Shahid Bahonar University of Kerman

Agricultural Biotechnology Journal

Print ISSN: 2228-6705 Online ISSN: 2228-6500

Iranian Biotechnology Society

Ribonucleases as potential therapeutic agents

Masoume Vakili-Azghandi

PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: m.vakili2009@gmail.com

Mohammadreza Nassiri

*****Corresponding author. Professor, Recombinant Proteins Research group, The Research Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: nassiryr@um.ac.ir

Shahrokh Ghovvati

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Guilan, Rasht, Iran. Email: Ghovvati@guilan.ac.ir

Ali Javadmanesh

Assistant Professor, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Stem Cell Biology and Regenerative Medicine Research Group, Research Institute of Biotechnology, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran. Email: javadmanesh@um.ac.ir

Abstract

Objective

Due to high cytotoxicity effect, ribonucleases (RNases) are known as pharmacological agents with therapeutic potential. The high potential of these enzymes in the destruction of RNA strand and their other substrates and subsequently, cell destruction or cessation of cell division causes a very high cytotoxic effect of this enzyme in various cancer cells. Hence, this review investigates the therapeutic applications of ribonucleases, cell pathways and their mode of action as cytotoxic agents in order to pay attention to them in researches related to the health and therapy fields.

Materials and methods

In this study the keywords such as cancer, ribonuclease, ribonuclease inhibitor and RNA were used to search in databases including Scopus, SID, IranDoc, PubMed, Google Scholar, Web of Science and IranMedex. In order to select the documents used, all articles published in non-English and Persian languages, duplicate articles, articles that could not be accessed to the full

text, as well as articles that were presented as abstracts were removed. Finally, the selected cases were thoroughly studied and summarized in order to prepare the current review.

Results

The study and review of research conducted showed that ribonucleases have the ability to kill tumor cells and that these enzymes have antiviral properties. Bovine pancreatic ribonuclease (RNase A), bovine seminal ribonuclease (BS-RNase), Onconase, and angiogenin are known as RNases with high antitumor activity which exert cytotoxic activity on cancer cells selectively by involving different cellular pathways and/ or enhance the cytotoxicity by mutation. Also, the study of articles related to the function of ribonucleases showed that the investigation of genetic pathways of synthesis and mechanisms of cytotoxicity in these enzymes will provide the development of new pharmaceutical products in the future. Utilization of engineering processes and chemical changes in ligand / receptor structure may increase the toxicity of ribonuclease molecules in order to select cytotoxic pathways on malignant cells. Therefore, it is necessary to discover the therapeutic potential and to study in detail the therapeutic values of ribonucleases.

Conclusions

Ribonucleases are potentially bioavailable drug candidates, and in regard to their toxicity, which is based on the selective hydrolysis of intracellular RNA molecules and specific cell membrane recognition processes, these enzymes can be used as anti-tumor drugs or therapeutic agents.

Keywords: Ribonuclease, cytotoxicity, drug candidate, cellular pathways.

Paper Type: Review Paper.

Citation: Vakili-Azghandi M, Nassiri M, Ghovvati S, Javadmanesh A (2021) Ribonucleases as potential therapeutic agents. *Agricultural Biotechnology Journal* 13(1), 29-56.

Agricultural Biotechnology Journal DOI: 10.22103/jab.2021.16862.1280

Received: December 15, 2020. Accepted: January 13, 2021.

Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society.

© Authors

مجله بیوتکنولوژی کشاورزی
شاپا چاپی: ۶۷۰۵-۲۲۲۸ شاپا الکترونیکی: ۶۵۰۰-۲۲۲۸

ریبونوکلئازها به عنوان عوامل درمانی بالقوه

معصومه وکیلی ازغندی

دانشجوی دکتری، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: m.vakili2009@gmail.com

محمدرضا نصیری

*نویسنده مسئول: استاد، گروه تحقیقاتی پروتئین‌های نوترکیب، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: nassiryr@um.ac.ir

شاهرخ قوتی

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران. رایانامه: ghovvati@guilan.ac.ir

علی جوادمنش

استادیار، گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی و گروه سلول‌های بنیادی و طب بازساختی، پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران. رایانامه: javadmanesh@um.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۹/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۲۴

چکیده

هدف: ریبونوکلئازها به دلیل ایجاد سمیت سلولی به عنوان عوامل دارویی دارای پتانسیل درمانی شناخته می شوند. عملکرد بالای این آنزیم‌ها در تخریب رشته RNA و سایر سوبستراهای آن‌ها و به دنبال آن انهدام سلول و یا توقف تقسیم سلولی باعث بروز اثر سمیت سلولی بسیار بالای آنزیم‌های مذکور در سلول‌های سرطانی مختلف می‌شود. از این رو در مقاله حاضر به بررسی کاربردهای

درمانی ریبونوکلئازها، مسیرهای سلولی و مکانیسم عمل آن‌ها به عنوان عوامل سیتوتوکسیک به منظور توجه به آن‌ها در پژوهش‌های حوزه سلامت و درمان پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه با استفاده از کلید واژه‌های سرطان، ریبونوکلئاز، مهارکننده ریبونوکلئازی و اسید ریبونوکلئیک، در پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر Scopus، SID، IranDoc، PubMed، Google Scholar، Web of Science و IranMedex جستجو انجام شد. به منظور انتخاب مستندات مورد استفاده، تمام مقالاتی که به زبان غیرانگلیسی و فارسی چاپ شده بودند، مقالات تکراری، مقالاتی که امکان دستیابی به متن کامل مقاله وجود نداشت و هم‌چنین مقالاتی که به صورت چکیده ارائه شده بودند حذف گردیدند. نهایتا موارد منتخب به منظور تنظیم مقاله حاضر به طور کامل مطالعه و خلاصه‌سازی شدند.

نتایج: مطالعه و بررسی پژوهش‌های انجام شده نشان داد که ریبونوکلئازها توانایی از بین بردن سلول‌های تومور را دارا بوده و این آنزیم‌ها خصوصیات ضد ویروسی نیز دارند. از میان این آنزیم‌ها ریبونوکلئاز پانکراس گاوی، ریبونوکلئاز سمینال گاوی، آنکوناز و انژیوژنین به عنوان ریبونوکلئازهای با فعالیت آنتی‌توموری بالا شناخته شده‌اند که از طریق مسیرهای مختلف سلولی یا ایجاد جهش در جهت افزایش سمیت سلولی فعالیت سیتوتوکسیتی را علیه سلول‌های سرطانی به‌صورت انتخابی بروز می‌دهند. هم‌چنین مطالعه مقالات مرتبط با عملکرد ریبونوکلئازها نشان داد که بررسی مسیرهای ژنتیکی سنتز و مکانیسم‌های ایجاد سمیت سلولی در این آنزیم‌ها، امکان ایجاد محصولات دارویی جدید را در آینده فراهم خواهد کرد. بهره‌گیری از فرآیندهای مهندسی و تغییرات شیمیایی در ساختار لیگاند/رسپتور ممکن است سبب افزایش سمیت مولکول‌های ریبونوکلئاز به منظور انتخاب مسیرهای سیتوتوکسیک برای کار بر روی سلول‌های بدخیم شود. بنابراین کشف پتانسیل درمانی و بررسی جزییات ارزش‌های درمانی ریبونوکلئازها ضروری می‌باشد.

نتیجه‌گیری: ریبونوکلئازها کاندیدهای دارویی بالقوه با زیست فراهمی کافی هستند و با توجه به اثر سمیت آن‌ها، که بر پایه هیدرولیز انتخابی مولکول‌های RNA داخل سلولی و فرآیندهای خاص شناسایی غشاء سلولی می‌باشد، می‌توان از این آنزیم‌ها به‌عنوان داروهای ضد تومور و یا عوامل درمانی استفاده کرد.

کلیدواژه‌ها: ریبونوکلئاز، سمیت سلولی، آپپتوز، کاندید دارویی، مسیرهای سلولی.

نوع مقاله: مروری.

استناد: وکیلی ازغندی معصومه، نصیری محمدرضا، قوتی شاهرخ، جوادمنش علی (۱۴۰۰) ریبونوکلئازها به عنوان عوامل درمانی بالقوه. *مجله بیوتکنولوژی کشاورزی* ۱۳(۱)، ۲۹-۵۶.

مقدمه

استفاده از ریبونوکلئازها به‌عنوان داروهای ضد سرطان در سال‌های اخیر توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است. RNaseها گروه بزرگی از آنزیم‌های هیدرولیتیک هستند که بواسطه توانایی تخریب RNA در سطح رونویسی، ترجمه و در نتیجه آن جلوگیری از سنتز پروتئین بطور بالقوه سمی می‌باشند (Shlyakhovenko 2016). بنابراین با توجه به تاثیر این آنزیم‌ها در میزان تولید RNA و به دنبال آن تاثیر بر سرعت تبدیل اطلاعات ژنتیکی به پروتئین‌ها می‌توان گفت این آنزیم‌ها نقش کلیدی در تنظیم فرایندهای حیاتی ارگانیسم‌های مختلف از ویروس گرفته تا انسان ایفا می‌کنند (Lee et al. 2019). ریبونوکلئازها بر اساس نحوه تخریب و مکانیسم عمل‌شان در پردازش RNA به دو گروه اگزوریبونوکلئازها و اندوریبونوکلئازها طبقه‌بندی می‌شوند. اگزوریبونوکلئازها مولکول‌های RNA در یک ساختار دو رشته‌ای DNARNA/ را از هر دو انتهای ´۳ و ´۵ برش می‌دهد تا محصولات خاتمه یافته با 3´-hydroxyl و 5´-phosphate را تولید کنند و اندوریبونوکلئازها به طور اختصاصی RNA تک رشته‌ای (ssRNA) را از انتهای ´۳ می‌شکافند (Rittie and Perbal 2008). انواع عمده اندوریبونوکلئاز عبارتند از: RNase II، RNase III، RNase P، RNase H و اولیگوریبونوکلئاز جهت تخریب RNA و در مورد اگزوریبونوکلئاز انواع عمده آن عبارتند از: RNase PH، RNase D، RNase R و RNase T که نقش مهمی در بلوغ و پردازش ′۳ به ′۵ بسیاری از RNAهای پایدار دارد (Rittie and Perbal 2008).

RNaseها در همه اندام‌های ترشحی و مایعات بدن از جمله: مایع منی، شیر، اشک، عرق، موکوس و بزاق حضور دارند. آنزیم‌های RNase در بالغ شدن کلیه مولکول‌های RNA، از جمله RNAهای پیام‌رسان که دارای مواد ژنتیکی برای ساخت پروتئین‌ها هستند و RNAهای غیرکد کننده که در فرآیندهای سلولی مختلفی عمل می‌کنند، نقش اصلی را ایفا می‌کنند (Jazurek et al. 2016). علاوه بر موارد ذکر شده، سیستم‌های تخریب فعال RNA اولین دفاع در برابر ویروس‌های RNA به شمار می‌آیند و امکانات اساسی را برای استراتژی‌های ایمنی سلولی پیشرفته‌تر، مانند RNAi فراهم می‌کنند. شایان ذکر است که کلیه RNAهای داخل سلولی توسط تعدادی از استراتژی‌های مختلف از جمله پلی آدنیلاسیون انتهای ′۳، کلاهک انتهای ′۵ و پیچ‌خوردگی RNA به کمک گروهی از پروتئین‌ها (ذرات ریبونوکلئوپروتئین یا RNP) از فعالیت ریبونوکلئازها محافظت می‌شوند. مکانیسم دیگر محافظت از RNAها در برابر ریبونوکلئازها حضور مهارکننده‌های ریبونوکلئاز[۱] (RI) است (Ricco et al. 2013). این ممانعت کننده‌ها بخش نسبتاً زیادی از پروتئین سلولی را در برخی از انواع سلول تشکیل می‌دهند و به ریبونوکلئازهای خاص با بالاترین اختصاصیت متصل می‌شوند (Lomax et al. 2014). ریبونوکلئازهای تولید شده از سلول‌های میکروبی، انسانی و گیاهان تحت عنوان آنزیم‌های خارج سلولی یا داخل سلولی بهترین نوع شناخته شده این آنزیم‌ها به لحاظ توانایی تجزیه RNA و هم‌چنین فعالیت‌های بیولوژیکی می‌باشند. ریبونوکلئازهای طبیعی توانایی بالقوه‌ای در مهار تومورهای حیوانی و ویروس‌ها دارند و سلول‌های بدخیم را برای فعالیت

[۱] Ribonuclease inhibitor

سیتوتوکسیک از طریق پاسخ آپوپتوتیک هدف قرار می‌دهند، از این‌رو به عنوان گزینه‌های پیشنهادی در داروهای شیمی درمانی در نظر گرفته می‌شوند (Jordaan et al. 2018). در مطالعات مختلف صورت گرفته توسط محققین اثر سمیت ریبونوکلئازها در سیتوزول سلول‌های سرطانی گزارش شده است (Akbari et al. 2017; Liu and Gou 2018; Gotte and Menegazzi 2019; Boix et al. 2020). هدف از بررسی حاضر جمع‌بندی و مرور ساختار، عملکرد و هم‌چنین مکانیسم‌های فعالیت ضد توموری و پتانسیل درمانی برخی RNaseهای طبیعی با فعالیت سیتوتوکسیک ذاتی در سلول‌های سرطانی و کاربردهای درمانی آن‌ها در زمینه پزشکی و صنایع می‌باشد. لازم به ذکر است گروه تحقیقاتی ما چندین پروژه در زمینه مهندسی ریبونوکلئازها و طراحی و تولید ایمنوتوکسین با استفاده از آن‌ها (ایمنوریبنوکلئازها) انجام داده‌اند که به برخی از آها در این مقاله اشاره شده است و برخی از آن‌ها از قبیل مهندسی آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گوسفندی و مهندسی آنزیم ریبونوکلئاز سمینال گاوی در دست انجام می‌باشند.

انواع مختلف مولکول‌های RNase به عنوان عوامل ضد سرطان

مطابق با آمار منتشر شده توسط سازمان جهانی بهداشت، سرطان پس از بیماری‌های قلبی و عروقی دومین عامل مرگ و میر در سطح جهان محسوب می‌شود که تلاش‌های بسیار گسترده‌ایی در مقابله با آن در حال انجام است (Mohammadabadi and Mozafari 2019) . با این وجود علی‌رغم پیشرفت‌های قابل توجه در درمان انواع سرطان، در بسیاری از موارد سیستم ایمنی بیمار در مقابل داروهای موجود مقاومت نشان داده و در نتیجه موجب عدم دریافت پاسخ مناسب به درمان می‌گردد و حتی گاهی با بروز مقاومت، سلول‌های سرطانی از درمان‌های بکار رفته برای رشد سریع‌تر تومور بهره می‌برند. علاوه بر این، اکثر ترکیبات درمانی موجود که در حال حاضر برای از بین بردن سلولهای سرطانی بدخیم طراحی شده اند به دلیل سمیت و عدم توانایی در هدف قرار دادن فقط سلول یا بافت سرطانی، عوارض جانبی شدیدی دارند (Mohammadabadi and Mozafari 2019). بنابراین، در دهه‌های اخیر محققین تلاش کرده‌اند برای مبارزه موفقیت آمیز با سرطان راهکارهای هوشمندانه‌ایی انتخاب کنند. از جمله بهترین راه کارها برای دفاع هوشمندانه استفاده از داروهای نوترکیب هوشمند و هدف‌گیری مستقیم و اختصاصی سلول‌های سرطانی می‌باشد. در واقع در این روش با جلوگیری از رسیدن دارو به سلول‌های سالم اثر سوء داروهای شیمی درمانی نیز به حداقل رسانده می‌شود و تحت عنوان درمان‌های هدفمند سرطان مطرح می‌شوند. ریبونوکلئازهای مختلفی برای درمان سرطان استفاده می‌شوند. برخی از ریبونوکلئازهای کاندید برای استفاده در شیمی درمانی در جدول ۱ ارائه شده است.

ریبونوکلئاز سمینال گاوی (Bovine seminal ribonuclease (BS-RNase

این آنزیم در سال ۱۹۷۲ توسط وسوکاوا و آیری و دوستال و ماتوسک بطور هم‌زمان کشف شد و تنها ریبونوکلئازی است که ساختار چهارم آن مشخص شده است (Ardlet et al. 2009). BS-RNase دایمری است طبیعی متشکل از دو زیر واحد کاملا

یکسان که به وسیله دو پیوند دی‌سولفیدی و تعدادی اتصالات غیرکووالانسی بهم متصل شده‌اند و شکل قرارگیری این اتصالات به نحوی است که از اتصال مهارکننده ریبونوکلئازی به این آنزیم جلوگیری کرده و در نتیجه باعث بروز اثر سیتوتوکسیک آنزیم می‌شود (Benito et al. 2005). توالی آمینواسیدی زیر واحدهای این آنزیم و بررسی ساختار کریستالوگرافی آن به وضوح نشان داده است که این آنزیم متعلق به خانواده بزرگ RNase A می‌باشد. بطوری‌که همانند RNase A تک زنجیره هر کدام از زیر واحدهای این آنزیم دارای ۱۲۴ امینواسید می‌باشد. Lys41، His12 و His119 جایگاه‌های فعال آنزیم بوده و چهار پل دی‌سولفیدی موجود در آنزیم RNase A در این آنزیم نیز کاملا محافظت شده‌اند. برجسته‌ترین تفاوت در توالی آمینو اسیدهای این دو آنزیم دو سیستئین موجود در موقعیت‌های ۳۱ و ۳۲ زیر واحدهای آنزیم مذکور می‌باشد که با ایجاد پیوند دی‌سولفیدی بین زنجیره‌ایی موجب تشکیل ساختار دایمر آنزیم BS-RNase می‌شوند. ریبونوکلئاز سمینال گاوی در حالت دایمر سیتوتوکسیکی بسیار زیاد و فعالیت آنزیمی بالایی دارد و در صورتی‌که که ساختار آنزیم به حالت مونمریک کاهش یابد سمیت سلولی آنزیم بدون تاثیر بر فعالیت ریبونوکلئازی آن کاهش خواهد یافت (Suri et al. 2007). نتایج تحقیقات در این زمینه ثابت کرده است که اگرچه آنزیم مونمر به لحاظ کاتالیتیکی از آنزیم دایمر فعال‌تر است اما سیتوتوکسیک نیست و این به دلیل مهار شدن ساختار مونمر آنزیم توسط ممانعت کننده ریبونوکلئازی می‌باشد در حالی‌که این مهار کننده قادر به برقراری ارتباط با آنزیم دایمر نیست (Benito et al. 2005).

مهارکننده ریبونوکلئازی پروتئینی با وزن ۵۰ کیلو دالتون می‌باشد که در سیتوزول سلول پستانداران وجود داشته و قادر به تشکیل کمپلکس‌های بسیار قوی با اعضا خانواده RNase A و از بین بردن فعالیت کاتالیتیکی آن‌ها از این طریق می‌باشد (Dickson et al. 2005). همان‌طور که در ادامه توضیح داده شده است RNaseهای میکروبی و سایر آنزیم‌های سیتوتوکسیک این خانواده در برابر این مهارکننده مقاوم هستند. بنابراین این‌طور به نظر می‌رسد که عدم حساسیت به مهارکننده ریبونوکلئازی پیش نیاز سمیت سلولی آنزیم‌های خانواده بزرگ RNase می‌باشد (Lomax et al. 2014). نتایج پژوهش‌های صورت گرفته بر روی RNase موجود در مایع منی گاو نر فعالیت‌های ضد توموری و سرکوب کنندگی سیستم ایمنی این آنزیم را نشان می‌دهد و این به دلیل ساختار و خواص منحصر به فرد و آنزیم مذکور است (Arnold and Ulbrich 2006). خواص سمیت سلولی این آنزیم سبب شده است تا به‌عنوان یک ضدتومور، سرکوب کننده سیستم ایمنی و اسپرماتوژنیک دارای ارزش بالقوه درمانی مطرح شود، بطوری‌که که پژوهشگران در تحقیقات خود این آنزیم را ابزاری امیدوار کننده در درمان سرطان بیان کرده‌اند (Jordaan et al. 2018; Liu and Gou 2018; Biox et al. 2020).

آنکوناز

آنکوناز متعلق به خانواده بزرگ RNase A می‌باشد و از جنین قورباغه‌ای از گونه *Rana pipiens* استخراج می‌شود. این آنزیم سمیت سلولی و فعالیت سیتواستاتیک بسیار بالایی داشته و به لحاظ مشابهت آمینواسیدی، شباهت ۳۰ درصدی با توالی RNase A دارد (Suri et al. 2007; Shlyakhovenko 2016). آنکوناز در بین تمام آنزیم‌های خانواده RNase A دارای

کوچک‌ترین ساختار است و هم‌چنین اولین آنزیم از این خانواده است که در مطالعات بالینی در اروپا و امریکا مورد بررسی قرار گرفته است. آنکوناز با نام تجاری راناپیراناز[۱] اولین محصول درمانی بود که در دهه ۱۹۸۰ توسط شرکت الفاسل مورد بررسی قرار گرفت. راناپیراناز یک پپتید تک رشته‌ای دارای ۱۰۴ آمینواسید با وزن مولکولی حدودا ۱۲ کیلو دالتون می‌باشد. دو آمینو اسید ترئونین و سرین با نسبت ۷۰ به ۳۰ در ساختار پروتئینی آنزیم آنکوناز وجود دارند و هر دو به میزان مساوی باعث شکل‌گیری و بروز فعالیت کاتالیکی آنزیم و سمیت سلولی آن می‌شوند (Saxena et al. 2009; Shlyakhovenko 2016). این دارو از طریق اختلال در فرایندهای داخل سلولی نظیر تخریب ساختار RNA و به دنبال جلوگیری از تکثیر و همانندسازی مولکول DNA، جلوگیری از تقسیم سلولی و نهایتا ممانعت از تولید پروتئین با سرطان مقابله می‌کند. هدف اصلی تولید این دارو استفاده از آن به عنوان مکمل داروهای شیمی درمانی برای افزایش اثر بخشی آن‌ها می‌باشد. آنکوناز آنزیمی فوق‌العاده پایدار در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد می‌باشد که به لحاظ ساختاری نیز بسیار پایدار است و خصوصیت پایداری بالای آن در مقایسه با RNase A به تفاوت ساختار folding این دو پروتئین مرتبط می‌باشد (Ardlet et al. 2009; Shlyakhovenko 2016). کاهش شدید سرعت واکنش باز شدن پیچ و تاب ساختار مولکولی در آنکوناز مسئول ایجاد این تفاوت و افزایش پایداری آنکوناز در مقایسه با RNase A می‌باشد. آنکوناز بصورت شگفت‌آوری در برابر آنزیم‌های تجزیه کننده پروتئین مقاومت دارد بدین ترتیب بطور کامل داخل سلول‌های پستانداران فعال مانده و تاثیرگذار است. این خاصیت به نحوه بسته بندی ساختار سوم آنزیم، وجود اتصالات دی‌سولفیدی در انتهای C ترمینال آنزیم و هم‌چنین وجود شبکه هیدروژنی در انتهای N ترمینال موجود در زنجیره پلی‌پپتید که با خوشه آب‌گریز ارتباط برقرار می‌کند مربوط می‌شود (Shlyakhovenko 2016). پیوندهای دی‌سولفیدی به طور قابل توجهی به پایداری آنزیم کمک می‌کنند و هم‌چنین باعث کارآمدتر بودن آنکوناز نسبت به RNase A در بازیابی ساختار فعال کاتالیتیکی و بیولوژیکی می‌شوند.

سمیت سلولی آنزیم آنکوناز مشابه آنزیم ریبونوکلئاز سمینال گاوی می‌باشد و این به دلیل فعالیت کاتالیکی آنزیم مذکور در از بین بردن پیوندهای فسفو دی استر موجود در مولکول RNA و بخصوص مولکول tRNA محقق می‌شود (Suri et al. 2007). اگر چه این آنزیم از دوزیستان استخراج شده است اما سلول‌های بدن انسان قادرند بخوبی آن‌را تحمل کند و آنزیم می‌تواند در انسان بارها مورد استفاده قرار بگیرد در حالی‌که باعث تحریک سیستم ایمنی ژنتیکی و سیستم ایمنی آنتی‌بادی در بدن نمی‌شود و بدن با آن مقابله نمی‌کند. آنکوناز عملا با مهارکننده ریبونوکلئازی پستانداران تعامل ندارد و در واقع به دلیل ساختار چهارم موجود در آنزیم مذکور و هم‌چنین فقدان آمینواسیدهای درگیر در ایجاد پیوند با مهارکننده ریبونوکلئازی با این پروتئین‌ها باند نشده و توسط آن‌ها بلوکه و مهار نمی‌شود. لذا فرایند طبیعی سرکوب ریبونوکلئازها در سلول نمی‌تواند بر آنکونازها تاثیر گذاشته و اثر آنها را مهار کند و فعالیت کاتالیتیکی و ضد توموری آنکوناز بوسیله الکیله شدن آمینو اسید هیستیدین خاتمه می‌یابد (Suhasini and Sirdeshmukh 2006). عدم بلوکه شدن توسط مهارکننده‌های ریبونوکلئازی دلیل مسمومیت‌زایی این آنزیم حتی در مقادیر جزئی

[۱] Ranpirnase

در بدن می‌باشد در حالی‌که آنزیم RNase A مسمومیت‌زا نیست. آنکوناز در تخریب سوبسترهای طبیعی خود از مکانیسم خاصی پیروی نمی‌کند و tRNA به عنوان اولین هدف برای این آنزیم در سلول‌های سرطانی گزارش شده است. مکانیسم عمل آنکوناز به این صورت می‌باشد که مانند یک پلی‌پپتید به گیرنده سطح سلول متصل شده و یا با کمپلکس‌های انتقال در دیواره سلول باند می‌شود و یا این‌که از طریق فرایند اندوسیتوز وارد سلول سرطانی می‌گردد. پس از ورود به سلول از طریق تخریب و ایجاد شکاف در ساختار tRNA سبب متوقف کردن فرایند رونویسی می‌شود. توقف در فرایند رونویسی موجب ممانعت از تولید پروتئین و در نهایت توقف مهارکننده‌های آپپتوزی[1] (IAP) می‌شود (Suhasini and Sirdeshmukh 2006, 2007). IAP مسئول مهار کاسپازها[2] است، بنابراین با مهار آن فرصت برای فعالیت کاسپازها فراهم شده و این عناصر مقدمات آپپتوز[3] یا همان مرگ سلولی را فراهم می‌کنند (Suri et al. 2007). البته تاثیر آنکوناز فقط از طریق مهار تولید پروتئین نیست بلکه ممکن است مکانیسم‌هایی نظیر آزاد شدن پروکاسپازها توسط میتوکندری نیز در اثرات این آنزیم دخیل باشند. آنکوناز پتانسیل فراوانی برای استفاده در اهداف درمانی دارد و امروزه تحقیقاتی در اروپا و امریکا در دست بررسی است که طی آن نقش آنکونازها بر درمان برخی سرطان‌های خاص نظیر مزوتلیومای بدخیم غیر قابل کنترل بررسی می‌شود. هم‌چنین در تحقیقات بر روی مدل‌های حیوانی نشان داده است که به دلیل سیتوتوکسیسیتی بالا و قابلیت سیتواستاتیک آن امکان استفاده از آنکوناز برای درمان سرطان پوست بصورت جلدی وجود دارد (Arnold and Ulbrich 2006).

ریبونوکلئاز پانکراس گاوی RNase A

آنزیم RNase A در حدود ۶۰ سال پیش از پانکراس گاو خالص‌سازی شد و به دلیل ویژگی‌های ساختاری منحصر به فردی که دارا بود مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفت (Findlay et al. 1961). آنزیم RNase A مولکول پروتئینی کوچک لوبیای شکلی است با وزن مولکولی تقریباً ۱۳/۷ کیلودالتون (KD) که از ۱۲۴ آمینو اسید تشکیل شده است. از ۲۰ آمینو اسید موجود در طبیعت بجز آمینو اسید تریپتوفان، سایر آمینو اسیدهای در ساختمان این پروتئین وجود دارند. این آنزیم ساختمان بسیار ساده‌ایی دارد و هیچ پیوند کربوهیدراتی در آن دیده نمی‌شود. جایگاه فعال این آنزیم در مرکز لوبیا قرار گرفته است و سه آمینو اسید هیستیدین ۱۲، لیزین ۴۱ و هیستیدین ۱۱۹ در این جایگاه، عمل کاتالیز آنزیم را انجام می‌دهند (Cuchillo et al. 2011; Lee et al. 2019). مشاهده سمیت آنزیم RNase A در مطالعات مختلف زمینه را برای استفاده از آن به‌عنوان کاندید دارویی در درمان سرطان فراهم کرده است. این آنزیم به‌عنوان نماینده اصلی خانواده بزرگ RNase A یکی از فعال‌ترین آنزیم‌های موجود در این خانواده می‌باشد اما حضور مقادیر بالایی از ممانعت کننده‌های ریبونوکلئاز سیتوزولی (٪۰/۰۱~) در داخل سلول که به طور طبیعی میل زیادی

[1] Inhibitors of apoptosis
[2] Caspase
[3] Apoptosis

به اتصال به ریبونوکلئازها جهت غیرفعال‌سازی یا کاهش فعالیت کاتالیتیکی آن‌ها دارند و هم‌چنین ایجاد اتصال قوی در محدوده فمتو مولار با این مهارکننده‌ها و مهار شدن توسط آن‌ها باعث عدم سمیت آنزیم RNase A شده است (Gotte et al. 2013). از آنجا که غلظت داخل سلولی مهار کننده ریبونوکلئازی در حدود ۱ تا ۴ میکرومول برآورد شده است انتظار می‌رود هر ریبونوکلئازی با ثابت تفکیک کمتر و یا مساوی یک میکرومول در سلول‌ها غیر فعال یا اصطلاحاً خاموش شود. نتایج بررسی محققین بر روی انواع مهندسی شده آنزیم RNase A که قابلیت فرار از مهارکننده را دارا می‌باشند نشان داده است که این آنزیم‌ها دارای سمیت سلولی می‌باشند، در واقع نتایج آن‌ها از فرضیه سمیت سلولی این آنزیم حمایت می‌کنند (Gotte et al. 2013; Forouharmehr et al. 2020). با این وجود همه مطالعات نقش مهارکننده در عدم سمیت سلولی آنزیم RNase A را تایید نمی‌کنند، به‌عنوان مثال نتایج بروز مرگ سلولی در اثر ورود آنزیم RNase A به‌صورت مصنوعی و یا تزریق آن در مطالعه‌ایی بیانگر محدودیت سمیت سلولی در اثر جذب سلولی بود تا محدودیت مهارشدگی با مهارکننده ریبونوکلئازی (Formoso et al. 2010). به همین ترتیب غیر فعال شدن مهارکننده‌ها توسط siRNAها باعث افزایش میزان سمیت سلولی آنزیم‌های سمی این خانواده شد در حالی‌که آنزیم‌های غیرسمی مانند RNase A و RNase 1 غیر سیتوتوکسیک باقی ماندند.

ریبونوکلئاز T1 (RNase T1)

RNase T1 از انواع اندوریبونوکلئازها می‌باشد که اثر سمیت سلولی خود را از طریق تخریب پیوندهای فسفو دی استر موجود در ناحیه حفاظت شده توالی ژن‌های rRNA که تحت عنوان حلقه غنی از سرین[۱] شناخته می‌شوند بروز داده و منجر به مهار بیوسنتز پروتئین‌ها و القاء مرگ سلولی بوسیله بروز آپپتوز می‌شود (Shlyakhovenko 2016). RNase T1 از منابع قارچی و عمدتاً گونه‌های اسپرژیلوس (*Aspergillus*) و پنسیلیوم (*Penicillium*) استخراج می‌شود و به دلیل سمیت سلولی که دارا می‌باشد تحت عنوان ریبوتوکسین[۲] شناخته می‌شود. این آنزیم اثرات خود را بدون نیاز به یون‌های فلزی نشان داده و به منظور تجزیه ساختار RNA، نقشه‌برداری از آن، حفاظت از اسیدهای ریبونوکلئیک و هم‌چنین حذف RNA از نمونه‌های استخراج DNA استفاده می‌شود. اما اگر به نحوی این آنزیم وارد سلول‌ها شود قادر به تولید پروتئین ریبوتوکسین، که برای سلول‌های سرطانی سیتوتوکسیک می‌باشند، خواهد بود (Wu et al. 2020). در صورتی‌که هیچ گیرنده پروتئینی ویژه‌ایی در غشا سلول وجود نداشته باشد ریبوتوکسین‌ها با تغییر نفوذپذیری غشاء سلول، مانند فرایند آلوده شدن سلول‌ها به ویروس یا فرایند انتقال سلول‌ها، سلول‌های سرطانی را از بین می‌برند. از آن‌جایی که ساختار RNase T1 مرتبط با ساختار Onconase و α-Sarcin می‌باشد و هر دوی این آنزیم‌ها برای سلول‌های توموری سمی هستند می‌توان به سمیت آنزیم مذکور پی برد (Shlyakhovenko 2016). بنابراین با وجود اینکه RNase T1

[۱] The sarcin–ricin loop (SRL)

[۲] Ribotoxin

قادر به وارد شدن به سلول‌های تومور نبوده و نمی‌تواند اثر سمیت سلولی ایجاد کند، می‌توان با مهندسی و دست‌کاری آنزیم از آن به عنوان داروی ضد تومور استفاده کرد. در مطالعه‌ایی که به منظور بررسی اثر سمیت سلولی آنزیم RNase T1 بر روی سلول‌های سرطانی صورت پذیرفت محققان دریافتند که اگر آنزیم در محتوی ویروس هماگلوتیناسیون ژاپنی گنجانده شود، حامل تهیه شده می‌تواند سلول‌های تومور را هدف قرار داده و به عنوان یک داروی ضد سرطان منحصر به فرد عمل کند (Yuki et al. 2004). هم‌چنین نتایج آن‌ها نشان داد که فعالیت سیتوتوکسیستی RNase T1 پس از تیمار محتوی ویروس مذکور با سولفات پروتامین به طرز چشم‌گیری بهبود یافته است. بعلاوه این پژوهشگران دریافتند که آنزیم RNase T1 توسط مهارکننده ریبونوکلئازی غیرفعال نمی‌شود و مکانیسم عمل آن پس از ورود به سلول سرطانی همانند آنکوناز و یا ریبونوکلئاز سمینال گاوی بوده و باعث القاء مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی می‌شود.

آلفا سرین (α-Sarcin)

میکروارگانیسم‌ها در محیط‌های مختلفی وجود دارند و بیشترین میزان تنوع را در زمین دارا می‌باشند. این موجودات به منظور بهبود فرایند رشد خود، جلوگیری از رشد سایر موجودات در اطراف محل زندگی‌شان، کاهش استفاده از مواد مغذی توسط این موجودات و بطور کلی اختصاصی کردن محیط زندگی برای خودشان، ریبونوکلئازهای خارج سلولی با نام ریبوتوکسین را ایجاد می‌کنند. برخی قارچ‌ها مانند اسپرژیلوس نایجر گونه‌ایی از این ریبوتوکسین‌ها را تولید می‌کند که تحت عنوان آلفا سرین شناخته می‌شود. دلیل این نام‌گذاری اختصاصیت این ریبوتوکسین‌ها در اتصال به دومین حفاظت شده‌ایی از مولکول RNA در بخش غنی از سرین ریبوزوم می‌باشد (Olmo et al. 2001). آلفا سرین توکسینی پلی‌پپتیدی با طول ۱۵۰ آمینو اسید است که متعلق به نوع ۱ گروه پروتئین‌های غیر فعال کننده ریبوزوم می‌باشد و در سال ۱۹۶۰ با تمام جزییات مورد مطالعه و بررسی قرار گرفت. ریبوتوکسین آلفا سرین به منظور بروز اثر سمیت در سیتوزول سلول هدف بطور مستقیم وارد و درون سلول بر روی RNA ریبوزومی (rRNA) وابسته به ریبوزوم عمل می‌کند. نحوه عمل این ریبوتوکسین سبب می‌شود تا ریبونوکلئازهای خارج سلولی به‌عنوان پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم در نظر گرفته شوند. ریبوتوکسین‌ها و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم هر دو بطور اختصاصی نواحی غنی از سرین را هدف قرار می‌دهند. اتصال این پروتئین‌ها به نواحی غنی از سرین سبب تغییر یک نوکلئوتید و یا تخریب پیوندهای دی‌سولفیدی می‌شود و در نتیجه آن عملکرد مولکول RNA تغییر یافته و یا متوقف می‌شود. چنین عملکردی امکان استفاده از آلفا سرین و پروتئین‌های غیرفعال کننده ریبوزوم را به‌عنوان مولکول‌های ضد تومور و ضد سرطان فراهم می‌کند (Suri et al. 2007).

ACTIBIND و ریبونوکلئاز T2

ACTIBIND گلیکو پروتئینی خارج سلولی حاوی پلی پپتیدهای ۳۲ و ۳۵ کیلو دالتونی است که توسط اسپرژیلوس نایجر تولید می‌شود و متعلق به خانواده RNase T2 می‌باشد. این گلیکوپروتئین توانایی اتصال به پروتئین اکتین موجود در هر جایی را

دارا می‌باشد و اساسا در ساختار شبکه داخل سلولی اکتین تداخل ایجاد می‌کند (Roiz et al. 2006). پروتئین اکتین مسئول شکل‌گیری رگ‌ها و مهاجرت آن‌ها یا همان رگ‌زایی در سلول‌های طبیعی و هم‌چنین سلول‌های بدخیم می‌باشد. مطالعات پیشین پژوهشگران بر روی این پروتئین نشان داده است که ACTIBIND مانند یک رسپتور سطح سلولی به پروتئین اکتین متصل شده و مانند یک مهار کننده عمل می‌کند و از تکثیر سلولی، مهاجرت سلول‌ها، متاستاز و هم‌چنین گردش سلول‌های بدخیم در خون جلوگیری می‌کند (Schwartz et al. 2007). هم‌چنین نتایج مطالعات صورت گرفته بر روی توسعه تومور زنوگرافت در موش و رت و رشد ملانوما در انسان نشان‌دهنده اثر مهارکنندگی پروتئین مذکور بر روی آن‌ها بوده است (Xu et al. 2011).

RNase T2 نیز مانند ACTIBIND عمل می‌کند و به پروتئین اکتین در سلول‌های بدخیم انسان و حیوانات متصل شده و در فرایندهای انژیوژنز و متاستاز آن‌ها اختلال ایجاد می‌کند (Wu et al. 2020). سمیت سلولی ACTIBIND زمانی‌که بطور مستقیم به سیتوزول سلول منتقل شده و یا تزریق می‌شود افزایش می‌یابد. در واقع این مشاهده نشان می‌دهد که جذب ACTIBIND در سلول‌های بدخیم و سرطانی یک عامل محدود کننده سرعت می‌باشد و اگر داخل شدن و یا غلظت سلولی ACTIBIND در سلول‌های بدخیم به نحوی افزایش یابد اثر ضد توموری و ضد سرطانی آن نیز افزایش خواهد یافت (Baranzini et al. 2020). بطور کل مطابق پژوهش‌های صورت گرفته در مطالعات مختلف این‌گونه بیان شده است که ACTIBIND و RNase T2 انسانی را می‌توان به‌عنوان خط مقدم درمانی در مبارزه با سرطان در نظر گرفت.

بیناز (Binase)

بیناز (Binase) ریبونوکلئازی باکتریایی با وزن مولکولی ۱۲/۲ کیلو دالتون است که در سال ۱۹۷۹ توسط Aphanasenko و همکاران توالی‌یابی شد. این ریبونوکلئاز باکتریایی از انواع ریبونوکلئازهای کاتیونی است که دارای فعالیت ضد سرطانی بوده و از گونه *Bacillus intermedius* استخراج می‌شود. این آنزیم RNA را از محل باقی‌مانده پورین می‌شکافد و برای این عمل هیدرولیز به هیچ کوفاکتوری نیاز ندارد (Burnysheva et al. 2016). بیناز اولین ریبونوکلئاز باکتریایی با فعالیت ضد سرطانی بود که پتانسیل سمیت سلولی قابل توجهی در برابر سلول‌های بدخیم نشان داد و قادر به ایجاد آپپتوز انتخابی در سلول‌های سرطانی است. مطالعات انجام شده بر روی این ریبونوکلئاز باکتریایی نشان داده‌اند که این آنزیم فعالیت آپپوپتیک و ضد تکثیر سلولی قابل توجهی در سلول‌های A549 و K562 و هم‌چنین سلول‌های سرطان تخمدان نشان داده است. هم‌چنین آنزیم مذکور اثرات ضد ویروسی را در برابر ویروس‌های خرگوشی، گیاهی و گونه‌های ویروس آنفولانزا نشان داده است، بطوری‌که در مطالعه‌ایی که به منظور بررسی اثر ضد ویروسی این آنزیم انجام شد نتایج نشان داد که بیناز فعالیت ضد ویروسی چشم‌گیری علیه ویروس آنفولانزای همه گیر (H_1N_1) داشته است (Makarov et al. 2008).

Agricultural Biotechnology Journal; Print ISSN: 2228-6705, Electronic ISSN: 2228-6500

جدول ۱. انواع ریبونوکلئازهای سمی و مکانیسم عمل آن‌ها

Table 1. Cytotoxic RNases and their mode of action

نوع ریبونوکلئاز RNase type	منشاء Source	مکانیسم عمل Mode of action	کاربرد Application	منبع Reference
ریبونوکلئاز سمینال گاوی BS-RNase	مایع منی گاو Bovine seminal fluid	در شرایط آزمایشگاهی به غشای سلول متصل شده و با از بین بردن غشای دو لایه به سیتوزول وارد و باعث تخریب RNA طبیعی در سلول می‌شود In vitro, bind to cell membrane and disturb bilayer membrane and rnter to cytosol for degrade the natural RNA in cell	سرطان تیروئید Thyroid cancer	Shlyakhovenko 2016 Makarov et al. 2008
آنکوناز Onconase	تخمک و جنین اولیه قورباغه Rana pipiens	تخریب tRNA و مهار سنتز پروتئین‌ها که منجر به فعال شدن کاسپازها و القا آپوپتوز می‌شود Degradation of tRNA and inhibit the protein synthesis which leads to activation of caspases and induced apoptosis	سرطان ریه انسان، ادینوکارسینومای لوزالمعده و سرطان مزوتلیوما Human lung cancer, pancreatic adencarcinoma and mesothelioma cancer	Shlyakhovenko 2016 Burnysheva et al. 2016
ریبونوکلئاز T1 RNase T1	*Aspergillus oryzae*	مهار سنتز پروتئین و القا آپوپتوز Inhibition of protein synthesis and induced apoptosis	تحت آزمایشات بالینی Under clinical trial	Shlyakhovenko 2016 Kanwar et al. 2016
آلفاسرین α-Sacrin	*Aspergillus giganeus*	تخریب پیوند فسفودی استر در rRNAها و مهار سنتز پروتئین Cleavage of phosphodiester bond of rRNA, block the protein synthesis	تحت آزمایشات بالینی Under clinical trial	Shlyakhovenko 2016 Olombrada et al. 2017
ریبونوکلئاز P RNase P	کشت سلولی انسانی Human cell culture	حذف توالی راهنما در انتهای ´۵ مولکول tRNA، مهار سنتز پروتئین و القا آپوپتوز Removal of 5'- leader sequence of tRNA, blockage of protein synthesis and apoptosis	تحت آزمایشات بالینی Under clinical trial	Shlyakhovenko 2016 Kanwar et al. 2016
ریبونوکلئاز T2 RNAse T2	کشت سلولی انسانی Human cell culture	توقف خون‌رسانی به سلول‌های تومور به وسیله توقف رگ‌زایی Blocking blood supply to tumours cell by stopping angiogenesis	تحت آزمایشات بالینی Under clinical trial	Shlyakhovenko 2016 Schwartz et al. 2007
ACTIBIND	*Aspergillus niger*	توقف خون‌رسانی به سلول‌های تومور به وسیله توقف رگ‌زایی Blocking blood supply to tumours cell by stopping angiogenesis	تحت آزمایشات بالینی Under clinical trial	Shlyakhovenko 2016 Schwartz et al. 2007

ادامه جدول ۱. انواع ریبونوکلئازهای سمی و مکانیسم عمل آن‌ها

Table 1 continued. Cytotoxic RNases and their mode of action

نوع ریبونوکلئاز RNase type	منشاء Source	مکانیسم عمل Mode of action	کاربرد Application	منبع Reference
بیناز Binase	*Bacillus intermedius*	تخریب RNA در آمینو اسیدهای پورین بدون نیاز به کوفاکتور Cleaves the RNA at purine residues, does not require any cofactor	فعالیت ضدتوموری در سلول-های سرطان تخمدان، K562 و A549. اثرات ضد ویروسی بر علیه ویروس‌های گیاهی، ویروس‌های خرگوشی و گونه-های ویروس آنفلوانزا Antitumor activities against K562, A549 and ovary cancer cells. Antiviral effect against plant virus, rabies virus and influenza virus strains	Makarov et al. 2008

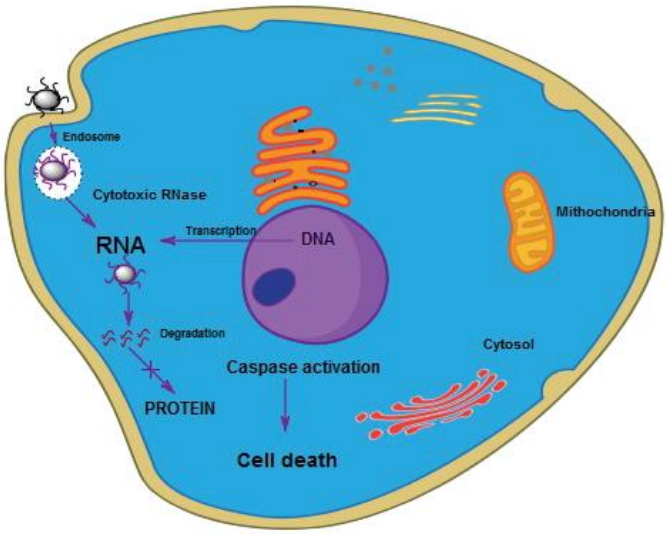
مکانیسم سمیت سلولی آنزیم‌های RNase در سلول‌های سرطانی

ورود و هدف قرار دادن سلول سرطانی

مطالعات فراوانی به فعالیت کاتالیکی و سمیت سلولی ناشی از ریبونوکلئازهای خارج سلولی اشاره نموده‌اند اما این آنزیم‌ها با منشاء خارجی در ابتدا باید به درون سیتوپلاسم سلول هدایت شده، مستقر گردیده و سپس RNAهای داخل سلولی را هدف قرار داده و متلاشی نمایند (Haigis et al. 2002). در نتیجه این واکنش، سنتز پروتئین در داخل سلول متوقف و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به سلول القاء می‌گردد. RNaseهای خارج سلولی برای ورود به سلول با پروتئین‌ها و لیپیدهای غشایی سطح سلول، کانال‌های یونی و هم‌چنین گیرنده‌های اختصاصی سطح سلول ارتباط برقرار می‌کنند و یا از طریق اتصال غیر اختصاصی الکترواستاتیک موجود بر روی سطح سلول وارد خواهند شد (Shlyakhovenko 2016). آنکوناز و ریبونوکلئاز سمینال گاوی برای ورود به سلول با جایگاه‌های رسپتور مانند موجود در غشاء پلاسما در ارتباط هستند. این جایگاه‌ها گیرنده‌های غیرپروتئینی بوده و برای سایر آنزیم‌های ریبونوکلئاز اختصاصی نمی‌باشند. در برخی مطالعات نشان داده شده است که BS-RNase با واسطه جذب از طریق اندوسیتوز وابسته به مقدار آنزیم به سلول‌های بدخیم و غیر بدخیم وارد می‌شود، اما این آنزیم‌ها در سلول‌های بدخیم میزان سمیت بیشتری دارند (شکل ۱). تعامل بین این آنزیم و غشای سلولی از طریق واکنش‌های مبادله‌ایی سولفیدریل–دی سولفید که بین سولفیدریل سطح سلول و دی سولفیدهای بین واحدی که دو زیر واحد را به‌هم پیوند می‌دهند اتفاق می‌افتد و تسریع می‌شود (Bracale et al. 2003).

مکانیسم اندوسیتوز در مورد آنزیم‌های ریبونوکلئاز هنوز به خوبی درک نشده است اما به نظر می‌رسد ریبونوکلئازها از طریق مکانیسم‌های وابسته به گیرنده‌های غیرپروتئینی، اندوسیتوز و یا انتقال مستقیم از غشای سلول عبور می‌کنند. نتایج پژوهشی بر روی

آنزیم‌های RNase A و HP-RNase نشان داده است که فرایند جذب سلولی و ورود به سلول برای این دو آنزیم در سلول‌های A431 و K256 از طریق اندوسیتوز فاز مایع انجام شده است و پس از اتصال آنزیم به گیرنده سطح سلول، بوسیله فرایند اندوسیتوز وارد سلول می‌شود (Bosch et al. 2004). پروتئین‌های بتا–امیلوئید (β-Amyloid)، پریون‌ها، کلسی‌تونین و مولکول‌های با بار مثبت غیر مستقیم قادر هستند تا ریبونوکلئازها را از طریق انتقال مستقیم به سیتوپلاسم منتقل کنند و یا از طریق آسیب به غشای سلولی و تشکیل کانال‌های یونی در عملکرد واسطه‌گری سلول اختلال ایجاد کرده و باعث انتقال ریبونوکلئازها شوند. به نظر می‌رسد مکانیسم ورود به سلول برای آلفا سرین، آنکوناز و نوع مهندسی شده و سمی RNase A (G88R) به شکل مستقل از پروتئین کلاترین است. علاوه بر این برای آنکوناز و آنزیم مهندسی شده RNase A این مسیر مستقل از پروتئین دینامین نیز می‌باشد (Olmo et al. 2001; Haigis and Raines 2003).



شکل ۱. شمایل کلی برهم‌کنش ریبونوکلئاز سمی با اجزاء سلولی سلول میزبان. ریبونوکلئاز از طریق رفت لیپیدی و یا گیرنده‌های سطح سلولی به غشای سلول متصل شده و به واسطه اندوسیتوز به سیتوزول سلول وارد می‌شود (Kanwar and Kumar 2017)

Figure 1: An overal scheme of interactions of cytotoxic RNase with host cellular components. RNase binds on to the cell membrane by lipid rafts or receptor and enters into the cytosol by endocytosis (Kanwar and Kumar 2017)

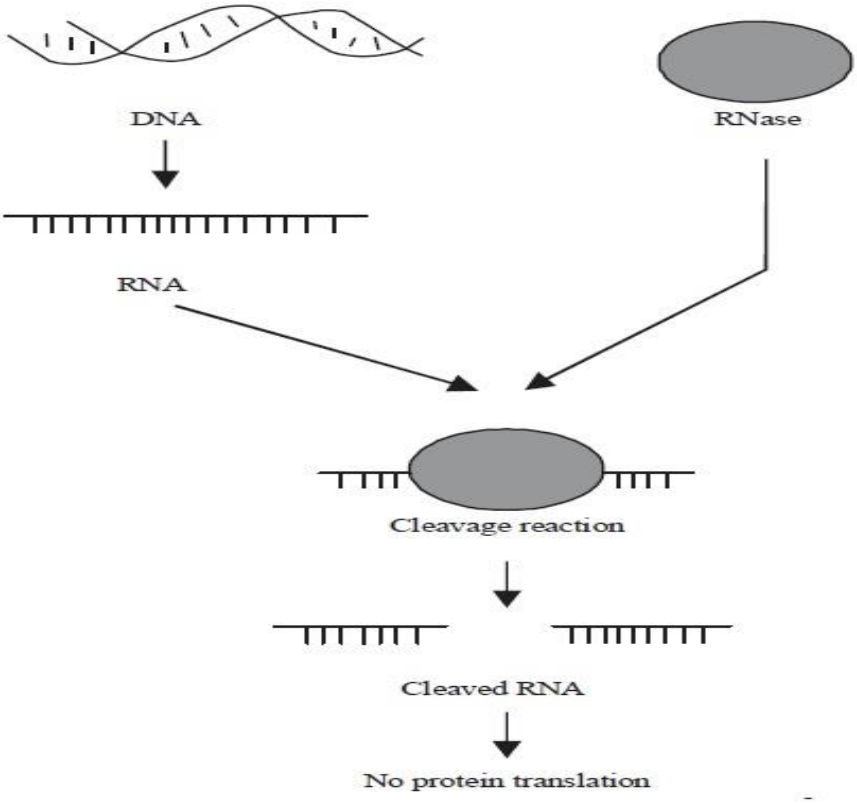
ایجاد سمیت سلولی و مکانیسم فعالیت ضد سرطانی

ریبونوکلئازها به‌عنوان آنزیم‌های هیدرولیز کننده RNA شناخته می‌شوند که علاوه بر انجام وظایف اصلی خود در سلول اثرات بیولوژیکی بی‌شماری به واسطه تخریب RNA سلولی اعمال می‌کنند. پروتئین مهارکننده ریبونوکلئاز در سیتوزول سلول‌ها

وجود داشته و به نظر می‌رسد مانند محافظی در برابر اثرات ریبونوکلئازهای خارج سلولی و ایجاد سمیت توسط آن‌ها عمل می‌کند (Benito et al. 2005). ریبونوکلئازها آمینو اسیدهایی دارند که نسبت به اتصال با مهارکننده ریبونوکلئازی موجود در سیتوزول که فعالیت کاتالیکی آن‌ها را مهار می‌کند حساس هستند. آنکوناز از جمله ریبونوکلئازهایی می‌باشد که براحتی از مهارکننده آنزیمی داخل سلول فرار می‌کند و افزایش و کاهش میزان این مهارکننده‌ها بر میزان سمیت این آنزیم اثرگذار نمی‌باشند. هم‌چنین مولکول‌های مهارکننده در برابر آنزیم سمینال گاوی بی‌اثر گزارش شده‌اند، ساختار دایمری این آنزیم نقش مهمی در این عدم اتصال و عدم مهارشدگی توسط مهارکننده‌ها ایفا می‌کند (Kobe and Deisenhofer 1996).

سمیت سلولی ریبونوکلئازها به واسطه تخریب مولکول RNA، که منجر به مهار سنتز پروتئین و اخلال در فرایندهای تنظیمی چرخه‌های سلولی و در نهایت القاء آپپتوز در سلول‌های تحت تاثیر می‌شود، می‌باشد (شکل ۲). Ardlet et al. (2017) پیشنهاد کردند تخریب RNA می‌تواند باعث تحریک مسیر آپپتوز در سلول‌های بدخیم شود. آن‌ها هم‌چنین مشاهده کردند که علاوه بر تخریب t-RNA، میکرو RNAها و RNAهای کوچک تولید شده در اثر تخریب RNA نیز می‌توانند در تنظیمات خاص سلول نقش داشته باشند. فرایندهای وابسته به کاسپاز، ترکیبات با وزن مولکولی کم، تغییر در پروتئین و مسیر سیگنال فاکتور هسته‌ای تقویت‌کننده زنجیره سبک کاپا از لنفوسیت‌های B فعال‌شده (NF-κB[1]) مکانیسم‌های مرگ سلولی هستند که در پاسخ به سمیت سلولی ریبونوکلئازها درگیر می‌باشند (Eller et al. 2015). نتایج مطالعات پیشین نشان داده است که آنکوناز باعث کاهش فاکتور ترجمه NF-κB در سلول‌های مزوتلیومای پلور و مهار مسیرهای متعارف وابسته به NF-κB می‌شود و آنزیم بیناز مرگ سلولی را از طریق کاهش پتانسیل میتوکندریایی و آپوپتوز وابسته به لیگاند در سلول‌های Kasumi-1 و B-16 ایجاد کرده است (Ardlet et al. 2007; Danishefsky et al. 2014). کاهش پتانسیل میتوکندریایی بوسیله بیناز از طریق تشکیل منافذ میتوکندریایی فعال کننده کاسپاز ۸ به منظور افزایش سطح Ca_2^+ و کاهش گونه‌های فعال (واکنش پذیر) اکسیژن (ROS)[2] اتفاق می‌افتد. ریبونوکلئاز پانکراس گاوی (RNase A) و ریبونوکلئاز انسانی شماره یک (RNase 1) اثر سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی را به واسطه رفت لیپیدی اسیدی، هپران سولفات و سایر گلیان‌های موجود در سطح سلول ایجاد می‌کنند (Danishefsky et al. 2014; Eller et al. 2015). اما تفاوت مکانیسم سمیت سلولی انواع ریبونوکلئازها در سلول‌های بدخیم و غیر بدخیم هنوز مشخص نیست با این وجود مطابق نتایج بدست آمده در مطالعات پیشین مشخص شده است که الگوی غیر معمول آنتی‌ژن‌های کربوهیدراتی همراه تومور[3] (TACAs) در سطح سلول‌های سرطانی به تمایز سلول‌های سرطانی از سلول‌های نرمال کمک می‌کند (جدول ۲). این آنتی‌ژن به شکل گلیکولیپیدهای متصل به غشاء یا گلیکوپروتئین‌ها بیان می‌شوند.

[1] Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
[2] Reactive oxygen species
[3] Tumor-associated carbohydrate antigen



شکل ۲. عملکرد ریبونوکلئازها بر مولکول RNA در سلول هدف (Shruti et al. 2016)

Figure 2. Action of RNase on the RNA in the target cell (Shruti et al. 2016)

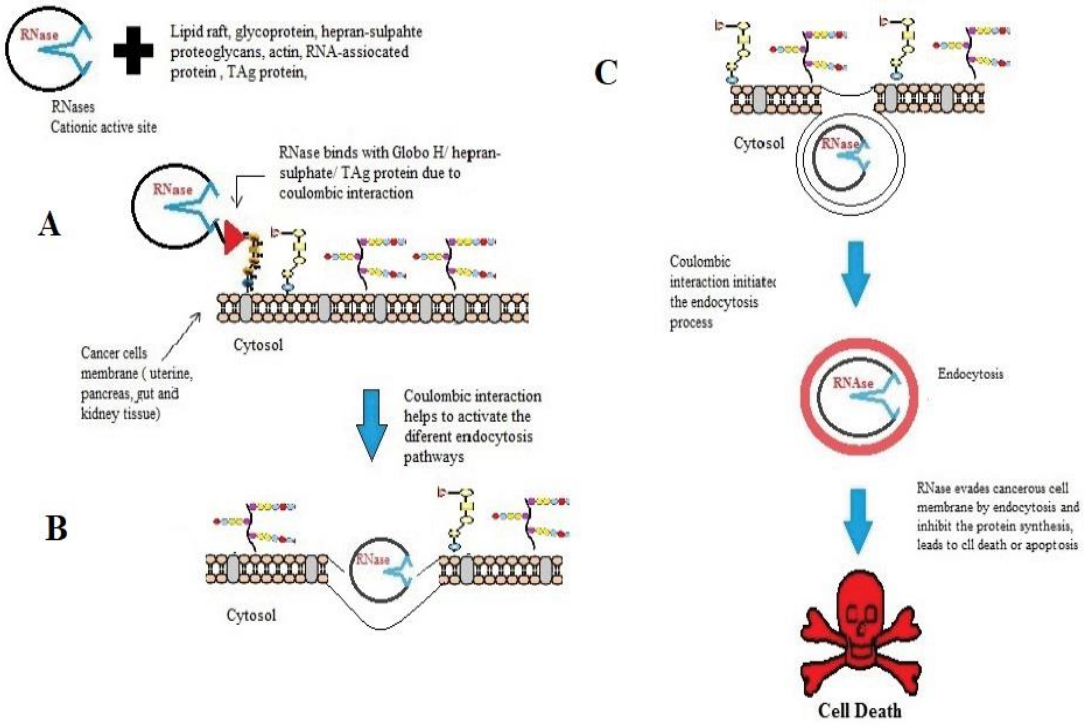
Globo H یک گلیکواسفنگولیپید و هگزاساکارید خنثی همراه تومور می‌باشد که به‌عنوان گیرنده لیگاند برای ریبونوکلئازهای 1 و A عمل می‌کند و به‌طور درون‌زا در غشای خارجی سلول‌های اپیتلیال پستان، رحم، روده، بافت کلیه و لوزالمعده قرار دارد (شکل ۳). پیدایش سرطان[1] اجزای سطح سلول را تغییر می‌دهد و این تغییرات باعث قرارگیری متفاوت سطح سلول در معرض Globo H و گلیکوزامینوگلیکان‌های سولفاته شده و در نتیجه افزایش سمیت‌پذیری سلول می‌شود (Pochechueva et al. 2017). Globo H، اسید سیالیک و سولفات هپارین به دلیل افزایش ماهیت آنیونی سطح سلول سرطانی نقش حیاتی در جذب سلولی ریبونوکلئازها دارند. آنتی‌ژن ویروس t (TAg)[2] که به عنوان انکوپروتئین نیز شناخته می‌شود در سطح سلول‌های پنومونی MLE12 قرار دارد. این آنتی‌ژن از طریق باند دی‌سولفیدی بین فسفات ′۵ و گروه بتا هیدروکسی آمینواسید سرین با RNA پیوند کووالانسی برقرار می‌کند و کمپلکس حاصل به عنوان یک گیرنده برای ریبونوکلئازها عمل می‌کند (Mitkevich et al. 2014). ریبونوکلئاز متصل شده به کمپلکس RNA موجود در کمپلکس که به انکوپروتئین آنتی‌ژن ویروس T (TAg onco-protein) متصل شده است را

[1] Tumorigenesis
[2] Virus T antigen

تخریب کرده و آن را به فسفات ریبونوکلئوزید تبدیل می‌کند. هیالورونیک اسید–ریبونوکلئاز A نانو کمپلکسی است با مولکول‌های کاتیونی چربی که از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند (Wang et al. 2017). ریبونوکلئاز A در این کمپلکس از طریق اثر متقابل فوق مولکولی با حامل‌های لیپیدی که اثر کپسول‌سازی پروتئین را تسریع می‌کنند و هم‌چنین باعث تسهیل مورد هدف قرارگیری سلول‌های سرطانی از طریق ارتباط با سلول‌های بیش بیان کننده CD44 می‌شوند باند می‌شود (Ghosh et al. 2014). کمپلکس هیالورونیک اسید–ریبونوکلئاز A می‌تواند بطور اختصاصی از طریق تعامل کلومبیک به گیرنده CD44 متصل شود و مسیرهای اندوسیتوز را برای جذب سلولی ریبونوکلئازها آغاز کند، این نانوکمپلکس هم‌چنین برای انتقال دارو به سلول‌های سرطانی استفاده می‌شود (Wang et al. 2019). مهار تکثیر سلول‌های سرطانی توسط نانوکمپلکس هیالورونیک اسید–ریبونوکلئاز منتقل شده به سلول‌های A549 بیش بیان کننده CD44 نشان داده است که این نانو کمپلکس می‌تواند به عنوان یک روش موثر در درمان هدفمند سرطان باشد (Lee et al. 2020). اثرات ضدسرطانی ریبونوکلئازها بطور گسترده‌ایی در ریبونوکلئازهای حیوانی یعنی ریبونوکلئاز پانکراس گاوی، سمینال گاوی، آنکونواز و انژویوژنین مطالعه شده‌اند و در بین آن‌ها ریبونوکلئاز سمینال گاوی، آنکونواز و ریبونوکلئاز پانکراس گاوی بیشترین پتانسیل ضدسرطانی را نشان دادند و به‌عنوان ریبونوکلئازهای ضد تومور شناسایی شده‌اند.

مهندسی ریبونوکلئازها و هدف درمانی

از آنجایی که همه سلول‌ها مکانیسم‌هایی برای فرار و یا مقاومت در برابر ریبونوکلئازهای خارج سلولی دارند، برخی از ریبونوکلئازها فاقد فعالیت ضد سرطانی ذاتی می‌باشند و سمیت سلولی ممکن است از طریق ایجاد جهش در جایگاه‌های خاص در آن‌ها بوجود آید. در واقع پس از اینترنالیزه شدن ریبونوکلئازها به سلول باید از مهارکننده ریبونوکلئازی موجود در سیتوزول و تخریب لایزوزومی فرار کنند و به داخل سیتوزول رهاسازی شوند تا برای القاء اثر سیتوتوکسیسیتی در تماس با سوبسترای خود قرار بگیرند. اما در داخل سلول مقادیر بالایی از ممانعت کننده‌های ریبونوکلئاز سیتوزولی (۰/۰۱) وجود دارد که به طور طبیعی میل زیادی به اتصال با ریبونوکلئازها و غیرفعال‌سازی یا کاهش فعالیت کاتالیتیکی آن‌ها دارند (Zhang and Chen 2018). از این‌رو با استفاده از تکنیک مهندسی پروتئین می‌توان تا حد زیادی بر این مشکل غلبه کرد و گونه‌هایی با قابلیت فرار از مهار کننده یا دارای میل اتصال کمتر به مهارکننده همراه با فعالیت کاتالیتیکی و پایداری آنزیمی بهتر طراحی و تولید نمود (Forouharmehr et al. 2020). در یک پژوهش محققان موفق به مهندسی ریبونوکلئاز پانکراس گاوی و هومولوگ‌های پستانداران این آنزیم شدند که حساسیت کمتری نسبت به ایجاد اتصال با مهار کننده ریبونوکلئازی داشته و در نتیجه باعث بروز سمیت سلولی در سلول‌های سرطانی شد (Forouharmehr et al. 2020).



شکل ۳. شمای کلی تعامل بین ریبونوکلئازها و رسپتورهای موجود در سطح سلول‌های بدخیم. A: مولکول ریبونوکلئاز از طریق واکنش‌های کلومبیک به اجزای سلول سرطانی متصل می‌شود (گلیکان یا پروتوگلیکان سولفات هپران، رفت لیپیدی و غیره که به عنوان گیرنده عمل می‌کنند)، B: برهمکنش ریبونوکلئاز-گیرنده موجب فعال شدن مسیر اندوسیتوز برای جذب سلولی ریبونوکلئاز به سیتوزول می‌شود، C: انتقال ریبونوکلئازها از سطح سلول به سیتوزول به وسیله فرآیند اندوسیتوز منجر به تخریب RNA و بروز مرگ سلولی در سلول سرطانی می‌شود (Kanwar and Kumar 2017)

Figure 3. An overal scheme of interactions of RNases and receptor on malignant cell(s) surface. A: The RNase molecule binds to the cancerous cell components (Glycans or heparin-sulphate proteoglycan, lipid raft etc. which act as receptors) due to Columbic interactions, B: RNase-receptor interactions lead to activate the endocytosis pathway for cellular uptake of RNase into the cytosol, C: RNase transportation from cell surface to cytosol by endocytosis pathway leads to degradation of RNA by RNase which causes cell death of cancerous cells (Kanwar and Kumar 2017)

جدول ۲. تعامل ریبونوکلئازها و گیرنده‌های سطح سلول‌های سرطانی

Table 2: RNase-receptor interaction on cancerous cell surface

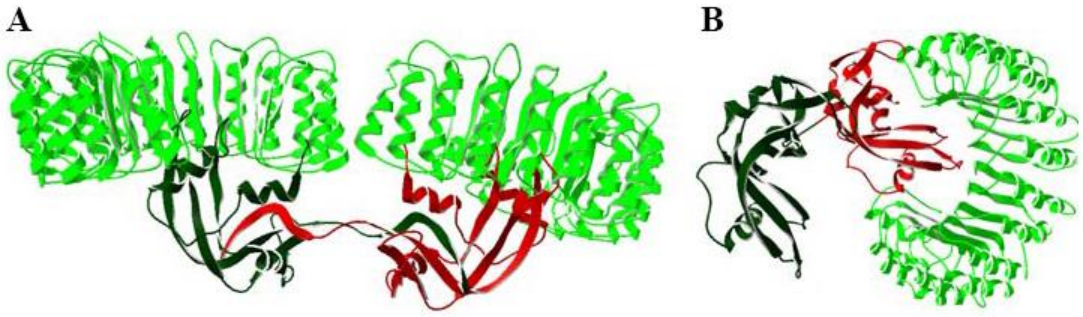
گیرنده Receptor	جایگاه اتصال Binding site	مکانیسم ورود به سلول Mechanism of internalization	منبع Reference
Globo H (اسیدیک لیپید، سیالیک اسید حاوی گلیکوپروتئین-ها) Globo H (acidic lipid), sialic acidcontaining glyco-proteins	گلیکان فوکوزیله شده میل اتصال معنی-داری برای اتصال با ریبونوکلئاز A و ۱ دارد Fucosylated glycan has significant affinity for RNase A and RNase1	پروتئین اندوسیتوز به شروع مسیرهای اندوسیتوز کمک می‌کند Endocytosis protein helps to initiated the endocytosis pathways	Mitkevich et al. 2014
پروتئوگلیکان‌های سولفات هپران، پروتئوگلیگان‌های سولفات کندروئیتین Heparan sulphate proteoglycans, chondroitin sulphate proteoglycans	اتصال از طریق واکنش‌های کولمبیک یا اسیدیک بین ریبونوکلئازها و پروتئوپلیکان-های هپران صورت می‌گیرد RNases binds with heparan sulphate proteoglycan due to acidic or coulombic interaction	پروتئین اندوسیتوز به شروع مسیرهای اندوسیتوز کمک می‌کند Endocytosis protein helps to initiated the endocytosis pathways	Mitkevich et al. 2014
آنتی‌ژن ویروس T (TAg) Virus T antigen	TAg از طریق باند دی سولفیدی بین فسفات ´۵ و گروه بتاهیدروکسی آمینو اسید سرین با RNA پیوند کوالانسی برقرار کرده و به عنوان یک گیرنده عمل می‌کند TAg acts as receptor which is covalently bound with RNA via a phosphodiester bond between the β-hydroxyl group of a serine residue and the 5'-phosphate	سمیت سلولی به سلول‌های سرطانی بدون وارد شدن اعمال می‌شود Cytotoxicity exerts on cancerous cell without internalization	Mitkevich et al. 2014
نانو کمپلکس هیالورونیک اسید–ریبونوکلئاز A (RNase A-HA) Hyaluronic acid modified RNase A	آمینو اسیدهای لیزین بار منفی پروتئین را حفظ کرده، باعث تسهیل ارتباط الکترواستاتیک با ذرات نانوچربی شده و منجر به اتصال اختصاصی کمپلکس RNase A-HA به گیرنده CD44 متصل می‌شوند Lysine residues mounting the negative charge on protein and facilitating its electrostatic complexation with cationic lipid nanoparticles,due to RNase A-HA complex can exclusively bind to the CD44 receptor	اتصال نانوکمپلکس RNase A-HA به گیرنده CD44 متصل می‌شود که موجب فعال شدن مسیرهای اندوسیتوز برای جذب سلولی این کمپلکس می‌شود RNase A-HA binds with CD44 receptor which activates the encocytosis pathways for cellular uptake of RNaseA-HA	Eller et al. 2015; Wang et al. 2017

مشابه همین اثر را از طریق الیگومریزاسیون نیز می‌توان ایجاد کرد. فعالیت ضدتوموری ریبونوکلئازها هم‌چنین ممکن است بوسیله هدف قراردهی یک آنتی‌ژن خاص سرطانی از طریق اتصال شیمیایی ریبونوکلئازها با آنتی‌بادی‌ها و یا بوسیله اتصال آن‌ها به پروتئین‌های خاص و تولید فیوژن پروتئین‌ها به کمک تکنولوژی DNA نوترکیب افزایش پیدا کند (Cruz and Kayser 2019). پروتئین‌های دیگری به غیر از آنتی‌بادی‌ها یا پپتیدهای انتخاب شده نیز به‌عنوان بخش‌های مورد هدف و دارای پتانسیل جهت استفاده در فعالیت‌های ضد توموری ریبونوکلئازها مورد بررسی قرار گرفتند. بدین منظور برخی پژوهشگران تغییراتی در ساختار ریبونوکلئازها به لحاظ شیمیایی ایجاد کردند، به‌عنوان مثال با توجه به این موضوع که ساختارهای کاتیونی پروتئین‌ها به راحتی می‌توانند وارد سلول‌ها شوند ریبونوکلئازهای A و 1 بوسیله اتلین‌دی‌امین و یا پلی‌اتیلن‌دی‌امین با هدف کاهش میل اتصال به مهارکننده ریبونوکلئازی و بهبود جذب سلولی اصلاح شیمیایی شدند (Graca et al. 2014). کاتیونیزه شدن گروه‌های کربوکسیلی، فعالیت کاتالیزوری ریبونوکلئازها را کاهش داد اما سمیت سلولی قابل توجهی را در پروتئین‌ها ایجاد کرد. اتصال ریبونوکلئاز سمینال گاوی و ریبونوکلئاز پانکراس گاوی با poly[N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide] و هم‌چنین ریبونوکلئاز A و الیگومر آن با پلی‌اتیلن گلایکول، واریانت‌هایی از این ریبونوکلئازها را بوجود آوردند که در موش فعالیت ضد تومری نشان دادند (Pouckova et al. 2006).

مهندسی ریبونوکلئازها امکان استفاده از آن‌ها را در طراحی ایمنوتوکسین ها فراهم می کند. ایمنوتوکسین ها دارای ساختاری منحصر به فرد متشکل از دو بخش توکسین و آنتی‌بادی می‌باشند که پس عبور از غشای سلولی و ورود به سلول هدف باعث از بین رفتن آن سلول می‌شوند. در طراحی ایمنوتوکسین‌ها از آنتی‌بادی‌ها به‌عنوان حامل استفاده می‌کنند که توکسین یا داروی مورد نظر را به صورت غیرفعال در جریان خون حمل کرده و نهایتا به سلول هدف می‌رسانند (Akbari et al. 2017). اختصاصیت ایمونوتوکسین‌ها برای انتخاب سلول هدف وابسته به نوع آنتی‌بادی انتخاب شده و سمیت ایجاد شده در القاء مرگ سلولی به سلول هدف، مرتبط با توکسین بکار برده شده می‌باشد. پژوهش‌های فراوانی نشان داده اند که ریبونوکلئازهای خانواده بزرگ RNase A به واسطه متوقف نمودن سنتز پروتئین‌ها پس از ورود در سلول هدف و در نتیجه هدف قراردهی هوشمند RNAهای داخل سلولی و هم‌چنین غلبه بر مشکلات سایر توکسین‌ها مانند ایمونوژنسیتی بالا و سمیت غیر اختصاصی آینده امیدبخشی در حوزه‌های درمانی و به ویژه درمان سرطان پیش‌رو دارند (Jordaan et al. 2018). نتیجه اولین اتصال ریبونوکلئازها، ریبوتوکسین میکروبی، به آنتی‌بادی منجر به افزایش سمیت سلولی این ساختار برای سلول‌های سرطانی ضمن کاهش سمیت سیستمیک ترکیب حاصل بود. ترکیبات مختلفی از ریبونوکلئازها و بخش‌های هدف قراردهنده سلول‌ها نظیر ترانسفرین و یا آنتی‌بادی بر علیه گیرنده ترانسفرین و یا CD22 ساخته شده‌اند که بطور چشم‌گیری باعث افزایش سمیت سلولی ریبونوکلئازها شده است (Esposito et al. 2019). جالب اینکه زمانی‌که ریبونوکلئاز A و آنکوناز از طریق رسپتور ترانسفرین به سیتوزول سلول هدف انتقال داده شدند هر دو ساختار میزان سمیت سلولی برابری نشان دادند که ثابت می‌کرد فرار از مهارکننده عامل محدودیت نبوده بلکه میزان جذب سلولی فاکتور محدود کننده بوده است. این یافته که آنکوناز و ریبونوکلئاز سمینال گاوی که ساختار دایمری دارد می‌توانند از مهارکننده فرار کنند و

دارای سمیت سلولی می‌باشند سبب شد محققان زیادی در طراحی ساختارهای مهندسی شده و جهش یافته ریبونوکلئازهای فاقد سمیت از آن‌ها الهام بگیرند. با شناسایی باقی‌مانده سیستئین در ریبونوکلئاز A یا ریبونوکلئاز ۱ در موقعیت هومولوگ سمینال گاوی، انواع دایمری از آنزیم‌های مذکور که سمیت سلولی را دارا بودند به دست آمد (Gotte and Menegazzi 2019). بر اساس ساختار کریستاگرافی کمپلکس RI-RNase A، انواع مختلفی از ریبونوکلئاز A و ۱ طراحی شدند که در آن‌ها اتصالات بین دو بخش کمپلکس مختل شده بود. در پژوهشی بر اساس نتایج حاصل از مطالعات هومولوژی مدلینگ و شبیه‌سازی مدل‌های سه بعدی اثر متقابل دو پروتئین (RNase و RI) با یکدیگر به منظور افزایش سیتوتوکسیسیتی آنزیم RNase پانکراسی نوع انسانی، تعداد ۵ آمینو اسید را در ساختار آنزیم تغییر داده و آنزیمی طراحی کردند که ضمن حفظ فعالیت کاتالیکی قدرت سیتوتوکسی‌سیتی بیشتری نسبت به آنزیم وحشی نشان داد (Forouharmehr et al. 2020). از میان این واریانت‌ها G88R-RNase A به‌عنوان بهترین ساختار طراحی شده با میل ترکیبی ۱۰۰۰۰ برابر کمتر نسبت به مهارکننده ریبونوکلئازی و IC50 معادل ۱۰ فولد بالاتر از آنزیم آنکوناز تکامل یافته‌ترین و بهترین ساختار معرفی شد. هم‌چنین مونومرهای ریبونوکلئاز سمینال گاوی که به خودی خود دارای سمیت سلولی نمی‌باشند بوسیله مهندسی ژنتیک تغییر یافته و واریانت‌های سیتوتوکسیکی با سمیتی ۳۰ برابر نوع دایمر خودشان ایجاد کردند و این موضوع نشان داد که ساختار دایمری این آنزیم برای ایجاد سمیت سلولی ضروری نمی‌باشد. به منظور ایجاد ترکیب‌های مختلفی از ریبونوکلئازهای قادر به فرار از مهارکننده و ریبونوکلئازهای دارای فعالیت کاتالیکی، انواع کایمرها ایجاد شدند. اگرچه کایمر تولید شده از ترکیب ۲۱ باقیمانده انتهای N ترمینال آنزیم ریبونوکلئاز ۲ و ۸۹ آمینواسید انتهای C ترمینال آنکوناز موفقیت‌آمیز نبود و فعالیت کاتالیتیکی کمتری نسبت به آنزیم آنکوناز و هم‌چنین سمیت پایین‌تری نسبت به آنزیم ریبونوکلئاز استفاده شده در ساختار کایمر نشان داد با این حال کایمرهای مشابه به عنوان مثال کایمر متشکل از آنکوناز و ریبونوکلئاز ۱ فعالیت، سمیت سلولی و هم‌چنین میزان فرار از مهارکننده ما بین فعالیت دو آنزیم بکار برده شده را نشان دادند (Esposito et al. 2019). نتایج بهتر و چشم‌گیرتر زمانی حاصل شد که ریبونوکلئازها با بخش‌های مورد هدف قراردهی سلول‌ها فیوژ شدند. به این معنی که اتصال آنکوناز، ریبونوکلئاز A، ریبونوکلئاز ۱، انژیوژنین، سمینال گاوی و ریبونوکلئاز ۲ پس از اتصال با آنتی‌بادی‌های مختلف بطور چشم‌گیری سمیت سلولی بیشتری از هر یک از آنزیم‌ها به تنهایی داشتند (Guillem et al. 2019). به‌عنوان مثال آنکوناز به آنتی‌بادی ضد CD22 انسانی متصل شد و نتیجه بروز IC50 در حدود ۳ تا ۲۰ نانومولار بود. اتصال ریبونوکلئاز گاوی مهندسی شده با تعویض ۶ آمینو اسید منظور کاهش میل ترکیبی آنزیم با مهارکننده ریبونوکلئازی به تک زنجیره متغیر آنتی‌بادی سیتوکسی‌مب نشان داد که ایمنوتوکسین حاصل قادر به ایجاد سمیت سلولی با IC50 در حدود ۵۰ میکرومول در سلول‌های سرطانی می‌باشد. بهترین نتایج زمانی بود که IC50 محصولات فیوژ شده در رنج میکرومولار باشد (Forouharmehr et al. 2020). در مطالعه دیگری ایمنوریبونوکلئاز انسانی تولید شد که حاصل اتصال ریبونوکلئاز ۱ و تک زنجیره متغیر آنتی‌بادی انسانی علیه گیرنده ErbB-2 بود و IC50 در محدوده میکرو مولار در سلول‌های مثبت ErbB-2 ایجاد کرد (De Lorenzo et al. 2004). در این رابطه Leich et al. (2006) با الگو

قراردادن ساختار دایمری ریبونوکلئاز سمینال گاوی که مانع اتصال آنزیم به مهارکننده می‌شود نوعی از ریبونوکلئاز پانکراس گاوی را طراحی کردند که حاصل اتصال دو آنزیم ریبونوکلئاز پانکراس گاوی بصورت اتصال سر به دم از طریق لینکر پپتیدی بود (شکل ۴). طراحی به گونه‌ای صورت گرفته بود که لینکر بخوبی بین دو آنزیم متصل شده فاصله ایجاد کرده بود و باعث افزایش بار خالص مولکول تولیدی شده بود با این حال تغییری در میزان اتصال ساختار حاصل با مهارکننده ریبونوکلئازی ایجاد نشد اما افزایش سمیت سلولی در ساختار طراحی شده پس از ورود به سلول هدف دیده شد که می‌تواند به دلیل افزایش اندوسیتوز ساختار حاصل باشد. Ariannejad et al. (2019) به منظور مهندسی آنزیم رانپیرناز با ویژگی‌های هم‌چون افزایش نفوذپذیری و افزایش سمیت سلولی و پایداری آنزیم با توجه به ساختار ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی واریانتی از این آنزیم با ۴ جهش لیزین ۴۵، ۴۹ و ۵۵ به آرژنین و سرین ۷۲ به آلانین طراحی کردند. مطابق نتایج این محققین آنزیم حاصل دارای سمیت سلولی بالاتری نسبت به آنزیم وحشی بوده و هم‌چنین با توجه به عدم اتصال در محیط دینامیک مولکولی قابلیت فرار از مهارکننده ریبونوکلئازی را نیز دارا می‌باشد.



شکل ٤. مدل‌های دایمری طراحی شده از RNase A. A: دایمر طراحی شده از طریق اتصال سر به دم با استفاده از لینکر، B: دایمر طراحی شده از طریق اتصال پشت سر هم. در هر دو شکل RNase A به رنگ سبز تیره و قرمز و مهارکننده به رنگ سبز روشن نشان داده شده است (Arnold and Ulbrich 2006)

Figure 4. Models of dimers designed from RNase A. A: models of C-terminally domain-swapped RNase A dimer (PDB entry 1F0V) B: tandem RNase A (based on PDB entry 7RSA). The two RNase A entities are indicated in dark green and red, respectively, the inhibitor is shown in light green (Arnold and Ulbrich 2006)

نتیجه‌گیری

ریبونوکلئازها کاندیدهای دارویی بالقوه با زیست فراهمی کافی هستند و با توجه به اثر سمیت آن‌ها که بر پایه هیدرولیز انتخابی مولکول‌های RNA داخل سلولی و فرایندهای خاص شناسایی غشاء سلولی می‌باشد می‌توان از این آنزیم‌ها به‌عنوان داروهای ضد تومور و یا عوامل درمانی یاد کرد. بر اساس پژوهش‌های انجام شده ریبونوکلئازها توانایی از بین بردن سلول‌های تومور را دارا بوده و این آنزیم‌ها هم‌چنین کاربردهای ضد ویروسی نیز دارند. بررسی مسیرهای ژنتیکی سنتز و مکانیسم‌های ایجاد سمیت سلولی ریبونوکلئازها، امکان ایجاد محصولات دارویی جدید با استفاده از این آنزیم‌ها را در آینده فراهم خواهد کرد و با بهره‌گیری از فرایندهای مهندسی و تغییرات شیمیایی در ساختار لیگاند/رسپتور ممکن است افزایش سمیت مولکول‌های ریبونوکلئاز به منظور انتخاب مسیرهای سیتوتوکسیک برای کار بر روی سلول‌های بدخیم فراهم شود. بنابراین کشف پتانسیل درمانی و بررسی جزییات ارزش‌های درمانی ریبونوکلئازها ضروری می‌باشد. در این مقاله مروری اطلاعات کلی درباره ریبونوکلئازها و قابلیت استفاده از آن‌ها به عنوان دارو ذکر گردید و امید است این مقاله آغازی بر مطالعات بیشتر ریبونوکلئازها جهت استفاده از آن‌ها در پژوهش‌های کلینیکی و تولید محصولات دارویی در آینده‌ایی نزدیک باشد.

منابع

آرین‌نژاد حمید، نصیری محمدرضا، جوادمنش علی، قوتی شاهرخ، دهقانی حسام، آسوده احمد (۱۳۹۸) طراحی ساختار پروتئینی آنزیم رانپیرناز به عنوان ایمنوتوکسین براساس ریبونوکلئاز پانکراتیک گاوی با استفاده از مطالعات دینامیک و استاتیک مولکولی. پژوهش‌های علوم دامی ایران ۱۲، ۳۵۱-۳۶۰.

References

Akbari B, Farajnia S, Ahdi Khosroshahi S, Safari F et al. (2017) Immunotoxins in cancer therapy: Review and update. Int Rev Immunol 36, 207-219.

Ardelt W, Ardelt B, Darzynkiewicz Z (2009) Ribonucleases as potential modalities in anticancer therapy. Eur J Pharmacol 625, 181–189.

Ardelt B, Ardelt W, Pozarowski P (2007) Cytostatic and cytotoxic Properties of amphinase: A novel cytotoxic ribonuclease from Rana pipiens oocytes. Cell Cycle 6, 3097-3102.

Ariannejad H, Nassiri MR, Javadmanesh A, Ghovvati S et al. (2019) Designing of protein structural of Ranpirnase based on bovine pancreatic ribonuclease with using molecular dynamic and static simulation. Iranian J Anim Sci Res 12, 351-360 (In Persian).

Arnold U, Ulbrich HR (2006) Natural and engineered ribonucleases as potential cancer therapeutics. Biotechnol Lett 28, 1615-1622.

Baranzini N, De Vito A, Orlandi VT, Reguzzoni M et al. (2020) Antimicrobial role of RNASET2 protein during innate immune response in the medicinal leech hirudo verbana. Front Immunol 11, 370.

Benito A, Ribo M, Vilanova M (2005) On the track of antitumour ribonucleases. Mol BioSyst 1, 294-302.

Boix E, Acquati F, Leonidas D, Pulido D (2020) Editorial: Role of Ribonucleases in immune response regulation during infection and cancer. Front Immunol 11, 236.

Bosch M, Benito A, Ribo M (2004) A nuclear localization sequence endows human pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. Biochem 24, 2167-2177.

Bracale A, Castaldi F, Nitsch L, D'Alessio G (2003) A role for the intersubunit disulfides of seminal RNase in the mechanism of its antitumor action. Eur J Biochm 270, 1980-1987.

Burnysheva KM, Petrushanko IY, Spirin PV (2016) Ribonuclease binase induces death in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells by apoptosis. Mol Biol 50, 302-306.

Cruz E, Kayser V (2019) Monoclonal antibody therapy of solid tumors: clinical limitations and novel strategies to enhance treatment efficacy. Biologics 13, 33-51.

Cuchillo CM, Nogués MV, Raines RT (2011) Bovine pancreatic ribonuclease: fifty years of the first enzymatic reaction mechanism. Biochemistry 50, 7835-7841.

Danishefsky SJ, Shue YK, Chang MN, Wong CH (2014) Development of Globo-H cancer vaccine. ACC Chem Res 48, 643-652.

De Lorenzo C, Arciello A, Cozzolino R, Palmer DB et al. (2004) A fully human antitumor immunoRNase selective for ErbB-2-positive carcinomas. Cancer Res 64, 4870-4874.

Dickson KA, Haigis MC, Raines RT (2005) Ribonuclease inhibitor: Structure and function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 80, 349–374.

Eller CH, Chao TY, Singarapu KK, Ouerfelli O (2015) Human cancer antigen Globo H is a cell-surface ligand for human Ribonuclease 1. ACS Cent Sci 1,181-190.

Esposito L, Donnarumma F, Ruggiero A, Leone S et al. (2019) Structure, stability and aggregation propensity of a Ribonuclease A-Onconase chimera. Int J Biol Macromol 133, 1125-1133.

Findlay D, Herries DG, Mathias AP, Rabin BR et al. (1961) The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease. Nature 190, 781–784.

Formoso E, Matxain JM, Lopez X (2010) Molecular dynamics simulation of bovine pancreatic ribonuclease A - CpA and transition state-like complexes. J Phys Chem 114, 7371–7382.

Forouharmehr A, Nassiri MR, Ghovvati Roudsari S, Javadmanesh A (2020) Production and introduction of a novel immunotoxin based on engineered RNase A for inducing death to Her1-positive cell lines. J Cell Physio 235, 4679-4687.

Ghosh SC, Neslihan Alpay S, Klostergaard J (2012) CD44: A validated target for improved delivery of cancer therapeutics. Expert Opin Ther Targets 16, 635–650.

Gotte G, Laurents DV, Merlino A, Picone D et al. (2013) Structural and functional relationships of natural and artificial dimeric bovine ribonucleases: new scaffolds for potential antitumor drugs. FEBS Lett 587, 3601-3608.

Gotte G, Menegazzi M (2019) Biological activities of secretory RNases: Focus on their oligomerization to design antitumor drugs. Front Immunol 10, 2626.

Graça VC, Silva MS, Reis LV, Sousa F et al. (2014) Ethylenediamine-Derived Chromatographic Ligand to Separate BSA, Lysozyme, and RNase A. Chromatographia 77, 1529–1537.

Guillem P, Jiarui L, Fatima A, Helena L et al. (2019) Testing a human antimicrobial RNase chimera against bacterial resistance. Frontiers in Microbiology 10, 1357.

Haigis MC, Kurten EL, Abel RL, Raines RT (2002) KFERQ sequence in ribonuclease A-mediated cytotoxicity. J Biol Chem 277, 11576 -11581.

Haigis MC, Raines RT (2003) Secretory ribonucleases are internalized by a dynamin-independent endocytic pathway. J Cell Sci 116, 313-24.

Jordaan S, Akinrinmade OA, Nachreiner T, Cremer C et al. (2018) Updates in the development of immunoRNases for the selective killing of tumor cells. Biomedicines 6, 28.

Kanwar SS, Kumar R (2017) Ribonuclease as Anticancer Therapeutics. Enz Eng 6, 162.

Kanwar SS, Mishra P, Meena KR (2016) Ribonucleases and their applications. J Adv Biotechnol Bioeng 4, 17-26.

Kobe B, Deisenhofer J (1996) Mechanism of ribonuclease inhibition by ribonuclease inhibitor protein based on the crystal structure of its complex with ribonuclease A. J Mol Biol 264, 1028-1043.

Lee SY, Kang MS, Jeong WY, Han DW et al. (2020) Hyaluronic acid-based theranostic nanomedicines for targeted cancer therapy. Cancers 12, 940.

Lee HH, Wang YN, Hung MC (2019) Functional roles of the human ribonuclease A superfamily in RNA metabolism and membrane receptor biology. Mol Aspects Med 70, 106–16.

Leich F, Koditz J, Ulbrich-Hofman R, Arnold U (2006) Tandemization endows bovine pancreatic ribonuclease with cytotoxic activity. J Mol Biol 358, 1305–1313.

Liu M, Gou F (2018) Recent updates on cancer immunotherapy. Precis Clin Med 1, 65–74.

Lomax JE, Bianchetti CM, Chang A, Phillips GN et al. (2014) Functional evolution of ribonuclease inhibitor: Insights from birds and reptiles. J Mol Biol 426, 3041–3056.

Makarov AA, Kolchinsky A, Ilinskaya ON (2008) Binase and other microbial RNases as potential anticancer agents. Bioessays 30, 781-90.

Mitkevich VA, Makarov AA, Ilinskaya ON (2014) Cell targets of antitumor ribonucleases. Mol Bio 48, 181-188.

Mohammadabadi MR, Mozafari MR (2019) Enhanced efficacy and bioavailability of thymoquinone using nanoliposomal dosage form. J Drug Delivery Sci Technol 47, 445–453.

Olmo N, Turnay J, Buitrago GG (2001) Cytotoxic mechanism of the ribotoxin-sarcin induction of cell death via apoptosis. Eur J Biochem 268, 2113-2123.

Olombrada M, Lazaro-Gorines R, Lopez-Rodriguez JC (2017) Fungal ribotoxins: A review of potential biotechnological applications. Toxins (Basel. 9, 71.

Pochechueva T, Alam S, Schötzau A, Chinarev A et al. (2017) Naturally occurring anti-glycan antibodies binding to Globo H-expressing cells identify ovarian cancer patients. J Ovarian Res 10, 8.

Pouckova P, Skvor J, Gotte G, Vottariello F et al. (2006) Some biological actions of PEG-conjugated RNase A oligomers. Neoplasma 53, 79–85.

Riccio G, D'Avino C, Raines RT, De Lorenzo C (2013) A novel fully human antitumor ImmunoRNase resistant to the RNase inhibitor. Protein Eng Des Sel 26, 243–248.

Roiz L, Smirnoff P, Bar-Eli M, Schwartz B et al. (2006) ACTIBIND, an actin-binding fungal T2-RNase with antiangiogenic and anticarcinogenic characteristics. Cancer 106, 2295–308.

Saxena A, Saxena SK, Shogen K (2009) Effect of Onconase on double-stranded RNA in vitro. Anticancer Res 29, 1067-71.

Schwartz B, Shoseyov O, Melnikova VO, McCarty M et al. (2007) Cancer Research 67, 5258-5266.

Suhasini AN, Sirdeshmukh R (2006) Transfer RNA cleavages by onconase reveal unusual cleavage sites. J Biol Chem 281, 12201-12209.

Suhasini AN, Sirdeshmukh R (2007) Onconase action on tRNA (Lys3), the primer for HIV-1 reverse transcription. Biophys Res Commun 363, 304-309.

Shruti G, Sukhdev S, Shamsher K (2016) An overview on ribonuclease and their therapeutic effects. Insight Med 1, 1-11.

Suri S, Panda B, Javed S, Mohd A (2007) RNase: A novel enzyme for treatment of cancers. Internet J Oncol 5, 1-5.

Wang X, Li Y, Li Q (2017) Hyaluronic acid modification of RNase and its intracellular delivery using lipid-like nanoparticles. J Control Release 263, 39-45.

Wang Z, Tang Y, Xie L, Huang A et al. (2019) The Prognostic and Clinical Value of CD44 in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. Front. Oncol. 9, 309.

Wu L, Xu Y, Zhao H, Li Y (2020) RNase T2 in inflammation and cancer: Immunological and biological views. Front. Immunol 11, 1554.

Yuki S, Kondo Y, Kato F (2004) Noncytotoxic ribonuclease, RNase T1, induces tumor cell death via hemagglutinating virus of Japan envelope vector. Eur J Biochem 271, 3567-72.

Zhang H, Chen J (2018) Current status and future directions of cancer immunotherapy. J Cancer 9, 1773–1781.