

نانوفناوری RNA و کاربرد آن در ژن درمانی سرطان ریه

فهیمة چربگو^۱، مهرداد بهمنش^{۱*}، سهامه محبی^۱، زینب شیروانی فارسانی^۲

۱- گروه نانوزیست فناوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده:

ماکرومولکول‌های زیستی اعم از DNA، RNA و پروتئین‌ها به دلیل دارا بودن پتانسیل‌های ذاتی ویژه، به عنوان واحدهای ساختاری برای تهیه نانواپزارها، بکار گرفته می‌شوند. پروتئین‌ها در نانوزیست‌فناوری بصورت گسترده مورد استفاده قرار گرفته‌اند و نانوفناوری DNA نیز از جوانب بسیاری مطالعه شده است. اما مفهوم نانوفناوری RNA اخیراً مطرح گردیده است و اولین شواهد مبنی بر ساخت نانوذرات RNA از طریق فرایند خودساماندهی چندین مولکول RNA طبیعی یا مهندسی شده، در سال ۱۹۹۸ مطرح شد. از آنجایی که مولکول‌های RNA به مانند DNA به سهولت قابل دست‌ورزی بوده و مثل پروتئین‌ها دارای تنوع بسیار در ساختار و عملکرد خود هستند، در نانوزیست‌فناوری بسیار مورد توجه واقع شده‌اند. نانوذرات RNA طی فرایند خودساماندهی و با استفاده از میانکنش‌های هماهنگ، بین مولکول‌های RNA گرد هم می‌آیند و ساختارهای دو یا سه بعدی را ایجاد می‌کنند. اولین و بهترین RNA با کاربرد نانوفناوری که تاکنون شناخته شده، موتور packing RNA باکتریوفاژ $\phi 29$ است که قابلیت ایجاد دایمر، تریمر و هگزامر را داراست. به این نانوذرات، می‌توان مولکول‌های درمانی، تشخیصی و گیرنده‌ها، اعم از siRNA، ریبوزیم‌ها و آپتامرهای RNA را متصل نمود. از جمله عوامل درمانی قابل استفاده، siRNAهای طراحی شده علیه سرطان ریه است. در این سرطان، بافت بدخیم در یک یا هر دو ریه رشد می‌کند. سرطان ریه یکی از همه‌گیرترین سرطان‌ها در سراسر جهان است و بیش از ۸۰٪ بیماران در کمتر از ۵ سال از زمان شناسایی بیماری، جان خود را از دست می‌دهند. از بین همه siRNAهای مورد استفاده برای درمان سرطان ریه، siRNAهای ژن‌های KRAS و P53 تأثیر بیشتری در بهبودی این بیماری نشان داده‌اند. در این مقاله، مفاهیم مربوط به ساختار و عملکرد RNAهای مورد استفاده در نانوزیست‌فناوری، رویکردهای مورد استفاده به منظور مهندسی یا ساخت این RNAها و تبدیل آنها به نانوذرات کاربردی مرور گشته و نقش آنها در درمان سرطان ریه بررسی شده است.

واژگان کلیدی: سرطان ریه، نانوفناوری RNA، خودسامان‌دهی، مولکول‌های RNA درمانی

* نویسنده مسئول:

دکتر مهرداد بهمنش، دانشیار ژنتیک، گروه ژنتیک، طبقه چهارم، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، بزرگراه جلال آل احمد، پل نصر، تهران، ایران، پست الکترونیک: Behmanesh@modares.ac.ir

مقدمه:

سرطان ریه از مهم‌ترین سرطان‌ها در جوامع بشری است که به دلیل شیوع بالا و تاثیرات اجتماعی و اقتصادی ناشی از آن اهمیت زیادی دارد. در این بیماری یک یا هر دو ریه، بواسطه رشد بافت بدخیم درگیر می‌شود. سرطان بیماری است که در آن رشد خارج از کنترل سلول‌ها پدید می‌آید. با توجه به منشا سلولی که دچار تراختی و سرطان شده است انواع متفاوتی از سرطان ریه پدید می‌آید که هر کدام نشانه‌های خود را دارند:

سرطان ریه سلول‌های کوچک (SCLC):^۱ سلول‌های سرطانی گونه کوچک در زیر میکروسکوپ مانند جوی دو سر دیده می‌شود و به آن سرطان جو مانند^۲ نیز گفته می‌شود. روند رشد و تکثیر این گونه از سرطان ریه سریع بوده و در زمان کوتاهی در اندام‌های دیگر پراکنده می‌شود. نزدیک ۲۰٪ سرطان‌های ریه از این گونه هستند.

سرطان ریه غیر سلول‌های کوچک (NSCLC):^۳ این گونه سرطان ریه از نظر نوع سلول پدیدار شده در بافت ریه که دچار تراختی و سرطان شده است به انواع مختلفی دسته‌بندی می‌شود:

سرطان بافت بصره‌ای:^۴ این سرطان از همه‌گیرترین گونه‌های سرطان ریه است و آغاز آن بیشتر از نایژه‌ها است و در مقایسه با دیگر گونه‌های سرطان ریه رشد آهسته‌تری دارد و زمان زیادی به طول می‌انجامد تا به اندام‌های دیگر دست اندازی کند.

سرطان غده‌های تراوش کننده مخاط و رگ‌های لنفاوی:^۵ این گونه سرطان ریه بیشتر در زیر بافت پوششی نایژه‌ها یا در مجرایهای لنفاوی کناری- بیرونی ریه رشد می‌کند.

سرطان ریه با سلول‌های بزرگ:^۶ این گونه سرطان بیشتر در شاخه‌های کوچکتر نایژه‌ها دیده می‌شود [۱].

از هر پنج بیمار سرطان ریه یکی از آنها، دچار گونه سلول‌های کوچک و دیگران از گونه بزرگ است. گونه کمیابی از سرطان ریه نیز به نام مزوتلیوما^۷ شناخته می‌شود. این گونه سرطان ریه سبب تغییر شکل در بافت

پوششی ریه می‌شود و در افرادی پدید می‌آید که با آربست (پنبه نسوز) سروکار داشته‌اند. سرطان ریه یکی از همه‌گیرترین سرطان‌ها در سراسر جهان است و بیش از ۸۰٪ بیماران در کمتر از ۵ سال از زمان شناسایی بیماری جان خود را از دست می‌دهند. دلیل این امر آن است که بیشتر بیماران مبتلا به سرطان ریه در طی مراحل پیشرفته بیماری و زمانی که انجام عمل جراحی چندان امکان پذیر نیست، متوجه بیماری می‌شوند. بنابراین یافتن روش‌های درمانی موثر برای این بیماری گامی اساسی در کاهش مرگ و میر ناشی از آن است.

امروزه به دلیل کارایی بالا، مطالعات و تحقیقات به سمت استفاده از شاخصه‌های مولکولی، ژنتیکی و استفاده از سیستم زیستی با فناوری جدید برای یافتن مارکرهای پیش‌آگهی دهنده و درمانی سوق پیدا کرده است. در این بین، نانوفناوری مبتنی بر RNA به دلیل پتانسیل‌های بالقوه نانوذرات در تشخیص و احتمالاً درمان سرطان، عفونت‌های ویروسی، بیماری‌های ژنتیکی و دیگر بیماری‌های انسانی، بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۳،۲].

مولکول‌های RNA همانند مولکول‌های DNA به راحتی قابل دست‌ورزی هستند. علاوه بر جفت شدن بازی واتسون-کریکی موجود در DNA، جفت شدن بازی غیرعادی از قبیل جفت شدن گوانین با آدنین یا اوراسیل نیز در RNA قابل شکل‌گیری است که شرایط مناسبی برای تبدیل RNA به موتیف‌های ساختاری پایداری را فراهم می‌کند. RNAها همچنین، به دلیل داشتن ساقه-لپ‌های^۸ تک‌رشته‌ای فراوان، قادر به برقراری میان‌کنش‌های درون و بین مولکولی مختلفی هستند که یک مزیت عمده برای استفاده از آنها در زمینه تحقیقات نانو به حساب می‌آید.

از دیگر تفاوت‌های RNA نسبت به DNA، پایداری دمایی بالای RNAهایی با اندازه کوچک است. پایداری ترمودینامیکی ماریچ RNA-RNA نیز از دیگر ماریچ‌های اسیدهای نوکلئیک بالاتر می‌باشد. بنابراین نانوذرات RNA بطور کلی به لحاظ ترمودینامیکی بسیار پایدارتر از نانوذرات DNA هستند. مولکول‌های RNA ساختارهای مختلفی را به خود می‌گیرند که با

¹ Small cell lung cancer

² Oat-shaped

³ Non-small cell lung cancer

⁴ Squamous cell carcinoma

⁵ Adenocarcinoma

⁶ Large cell carcinoma

⁷ Mesothelioma

⁸ Stem-loop

بزرگ رایج است. اساس درمان در این نوع از سرطان ریه عمدتاً بر پایه استفاده از فاکتور مهارکننده‌های EGFR است [۹،۸]. همچنین ناهنجاری‌هایی کروموزومی در ناحیه‌ی 3P، 5P، 14P و 17P در سرطان ریه با سلول‌های کوچک گزارش شده است [۱۰]. نانوفناوری با توان انتقال مهار کننده‌های این ژن‌ها به درون سلول‌های سرطانی ریه، امیدهایی را برای ارائه روش‌های درمانی مؤثر ایجاد نموده است.

نانو ساختارهای RNAی

در نانوفناوری RNA، از میان‌کنش‌های بین مولکولی RNA که ناشی از طبیعت مکمل شدن بازها است، برای ایجاد نانو ساختارها استفاده می‌شود. طیف وسیعی از ساختارهای متنوع با کنترل دقیق بر هندسه، توپولوژی و تناوب آنها قابل ایجاد است [۱۱]. از جمله ساختارهایی که با استفاده از RNA و DNA می‌تواند تشکیل شود، عبارتند از:

ساختارهای *3 way junction* و *4 way junction*:

این ساختارها، شامل سه یا چهار ساقه هستند که از یک انتها به یکدیگر اتصال یافته و در میان خود فضای حلقه مانند فاقد پیوند هیدروژنی را فراهم نموده و به عبارت دیگر تقاطع‌های سه یا چهار شاخه‌ی اسید نوکلئیکی ایجاد می‌کنند. تصویر (3WJ) *3 way junction* در شکل ۱-الف آورده شده است [۱۲،۱۳].

ساختارهای *Jigsaw puzzle*:

این واحدهای ساختاری حاصل از توالی‌های اسید نوکلئیکی است که بعد از بدست آوردن ساختمان دوم به صورت یک ساقه در می‌آیند که از هر دو انتها به لوپ ختم شده است. این ساقه در نقطه میانی خود دارای انحنای ۹۰ درجه است (شکل ۱-ب) [۱۴]. دو لوپ موجود در این واحدهای ساختاری توالی مکمل با یکدیگر دارند که قابلیت ایجاد پیوندهای جفت بازی مکمل بین مولکولی را میان دو یا چند ساختار *jigsaw puzzle* فراهم می‌نماید و با گسترده شدن در دو جهت X و Y باعث تولید طیف وسیعی از ساختارهای سه بعدی متنوع اعم از دستجات RNAی می‌گردد. وارد نمودن برآمدگی‌ها^۶ به درون مارپیچ RNA باعث تولید دستجات پیچ خورده می‌شود [۱۵،۱۶]. اخیراً بسیاری از

استفاده از این ساختارها، نانوذرات RNAی با کاربردهای متنوع می‌توان ایجاد نمود. فرآیند ساخت نانوذرات RNA شامل چند مرحله متفاوت است.

در ابتدا باید خواص مطلوب نانوذره تعریف شده و با استفاده از رویکردهای محاسباتی و کامپیوتری ساختار و نتایج میان‌کنش‌های بین RNAها در فرآیند خودسامان‌دهی^۱ نانوذرات RNAی، پیشگویی شود. پس از ساخت واحدهای ساختاری منومریک، با روش آنزیمی و یا با روش‌های شیمیایی، زیر واحدهای منفرد به ساختارهای چندجزئی، خودسامان‌دهی می‌شوند. بعد از آن، نانو ساختارهای RNA خودسامان‌یافته، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی AFM^۲، ژل الکتروفورز و یا سایر تکنیک‌ها بررسی می‌شوند تا از فولدینگ^۳ مناسب، ساختار و عملکرد مطلوب آنها اطمینان حاصل شود. در نهایت نانوذره حاصل به عنوان نانوبازار، نانودارو و غیره مورد استفاده قرار می‌گیرد [۴].

ژنتیک بیماری:

ژن‌های بسیاری از جمله ژن‌های مسیر MAPK و CHRNA5-CHRNA3 در ایجاد سرطان ریه دخیل هستند. حذف، تغییر چهارچوب و جایگزینی در نواحی بسیار حفاظت شده مانند D398N در ژن CHRNA5 از جمله جهش‌هایی است که در بیماری گزارش شده است [۵،۶]. سرطان ریه یک بیماری شدت ناهمگون^۴ با بیش از ۵۰ نوع متفاوت می‌باشد. مشابه دیگر سرطان‌ها این بیماری نیز می‌تواند در اثر فعال شدن یک آنکوژن و یا غیر فعال شدن یک ژن مهارکننده تومور به وجود آید. ژن مهارکننده تومور p53 که در ناحیه کروموزومی 17p قرار دارد در ۶۰٪ تا ۷۵٪ موارد تأثیرگذار است. آنکوژن‌ها از پروتوآنکوژن‌ها در زمان مواجهه با یک عامل سرطان‌زا حاصل می‌شوند. جهش در پروتوآنکوژن KRAS نیز مسئول ۱۰٪ تا ۳۰٪ سرطان‌های ریه است [۷]. علاوه بر این‌ها، جهش در گیرنده فاکتور رشد اپیدرمال^۵ که تمایز سلولی، آپوپتوز، رگ‌زایی و تهاجم تومور را تنظیم می‌کند نیز در سرطان ریه با سلول‌های

¹ Self-assembly

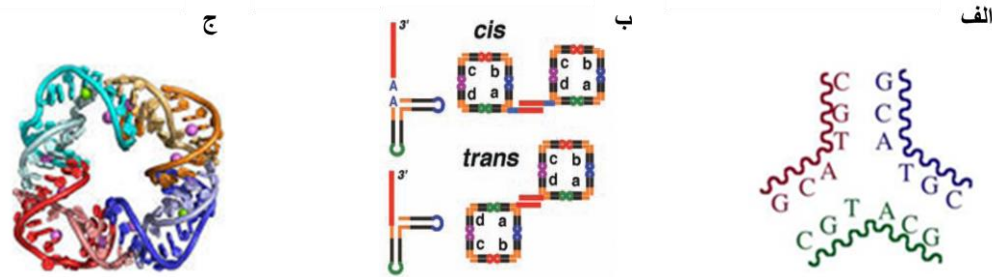
² Atomic Force Microscopy

³ Folding

⁴ Heterogeneous

⁵ Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

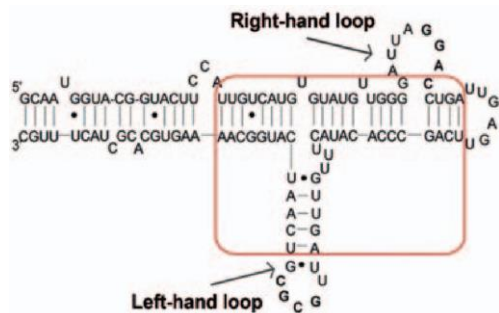
⁶ Bulge



شکل ۱- نمونه‌هایی از ساختارهایی که بواسطه کنارهم قرار گرفتن چند رشته اسید نوکلئیک و یا تشکیل جفت باز بین قسمت‌های مختلف یک مولکول ایجاد می‌شود

(الف). ساختار 3 way Junction. ب. ساختار Jigsaw puzzle. ج. ساختار RNA آریگامی [۱۴].

- (۱) دومین میانکنش کننده‌ی درون مولکولی
- (۲) دومین پک کننده^۵ ماریپچ دورشته‌ی DNA که در شکل ۲ قابل مشاهده هستند [۲۸].



شکل ۲- ساختار منومر pRNA که دامین‌های آن مشخص شده‌اند [۲۸].

ویروس باکتریوفاژ $\phi 29$ به منظور وارد نمودن DNA به درون کپسید خود که به لحاظ نیاز به انرژی فرآیندی نامطلوب است، از ساختار پیچیده و جالب توجهی استفاده می‌کند که شکل‌گیری آن در طی چندین مرحله صورت می‌گیرد. ابتدا در محل انتهایی پروکپسید^۶ ویروس، یک مجموعه پروتئینی، متشکل از ۱۲ زیرواحد، بصورت حلقوی اطراف پیش‌سر^۷ در پروکپسید را احاطه می‌کند. این مجموعه پروتئینی را که کانال عبور DNA دو رشته‌ای به درون فضای پروکپسید ویروس می‌باشد متصل کننده^۸ می‌نامند. این کمپلکس پروتئینی حاوی دومین‌های اتصال به RNA است. در مرحله بعد، شش عدد از pRNAهای ویروس از طریق میانکنش‌های بین مولکولی در ناحیه‌ی لوپ‌های خود، مولتی‌مر^۹ شده و یک

داربست‌های مکعبی و داربست‌های دو بعدی RNAها، تحت عنوان RNA آریگامی‌ها نیز با استفاده از همین دستجات اسید نوکلئیکی ساخته شده‌اند (شکل ۱-ج) [۹-۷]. قابل ذکر است که در ساختار هر puzzle jigsaw نوعی ساختار 3WJ نیز نهفته است.

از دیگر ساختارهای قابل ایجاد با RNA می‌توان به شبکه‌های سه بعدی بزرگ RNA، هگزامرهای RNA، موتیف‌های ضربدری^۱ و سفال‌های RNA اشاره نمود که به دلیل تخصصی بودن از دیدگاه نانوفناوری، به توضیح مبسوط آنها پرداخته نشده است [۲۰-۲۶].

انواع RNAهای مورد استفاده در

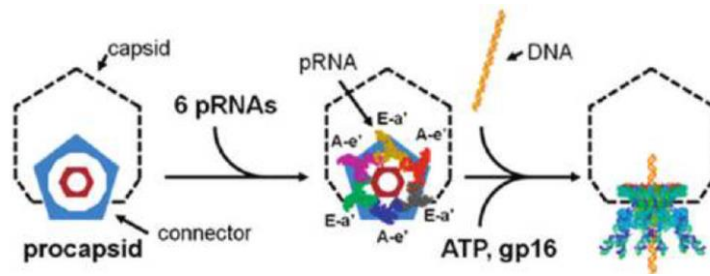
نانوزیست‌فناوری:

موتور pRNA باکتریوفاژ $\phi 29$:

بررسی‌های انجام گرفته بر روی باکتریوفاژ $\phi 29$ که آلوده‌کننده‌ی باکتری باسیلوس سوبتیلیس^۲ می‌باشد، منجر به کشف یک رونوشت RNAی کوچک، با قابلیت‌های ویژه شد [۲۷]. این RNA، متشکل از ۱۱۷ نوکلئوتید، دارای ساختار سه بعدی پیچ خورده خاصی بصورت یک ساقه بلند است که در انتها دو شاخه شده و هر شاخه به لوپ‌هایی ختم می‌شود. به دلیل اینکه این RNA در فرآیند بسته‌بندی DNA ویروس به درون کپسید^۳ آن مشارکت دارد به آن packing RNA و یا به اختصار pRNA گویند. pRNA به لحاظ ساختاری حاوی دو دومین^۴ عملکردی است که عبارتند از:

⁵ Packing
⁶ Procapsid
⁷ Prohead
⁸ Connector
⁹ Multimere

¹ Crossover
² Bacillus subtilis
³ Capsid
⁴ Domain



شکل ۳- تصویر شماتیک از فرآیند داخل شدن DNA ویروس فی ۲۹ به درون پروکپسید آن به کمک هگزامر [28] pRNA

آنچه در شکل ۴ نشان داده شده است، این ساختار می‌تواند با ایجاد پیوندهای مکمل بین لوپ سمت چپی یک pRNA با لوپ سمت راستی مولکول pRNA دیگر، مولتی‌مرهایی از قبیل دایمر، تریمر و هگزامر را ایجاد نماید که اندازه‌ای در حدود ۲۰-۴۰ نانومتر خواهند داشت. این دامنه اندازه، بهترین حالت برای جلوگیری از حذف^۳ زیاد و سریع از خون و یا تحریک پاسخ‌های ایمنولوژیک در سیستم‌های زنده می‌باشد.

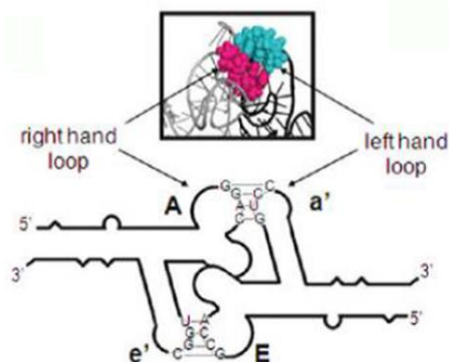
بررسی‌های صورت گرفته بر روی ساختار pRNA نشان داده است که دومین پک کننده‌ی مارپیچ دورشته‌ای DNA که در انتهای ۳' و ۵' قرار گرفته است، یک دومین مستقل بوده و حذف و اضافه کردن نوکلئوتید در انتهای ۵' تا نوکلئوتید ۲۳ و در انتهای ۳' از نوکلئوتید ۹۷ به بعد، هیچگونه تاثیری بر روی پیچ خوردن دومین میانکنش کننده درون مولکولی ندارد. بنابراین می‌توان قسمت‌هایی از این دومین را با مولکول‌های RNA مختلف از جمله siRNAها، RNAهای درمانی دیگر و یا مولکول‌های تشخیصی و یا اپتامرها جایگزین نمود و با استفاده از قابلیت خودسامان‌دهی این رونوشت، آن را به صورت نانوذره درآورد و در کاربردهای نانوفناوری مورد استفاده قرار داد [۳۱، ۲۹]. میانکنش‌هایی که در فرآیند پلیمری شدن منومرهای pRNA به یکدیگر قابل مشاهده است عبارتند از میانکنش‌های "دست در دست"^۴ و میانکنش‌های "پا در پا"^۵ که در شکل ۵ آورده شده‌اند [۱۴].

مولکول‌های Tecto-RNA:

Tecto-RNA، مولکول‌های RNA مصنوعی هستند که با الگوبرداری از RNAهای ریبوزومی به شیوه‌ای

هگزامر را ایجاد می‌کنند. این هگزامر به وسیله دومین اتصال به RNA در کمپلکس متصل کننده، روی آن قرار می‌گیرد و سپس، DNA با استفاده از فرآیند هیبریداسیون از یک انتها، در حالیکه انتهای دیگر آن آزاد است، به هگزامر متصل می‌شود، سپس بعد از فراهم شدن ATP توسط پروتئینی بنام gp16 و هیدرولیز آن، کمپلکس connector-6pRNA مانند چرخ دنده‌ای به چرخش در می‌آید و انتهای آزاد DNA را به داخل پروکپسید هدایت می‌کند و منجر به فشرده شدن DNA به درون آن می‌گردد. به علت قابلیت pRNA در تشکیل مولتی‌مرها، از طریق فرآیند خودسامان‌دهی، این رونوشت RNAی در نانوفناوری بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۳۰، ۲۹]. تصویر فرآیند وارد شدن DNA ویروس به درون کپسید آن در شکل ۳ آورده شده است.

در ساختار pRNA لوپ نزدیک به انتهای ۵' را لوپ سمت راستی و لوپ نزدیک به انتهای ۳' را لوپ سمت چپی می‌نامند. توالی نوکلئوتیدی لوپ سمت راستی^۱ مکمل لوپ سمت چپی^۲ است و به همین دلیل همانند



شکل ۴- دایمر شدن منومرهای pRNA از طریق هیبریداسیون نواحی لوپ [۲۸].

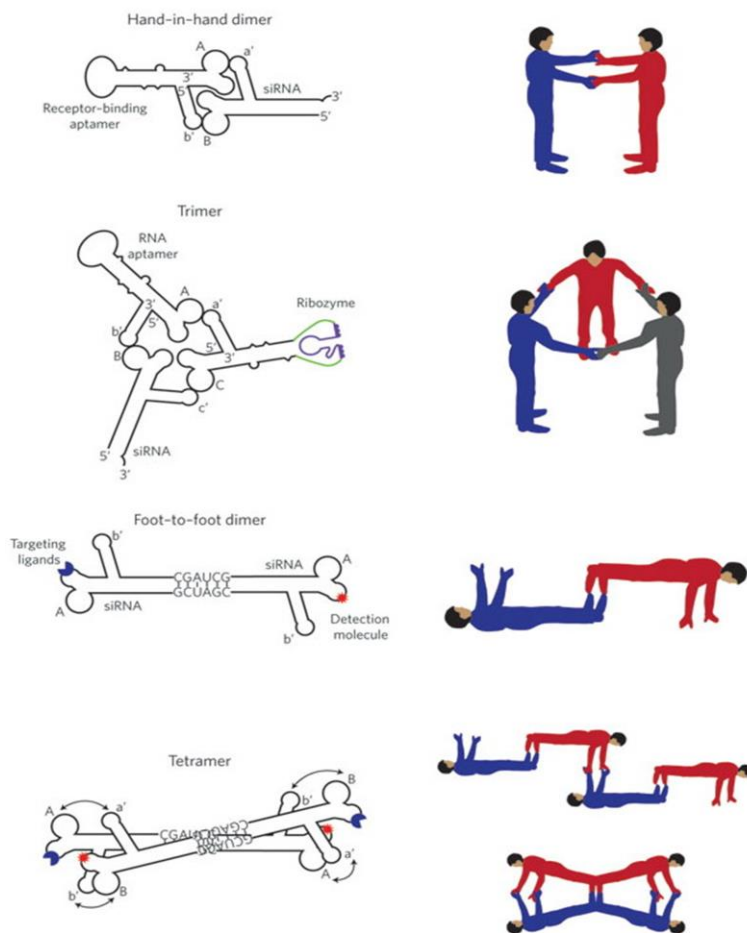
³ Clearance

⁴ Hand-in-hand

⁵ Foot-to-foot

¹ Right loop

² Left loop



شکل ۵ - انواع میانکنش‌های بین مولکولی که منجر به مولتی‌مر شدن خودبخودی منوهای pRNA می‌گردد [۲۴].

همانطور که قبلاً اشاره شد، جایگزینی توالی انتهای ۳' و ۵' با توالی‌ها و مولکول‌های نوکلئیک اسیدی دیگر تأثیری بر فعالیت و پیچ‌خوردگی^۱ منو pRNA ندارد، بنابراین امکان جایگزینی این ناحیه با مولکول‌های تشخیصی مختلف مانند siRNAها، ریبوزیم‌ها^۲ و RNAهای آنتی‌سنس^۳ وجود دارد. siRNAها مولکول‌های کوچک دو رشته‌ای با طول در حدود بیست نوکلئوتید هستند که بعد از ورود به سلول و فراخواندن کمپلکس پروتئینی ریسک (RISC)^۴ امکان شکستن بخشی از mRNA که مکمل با توالی آن است را فراهم می‌کند. این مولکول در ژن‌درمانی کاربرد فراوان دارد، اما میزان انتقال آن به سلول با حامل‌های مورد استفاده متفاوت است. در استفاده از نانوذرات RNAی انتقال

طراحی شده‌اند که قابلیت ایجاد فیبرهای RNA از طریق فرآیند خودسامان‌دهی را دارا هستند و بنابراین در کاربردهای نانوفناوری مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرند [۳۲]. مولکول‌های Tecto-RNA دارای نواحی مکمل هستند که با ایجاد پیوند واتسون-کریکی و غیر واتسون کریکی، قابلیت هیبریداسیون دارند و بنابراین یک مولکول می‌تواند به مولکول مشابه مجاور خود اتصال یابد و رشته‌های طولی از را در مقیاس نانو ایجاد نماید که هم به لحاظ جهت و هم به لحاظ هندسه قابل کنترل هستند. این فیبرهای RNA به عنوان داربست‌های نانویی در مهندسی بافت و دیگر زمینه‌ها کاربرد دارند (شکل ۶) [۳۳].

کاربرد نانوذرات RNAی در ژن‌درمانی سرطان

ریه:

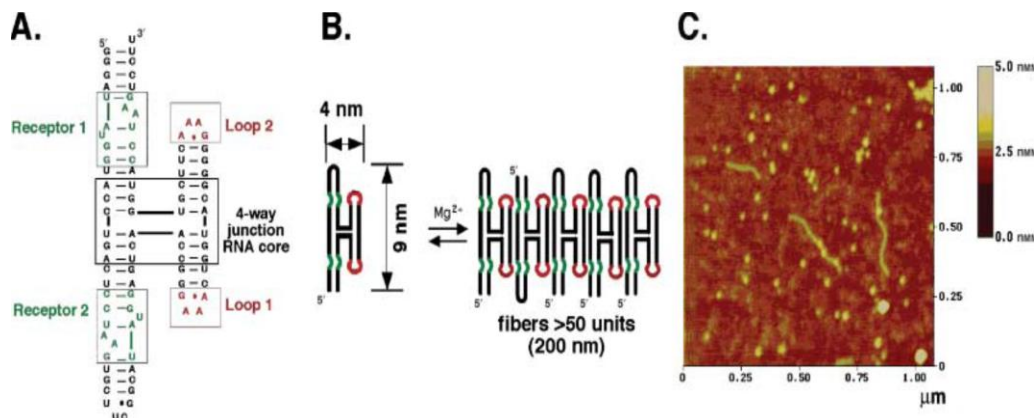
نانوذرات RNAی رویکردهای تکامل یافته‌ای را برای تشخیص و درمان هدفمند بیماری‌ها فراهم آورده‌اند.

¹ Folding

² Ribozyme

³ Antisense RNA

⁴ RISC: RNA-Induced Silencing Complex



شکل ۶ - توالی مولکول Tecto-RNA که نواحی دارای قابلیت هیبریداسیون در آن مشخص شده است و فیبری که از پلیمریزه شدن منومرهای Tecto-RNA ایجاد شده است [۲۳].

افزایش یافت و منجر به از بین رفتن تومور شد [۳۵]. از دیگر مطالعات صورت گرفته بر روی درمان سرطان ریه با نانوذرات RNAی، از بین بردن مقاومت دارویی در بیماران دارای سرطان ریه NSCLC با استفاده از این نانوذرات است. پلاتین، یک عامل مخرب DNA و دارویی در درمان تسکین بخش سرطان ریه NSCLC پیشرفته است اما بسیاری از بیماران به این دارو مقاومت پیدا می کنند. با توجه به این که عملکرد ضد توموری p53 ثابت شده است، سرکوب این پروتئین منجر به گسترش تومور می گردد. مطالعات بسیاری نشان دادند که یکسری miRNAها در سلول سرطانی مقاوم به سیس پلاتین، باعث سرکوب فعالیت p53 و پیشروی تومور می گردد. امروزه امید می رود که بتوان از مولکول های RNA کوچک در قالب نانوذرات برای مهار بیان این miRNAها و بنابراین رفع مقاومت دارویی در سرطان ریه NSCLC، استفاده کرد [۳۶].

نتیجه گیری:

سرطان ریه از مهم ترین سرطان ها در سرتاسر جان است که به دلیل شیوع بالا و خطرات ناشی از آن اهمیت بسیاری پیدا کرده است. از آنجایی که فراوانی مرگ و میر در این بیماری بسیار بالاست بنابراین استفاده از روش های درمانی و تشخیصی به موقع، موثر و با کارایی بالا مورد توجه محققین قرار گرفته است. از میان استراتژی های درمانی مختلف، ژن درمانی به دلیل خاموش کردن بیان یک ژن کلیدی که منجر به توقف تمامی مسیرهای پایین دستی آن می شود تاثیرگذارترین استراتژی است. اما استفاده از وکتور و یا عامل مناسب برای انتقال عامل درمانی به درون سلول با کارایی بالا

این مولکول با کارایی بالا نشان داده شده است [۳۴،۳۱]. از جمله مولکول های siRNAی که به منظور افزایش امکان درمان سرطان ریه توسط نانوذرات RNAی به سلول های ریوی منتقل شده اند، siRNAهای طراحی شده بر علیه ژن های KRAS و p53 است. زیرا که به نظر می رسد ایجاد جهش در این دو ژن و اختلال در عملکرد آنها از عمده ترین دلایل ایجاد سرطان ریه است. ژن KRAS یک پروتئین کوچک را کد می کند که به GTP متصل گشته و در بسیاری از فرایندهای سلولی از جمله تکثیر، تمایز و آپوپتوز شرکت می کند. نوع طبیعی KRAS فعالیت GTPase ذاتی دارد که پس از اتصال به GTP هیدرولیز آن به GDP را کاتالیز می نماید و بدین وسیله سیگنال محرک رشد RAS را فعال می نماید، در حالی که نوع جهش یافته و انکوژنیک KRAS در حالت متصل به GTP قفل شده و سبب فعال شدن مسیر پیام رسانی دیگری از RAS می شود که در ایجاد، پیشرفت و حفظ تومور موثر است. با اتصال siRNAی AdH1/siK-Ras به نانوذرات RNAی و ترنسفکشن^۱ نمودن سلول های H441 که RAS جهش یافته و نه طبیعی را بیان می کردند، مهار بیان ژن به صورت قابل ملاحظه ای صورت گرفت و با تزریق آن به موش توموری، مانع توسعه تومور در ریه آن شد. این درحالی است که در مدل کنترل بعد از ۵ هفته تومور قابل مشاهده ای در ریه ایجاد گردید. با تزریق مداوم این نانوذره ای درمانی تومور به سمت کوچک شدن پیش رفت. از آنجایی که نانوذره در انتقال AdH1/siK-Ras به بافت توموری موفق عمل کرد، میزان آپتوز

^۱ Transfection

- with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(5):339-346.
- 10) Slebos RJ, Livanos E, Yim HW, et al. Chromosomal abnormalities in bronchial epithelium from smokers, nonsmokers, and lung cancer patients. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2005;159(2):137-142.
 - 11) Rossi JJ. RNA nanoparticles come of age. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. 2011; 43(4):245-247.
 - 12) Lescoute A, Westhof E. Topology of three-way junctions in folded RNAs. *RNA*. 2006;12(1):83-93.
 - 13) Ouellet J, Melcher S, Iqbal A, Ding Y, Lilley DM. Structure of the three-way helical junction of the hepatitis C virus IRES element. *RNA*. 2010;16(8):1597-1609.
 - 14) Chworos A, Severcan I, Koyfman AY, et al. Building programmable jigsaw puzzles with RNA. *Science*. 2004; 306(5704):2068-2072.
 - 15) Dietz H, Douglas SM, Shih WM. Folding DNA into twisted and curved nanoscale shapes. *Science*. 2009;325(5941):725-730.
 - 16) Shu D, Moll WD, Deng Z, Mao C, Guo P. Bottom-up Assembly of RNA Arrays and Superstructures as Potential Parts in Nanotechnology. *Nano Letters*. 2004;4(9):1717-1723.
 - 17) Rothmund PW. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006;440(7082):297-302.
 - 18) Endo M, Seeman NC, Majima T. DNA tube structures controlled by a four-way-branched DNA connector. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 2005;44(37):6074-6077.
 - 19) Jaeger L, Chworos A. The architectonics of programmable RNA and DNA nanostructures. *Current Opinion in Structural Biology*. 2006;16(4):531-543.
 - 20) Afonin KA1, Bindewald E, Yaghoubian AJ, et al. In vitro assembly of cubic RNA-based scaffolds designed in silico. *Nature Nanotechnology*. 2010;5(9):676-682.
 - 21) Cherny DI, Eperon IC, Bagshaw CR. Probing complexes with single fluorophores: factors contributing to dispersion of FRET in DNA/RNA duplexes. *European Biophysics Journal*. 2009;38(4):395-405.
 - 22) Yingling YG1, Shapiro BA. Computational design of an RNA hexagonal nanoring and an RNA nanotube. *Nano Letters*. 2007;7(8):2328-2334.
- بسیار مهم است. در درمان سرطان ریه از siRNAهای متنوعی که ژنهای ایجاد کننده بیماری از جمله KRAS و P53 را مهار می کنند استفاده شده است، اما انتقال این مولکول های درمانی با نانوذرات RNA درمان را موثرتر خواهد نمود. این نانوذرات توانایی انتقال بالا و نفوذ به بافت هدف را به siRNAها فراهم می کنند. گزارشات علمی متعددی، کاربردهای نانو ساختارهای RNA را نشان داده و در مجموع به نظر می رسد که این فناوری دارای قابلیت های بالقوه ای است که می تواند نقش تعیین کننده ای در آینده علوم مختلف از جمله زیست شناسی و پزشکی ایفا نماید.

منابع:

- 1) Cagle, PT, Chirieac LR, Advances in treatment of lung cancer with targeted therapy. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*. 2012;136(5):504-509.
- 2) Guo S, Huang F, Guo P. Construction of folate-conjugated pRNA of bacteriophage phi29 DNA packaging motor for delivery of chimeric siRNA to nasopharyngeal carcinoma cells. *Gene Therapy*. 2006;13(21):1553.
- 3) Pirolo KF, Chang EH. Targeted delivery of small interfering RNA: approaching effective cancer therapies. *Cancer Research*. 2008;68(5):1247-1250.
- 4) Guo P. RNA nanotechnology: engineering, assembly and applications in detection, gene delivery and therapy. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2005;5(12):1964-1982.
- 5) Seki Y, Suzuki N, Imaizumi M, et al. STAT3 and MAPK in human lung cancer tissues and suppression of oncogenic growth by JAB and dominant negative STAT3. *International Journal of Oncology*. 2004;24(4):931-934.
- 6) Spitz MR, Amos CI, Dong Q, Lin J, Wu X. The CHRNA5-A3 region on chromosome 15q24-25.1 is a risk factor both for nicotine dependence and for lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2008;100(21):1552-1556.
- 7) D'Arcangelo M, Cappuzzo F. K-Ras Mutations in Non-Small-Cell Lung Cancer: Prognostic and Predictive Value. *International Scholarly Research Network Molecular Biology*. 2012;1-8.
- 8) Sellers WR, Meyerson M. EGFR gene mutations: a call for global x global views of cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2005;97(5):326-328.
- 9) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, et al. Clinical and biological features associated



- Lung Cancer Gene Therapy: A License to Kill. *Cancer Biology & Therapy*. 2006; 5(12):1724-1725.
- 36) Chen XQ, Yang S, Li ZY, Lu HS, Kang MQ, Lin TY. Effects and mechanism of downregulation of survivin expression by RNA interference on proliferation and apoptosis of lung cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. 2012;5(4):917-922.
- 23) Bindewald E1, Hayes R, Yingling YG, Kasprzak W, Shapiro BA. RNA Junction: a database of RNA junctions and kissing loops for three-dimensional structural analysis and nanodesign. *Nucleic Acids Research*. 2008;36(Database issue):D392-397.
- 24) Guo P. The emerging field of RNA nanotechnology. *Nature Nanotechnology*. 2010;5(12):833-842.
- 25) Rothmund PW, Papadakis N, Winfree E. Algorithmic self-assembly of DNA Sierpinski triangles. *PLoS Biology*. 2004;2(12):e424.
- 26) Park SH, Barish R, Li H, et al. Three-helix bundle DNA tiles self-assemble into 2D lattice or 1D templates for silver nanowires. *Nano Letters*. 2005;5(4):693-696.
- 27) Guo PX, Erickson S, Anderson D. A small viral RNA is required for in vitro packaging of bacteriophage phi 29 DNA. *Science*. 1987;236(4802):690-694.
- 28) Liu J, Guo S, Cinier M, et al. Fabrication of stable and RNase-resistant RNA nanoparticles active in gearing the nanomotors for viral DNA packaging. *ACS Nano*. 2011;5(1):237-246.
- 29) Shu D, Huang LP, Hoeplich S, Guo P. Construction of phi29 DNA-packaging RNA monomers, dimers, and trimers with variable sizes and shapes as potential parts for nanodevices. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 2003;3(4):295-302.
- 30) Zhang F, Lemieux S, Wu X, St-Arnaud D, et al. Function of hexameric RNA in packaging of bacteriophage phi 29 DNA in vitro. *Molecular Cell*. 1998;2(1):141-147.
- 31) Khaled A, Guo S, Li F, Guo P. Controllable self-assembly of nanoparticles for specific delivery of multiple therapeutic molecules to cancer cells using RNA nanotechnology. *Nano Letters*. 2005;5(9):1797-1808.
- 32) Jaeger L, Leontis NB. Tecto-RNA: One-Dimensional Self-Assembly through Tertiary Interactions. *Angewandte Chemie International Edition*. 2000; 39(14):2521-2524.
- 33) Hansma HG, Oroudjev E, Baudrey S, Jaeger L. TectoRNA and 'kissing-loop' RNA: atomic force microscopy of self-assembling RNA structures. *Journal of Microscopy*. 2003;212(Pt 3):273-279.
- 34) Guo S, Tschammer N, Mohammed S, Guo P. Specific delivery of therapeutic RNAs to cancer cells via the dimerization mechanism of phi29 motor pRNA. *Human Gene Therapy*. 2005;16(9):1097-1109.
- 35) Lu J, Yu D. Adenoviral-Vector Based siRNA for Mutant K-ras as a Promising Tool for



RNA Nanotechnology in Gene Therapy of Lung Cancer

Fahimeh Charbgoor¹, Mehrdad Behmanesh^{1,2*}, Soham Mohebbi¹,
Zainab Shirvani Farsani²

- 1) Department of Nanobiotechnology, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2) Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract:

Biological macromolecules, including DNA, RNA, and proteins, have intrinsic features that make them potential building blocks for the fabrication of nanodevices. Peptides and proteins have been studied for applications in nanotechnology extensively and the field of DNA nanotechnology is now well established. The concept of RNA nanotechnology has been around for more than a decade, and the first evidence for the construction of RNA nanoparticles through the self-assembly of several re-engineered natural RNA molecules reported in 1998. Since RNA molecules can be designed and manipulated with both a level of simplicity characteristic of DNA and a versatile flexibility in structure and function (including enzymatic activities) similar to that of proteins, there became an interesting candidate for nanotechnological applications. Two and three dimensional structure of RNA nanoparticles can be fabricated by self-assembled interactions of special RNA molecules. The best characterized RNA multiplier and the first to be described in the RNA nanotechnological application is the motor pRNA of bacteriophage phi29 which form dimers, trimers, and hexamers. Both ribozyme or therapeutic siRNA and a receptor binding RNA aptamer have been engineered into individual RNA nanoparticles. The most important disease that needs the help of RNA nanotechnology to improve the degree of malignancy is lung cancer. Lung cancer is one of the widespread cancers all over the world and the patients often died after 5 years of challenging with this disease. Among all siRNAs applied for lung cancer therapy KRAS and P53 siRNAs are most important one on. This review covers the basic concepts of RNA nanoparticles structure and their role in lung cancer therapy.

Keywords: Lung Cancer, RNA Nanotechnology, Self-Assembly, Therapeutic RNAs

* Corresponding Author:

Mehrdad Behmanesh, PhD. Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Email: Behmanesh@modares.ac.ir