توان از نانوذرات استفاده نمود. در این صورت DNA کاتالیست ها تنها بافت توموری را هدف قرار داده و اختصاصیت عمل کرد افزایش می یابد. (۲۶) در ارتباط با مشکل طول DNA کاتالیست ها و دشواری انتقال آن ها به سلول نیز مطالعه های انجام شده است. در این تحقیق ها با استفاده از روشی تحت عنوان CoMA [۲۱] به مطالعه نوکلئوتیدهای کلیدی و عمل کردی در DNA کاتالیست ها پرداخته شده است. در حقیقت حضور برخی از نوکلئوتیدها در دئوکسی ریبوزیم ضروری نبوده و حذف آن ها تغییری در فعالیت کاتالیتیکی DNA کاتالیست ها ایجاد نمی‌کند. بنابراین حذف این نواحی منجر به کوتاه شدن طول DNA کاتالیست ها و تسهیل انتقال آن‌ها به درون سلول می‌شود. (۴۱)

یک چالش دیگر در ارتباط با DNA کاتالیست ها پایداری آن ها در محیط درون سلولی می باشد. اگرچه پایداری DNA در مقایسه با RNA در شرایط درون سلولی بسیار بالاتر است، اما نیمه عمر الیگونوکلئوتیدهای ssDNA تغییر نیافته نیز در درون سلول کوتاه می باشد. این مسئله به شدت توانایی های کاتالیتیکی DNA کاتالیست ها را تحت تاثیر قرار داده و کارآیی آن ها در محیط درون سلولی را کاهش می دهد. (۴۲) برای برطرف نمودن این مشکل به طور اصولی از الیگونوکلئوتیدهای تغییر یافته استفاده می شود. برای مثال، استفاده از نوکلئوتیدهای تغییر یافته LNA [۲۲] در بخش بازوی اتصال DNA کاتالیست ها منجر به افزایش پایداری آن ها در محیط درون سلولی، اتصال اختصاصی تر و قوی تر به mRNA هدف و در نهایت کارآیی بالای DNA کاتالیست ها می‌گردد[۴۱]. LNA یک نوکلئوتید RNAی تغییر یافته می باشد که در بخش ریبوز آن یک پل اتصالی دو گروه ۲′ اکسیژن و ۴′ کربن را به یکدیگر متصل نموده است. این اتصال منجر به قفل شدن نوکلئوتید LNA در کنفورماسیون endo- ۳′ شده که این نوع کنفورماسیون اغلب در دوپلکس های فرم A دیده می‌شود. LNA ها دارای گرایش افزایش یافته‌ای برای اتصال به DNA یا mRNA هدف بوده و به طور کامل در مقابل هضم نوکلئازی مقاوم هستند. (۱۹)

## نتیجه‌گیری

در سال های اخیر، دیدگاه ما نسبت به DNA به شدت تغییر یافته است. امروزه DNA نه تنها به عنوان مولکولی برای ذخیره اطلاعات ژنتیکی و انتقال به نسل بعد مطرح شده بلکه توالی های مصنوعی DNA به عنوان DNA کاتالیست هایی با قابلیت کاتالیز انواعی از واکنش ها شناسایی می‌شود. مطالعه DNA کاتالیست ها و بررسی کاربردهای آن ها در چند دهه اخیر به شدت مورد توجه قرار گرفته است. با این وجود، هنوز مباحث ناشناخته بسیاری در ارتباط با آن ها وجود دارد. شناسایی دقیق

20 Nucleotide Modification

21 Combinatorial mutation interference analysis

22 Locked nucleic acid



Archive of SID

www.SID.ir

ساختار و عمل کرد انواع DNA کاتالیست ها در گسترش کاربردهای آن ها در حوزه های مختلف نقش مهمی داشته است. تاکنون از DNA کاتالیست ها در حوزه های مختلفی مانند بیوشیمی، بیوتکنولوژی، تحقیقات RNA، مطالعه فرآیندهای مولکولی مختلف ، طراحی سنسورهای زیستی و ... استفاده شده است. کاربرد DNA کاتالیست ها در درمان بیماری های مختلف نیز یکی از جذاب ترین مباحث در این حوزه مطالعه ها بوده که به تازگی به شدت پیشرفت نموده است. امید است در آینده ای نزدیک DNA کاتالیست ها به ابزارهایی کارآمد در حوزه های تحقیقاتی و کلینیکی تبدیل شده و در درمان انواعی از بیماری ها مورد استفاده قرار گیرند.

Archive of SID



www.SID.ir

## منابع


1. Baum, D.A., Silverman, S.K. Deoxyribozyme□Catalyzed Labeling of RNA. Angew Chem Int Ed Engl, 2007. 46: 3502-3504.
2. Baum, D., Silverma,n S. Deoxyribozymes: useful DNA catalysts in vitro and in vivo. Cell Mol Life Sci, 2008. 65: 2156-2174.
3. Breaker, R.R., Joyce, G.F. A DNA enzyme that cleaves RNA. Chem Biol, 1994. 1: 223-229.
4. Chen, F., Li, Z., Wang, R., Liu, B., Zeng, Z., Zhang, H., Zhang, J. Inhibition of ampicillin-resistant bacteria by novel mono-DNAzymes and di-DNAzyme targeted to β-lactamase mRNA. Oligonucleotides, 2004. 14: 80-89.
5. Chen, Y., Yang, L., Huang, S., Li, Z., Zhang, L., He, J., etal. Delivery system for DNAzymes using arginine-modified hydroxyapatite nanoparticles for therapeutic application in a nasopharyngeal carcinoma model. Int J Nanomedicine, 2013. 8: 3107.
6. Cho, E.A., Moloney, F.J., Cai, H., Au-Yeung, A., China, C., Scolyer, RA., et al. Safety and tolerability of an intratumorally injected DNAzyme, Dz13, in patients with nodular basal-cell carcinoma: a phase 1 first-in-human trial (DISCOVER). Lancet, 2013. 381: 1835-1843.
7. Dass, C.R., Saravolac, E.G., Li, Y., Sun, L.Q. Cellular uptake, distribution, and stability of 10-23 deoxyribozymes. Antisense Nucleic Acid Drug Dev, 2002. 12: 289-299.
8. Dass, C.R., Choong, P.F., Khachigian, L.M. DNAzyme technology and cancer therapy: cleave and let die. Mol Cancer Ther , 2008. 7: 243-251.
9. Dossing, H. Design and in vitro activity of RNA-cleaving LNAzymes.
10. Elahy, M., Dass, C.R. Dz13: c□Jun Downregulation and Tumour Cell Death. Chem Biol Drug Des, 2011. 78: 909-912.
11. Emilsson, G., Breaker, R. Deoxyribozymes: new activities and new applications. Cell Mol Life Sci, 2002. 59: 596-607.
12. Evdokimov, A.A., Mazurkova, N.A., Malygin, E.G., Zarytova, V.F., Levina, A.S., Repkova, M.N., et al. Design of deoxyribozymes for inhibition of influenza a virus reproduction. Mol Biol 2013. 47: 75-84.
13. Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., Altman, S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. Cell 1983. 35: 849-857.
14. Hoadley, K.A., Purtha, W.E., Wolf, A.C., et al. Zn2+-dependent deoxyribozymes that form natural and unnatural RNA linkages. Biochemistry 2005. 44: 9217-9231.
15. Höbartner, C., Silverman, S.K. Recent advances in DNA catalysis. Biopolymers 2007. 87: 279-292.
16. Hou, Z., Meng, J.R., Niu, C., Wang, H.F., Liu, J., Hu, B.Q., et al. Restoration of antibiotic suseptibility in methicillin-resistance staphylococcus aureus by targeting MECR1 with a phosphorothioate deoxyribozyme. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007. 34: 1160-1164.
17. Jakobsen, M.R., Haasnoot, J., Wengel, J., Berkhout, B., Kjems, J. Efficient inhibition of HIV-




Archive of SID

www.SID.ir

1 expression by LNA modified antisense oligonucleotides and DNAzymes targeted to functionally selected binding sites. Retrovirology, 2007. 4: 29.

18. Javadi-Zarnaghi, F. Functional characterization and application of 2', 5'-branched RNA forming deoxyribozymes using lanthanides as cofactors. 2013.

19. Javadi-Zarnaghi, F., Höbartner, C. Lanthanide cofactors accelerate DNA-catalyzed synthesis of branched RNA. J Am Chem Soc, 2013. 135: 12848-12839.

20. Karnati, H.K., Yalagala, R.S., Undi, R., Pasupuleti, S.R., Gutti, R.K. Therapeutic potential of siRNA and DNAzymes in cancer. Tumor Biol, 2014. 35: 9505-9521.

21. Kaur, H., Scaria, V., Maiti, S. Locked onto the target: Increasing the efficiency of antagomirzymes using locked nucleic acid modifications. Biochemistry, 2010. 49: 9449-9456.

22. Kruger, K., Grabowski, P.J., Zaug, A.J., Sands, J., Gottschling, D.E., Cech, T.R. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. cell, 1982. 31: 147-157.

23. Kumar, B., Asha, K., Chauhan, S. DNAzyme mediated post-transcriptional gene silencing: A novel therapeutic approach. 2013.

24. Lan, T., Lu, Y. Metal ion-dependent DNAzymes and their applications as biosensors. In Interplay between Metal Ions and Nucleic Acids. Springer, 2012. 217-248.

25. Lee, C.S., Mui, T.P., Silverman, S.K. Improved deoxyribozymes for synthesis of covalently branched DNA and RNA. Nucleic acids res, 2010. gkq753.

26. Liang, H., Zhang, X.B., Lv, Y., Gong, L., Wang, R., Zhu, X., et al. Functional DNA-Containing Nanomaterials: Cellular Applications in Biosensing, Imaging, and Targeted Therapy. Acc Chem Res, 2014. 47(6):1891-901.

27. Li, J.M., Li, N., Zhu, D.Y., Yi, Z.J., Liu, Y.H., Yang, C., et al. Inhibitory effects of 10-23 deoxyribozyme targeting ICL gene on the expression of isocitrate lyase and the infection of Mycobacterium tuberculosis in macrophages. Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi, 2006. 29: 531-535.

28. McManus, S.A., Li, Y. The structural diversity of deoxyribozymes. Molecules, 2010. 15: 6269-6284.

29. Pan, W., Clawson, G.A. Catalytic DNAzymes: derivations and functions. Expert Opin Biol Ther, 2008. 8(8):1071-85.

30. Sidorov, A.V., Grasby, J.A., Williams, D.M. Sequence□specific cleavage of RNA in the absence of divalent metal ions by a DNAzyme incorporating imidazolyl and amino functionalities. Nucleic acids res, 2004. 32: 1591-1601.

31. Silverman, S.K. Deoxyribozymes: DNA catalysts for bioorganic chemistry. Org Biomol Chem. 2004. 2: 2701-2706.

32. Silverman, S.K. In vitro selection, characterization, and application of deoxyribozymes that cleave RNA. Nucleic acids res, 2005. 33: 6151-6163.

33. Silverman, S.K. Nucleic acid enzymes (ribozymes and deoxyribozymes): in vitro selection



Archive of SID

www.SID.ir

and application. Wiley Encyclopedia of Chemical Biology 2008.

34. Silverman, S.K. Catalytic DNA (deoxyribozymes) for synthetic applications—current abilities and future prospects. Chem Commun, 2008. 3467-3485.

35. Silverman, S.K., Baum, D.A. Use of deoxyribozymes in RNA research. Methods Enzymol, 2009.469: 95-117.

36. Silverman, S.K. Deoxyribozymes: Selection Design and Serendipity in the Development of DNA Catalysts. Acc Chem Res, 2009. 42: 1521-1531.

37. Singh, N., Ranjan, A., Sur, S., Chandra, R., Tandon, V. Inhibition of HIV-1 Integrase gene expression by 10-23 DNAzyme. J Biosci, 2012. 37: 493-502.

38. Sood, V., Gupta, N., Bano, A.S., Banerjea, A.C. DNA-enzyme-mediated cleavage of human immunodeficiency virus type 1 Gag RNA is significantly augmented by antisense-DNA molecules targeted to hybridize close to the cleavage site. Oligonucleotides, 2007.17: 113-121.

39. Vester, B., Hansen, L.H., Lundberg, L.B., Babu, B.R., Sorensen, M.D., Wengel, J., et al. Locked nucleoside analogues expand the potential of DNAzymes to cleave structured RNA targets. BMC mol biol 2006. 7: 19.

40. Vester, B., Lundberg, L.B., Sorensen, M.D., Babu, B.R., Douthwaite, S., Wengel, J. LNAzymes: incorporation of LNA-type monomers into DNAzymes markedly increases RNA cleavage. J Am Chem Soc, 2002. 124: 13682-13683.

41. Wachowius, F., Javadi□Zarnaghi, F., Höbartner, C. Combinatorial mutation interference analysis reveals functional nucleotides required for DNA catalysis. Angew Chem Int Ed Engl, 2010. 49: 8504-8508.

42. Walsh, S.M., Sachdeva, A., Silverman, S.K. DNA catalysts with tyrosine kinase activity. J Am Chem Soc, 2013. 135: 14928-14931.

Archive of SID



www.SID.ir