ساختار مولکول DNAی سه‌رشته‌ای، اهمیت و کاربردهای پزشکی آن

دکتر محمدرضا نوری دلویی، دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
علیرضا موجودی، کارشناس ارشد ژنتیک

Triplex DNA, Importance and Its Medical Application

ABSTRACT

Back in 1957, when investigators produced a triple-stranded form of DNA while studying synthetic nucleic acids, few researchers paid much atention to the discovery. However, triplex DNA was never entirely forgotton and especially since 1987 its structural and functional importance in biological systems as well as its medical applications and therapeutic potentional have been extensively studied.

It was suggested that in triplex DNA, the third strand was hydrogen bonded and positioned in the major groove of the Watson - Crick duplex.

Protein binding assays show that triplex formation by HR21ap inhibits Sp1 binding to the Ha-ras promoter. These results suggest that the triplex formation by the Ha-ras promoter targed oligonucleotide may provide a means to specifically inhibit transcription of this oncogene in vivo. Triplex DNA can disrupt gene transciptions and can be used as of this oncogen in vivo. Triplex DNA can disrupt gene transctiptionss and can be used as a new strategy for treating viral diseases, such as AIDS, by blocking virus reproduction.

As discussed in this article, for a number of reasons, interest in olifonucleotides designed for triplex helices on dsDNA is being is being steadily increased (includin their potential atrificial repressors of gene expression, mediator of site specific DNA cleavage and therapeutic use for genetic diseases, cancer and diseases caused by viruses).

Key Words: DNA; Triplex; Transcrption

چکیده

به دنبال سنتز مصنوعی DNA سه‌رشته‌ای (تریپلکس) در سال ۱۹۵۷ و مدتی بی‌توجهی به آن، دوباره و به طور مشخص از سال ۱۹۸۷ به بعد اهمیت ساختاری و عملکردی آن در سیستم‌های حیاتی و کاربردهای پزشکی آن به طور جدی مورد توجه قرار گرفته است. ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازهای DNA و باز سوم و تشکیل تریپلت‌ها، امکان تشکیل DNA سه‌رشته‌ای را فراهم آورده است. تریپلکس‌ها را بر حسب اینکه رشتهٔ سوم نسبت به رشتهٔ مشابهش در DNAی دو رشته‌ای در چه جهتی قرار گرفته باشد به دو دسته موازی و موازی ناهمسو تقسیم‌بندی می‌کنند. پایداری تریپلکس موازی ناهمسو بیش از پایداری تریپلکس موازی است. DNAی سه‌رشته‌ای به طور معمول توسط ردیف‌های پلی‌پورین ـ پلی‌پیریمیدین تشکیل می‌شود. این ردیفها با شرکت در ساختارهای سه‌رشته‌ای می‌توانند حرکت چنگال همانندسازی را متوقف ساخته و به این ترتیب همانندسازی DNA را کنترل نمایند. علاوه بر این، تشکیل تریپلکس می‌تواند از اتصال عامل نسخه‌برداری SP1 به پروموتر ژنها جلوگیری کرده و رونویسی آنها را مختل سازد چنانچه عمل نسخه‌برداری آنکوژن ras را به همین طریق متوقف می‌کند. تشکیل تریپلکس می‌تواند از نسخه‌برداری ژنهای ویروس HIV-1 نیز در سلولهای آلوده جلوگیری کند. بنابراین، از آنجا که DNA تریپلکس قادر است به صورت انتخابی روی یک ژن مشخص عمل کند، می‌تواند به عنوان یک ابزار مولکولی دقیق برای مقابله با برخی بیماریهای خطرناک مانند ایدز به کار رود. در سطح مولکولی، پژوهش بر روی خواص درمانی و کاربردهای پزشکی مولکول DNAی سه‌رشته‌ای به سرعت در حال انجام است و انتظار می‌رود

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

که در آینده‌ای نزدیک به نتایج پرثمری منجر گردیده و بر وسعت کاربردهای پزشکی این مولکول افزوده شود.

واژه‌های کلیدی: DNA ؛ سه رشته‌ای ؛ نسخه‌برداری

مقدمه

پس از گذشت نزدیک به چهار دهه از آغاز سنتز مصنوعی DNA سه‌رشته‌ای یا تریپلکس (Triplex DNA)، وجود این مولکول در موجودات زنده به اثبات رسیده است. نشان داده شده است که این مولکول می‌تواند در کنترل همانندسازی DNA و رونوشت‌برداری از ژنها به عنوان یک ابزار مولکولی دقیق عمل کند(۳).

در سال ۱۹۵۷ سه دانشمند به نامهای ریچ (Rich)، دیویس (Davies) و فلسنفلد (Felsenfeld) در انستیتوی ملی بهداشت آمریکا به هنگام مطالعه اسید نوکلئیک ساختگی، به طرزی تصادفی یک مولکول DNA سه‌رشته‌ای ایجاد کردند. این کشف، البته چندان مورد استقبال پژوهشگران واقع نشد و چنانچه می‌دانیم چند سال پیش از آن و در سال ۱۹۵۳ الگوی مارپیچ دورشته‌ای DNA توسط واتسن و کریک کشف شده بود و برای سالها بعد از آن هم عقیده رایج آن بود که مولکول DNA به صورت دورشته‌ای است و DNAی سه‌رشته‌ای یک ساختار غیرعادی و تازه‌ای است که دست ساخت بشر بوده و فاقد هرگونه اهمیت عملی و فیزیولوژیک است. این وجود، DNAی سه‌رشته‌ای هرگز به بوته فراموشی سپرده نشد و خوشبختانه در سالهای اخیر کاربردهایی برای آن ارائه شد(۳).

پژوهشگران در آزمایشگاههای مختلف، بررسیهایی را بر روی DNAی سه‌رشته‌ای انجام داده‌اند که منجر به تولید برشگرهای مولکولی برای قطع نمودن DNA شده است. حتی مناسبترین آنزیمهای برشگر خاص و محدودگر (restriction enzymes) که برای بریدن ژنوم به کار می‌روند با توجه به طول بسیار زیاد ژنوم، و با عنایت به اینکه به طور معمول ردیفهای بازی شامل ۴ تا ۸ جفت باز را شناسایی می‌کنند، تعداد قطعات زیادی را ایجاد می‌کنند که جداسازی و تفسیر آنها بسیار مشکل است، اما برشگرهای نوع تریپلکسی که به طور معمول ردیفهای بازی شامل حدود ۱۵ جفت باز را در مولکول DNAی دو رشته‌ای شناسایی می‌کنند، در یک یا چند محل در طول ژنوم عمل کرده و در نتیجه قطعات بزرگ DNA را که کار با آنها به مراتب از قطعات بیشمار و کوچک DNA راحت‌تر است، تولید کنند. چنین برشگرهایی در تهیه نقشه ژنی ژنوم انسان و در جداسازی آنها به شکل انفرادی نیز مؤثر هستند. همچنین، مشخص شده است که DNAهای تریپلکس دارای خواص بالقوهٔ درمانی هستند. اخیراً نشان داده شده است که DNAی تریپلکس قادر است در محلهای ویژه بر روی ژنهای طبیعی، عمل رونوشت‌برداری از روی ژنها را مختل کرده و در نتیجه در عمل پروتئین‌سازی اختلال ایجاد کند. پژوهشگران در تلاش هستند تا از این ویژگی به عنوان یک استراتژی جدید برای مقابله با بیماریهای ویروسی مانند ایدز از طریق ممانعت نمودن از تکثیر و تولیدمثل ویروسها استفاده کنند. همچنین این امکان هست که برای دخالت در بیان ژنهایی که در توسعه و گسترش سرطان شرکت می‌کنند، به کار گرفته شود(۳).

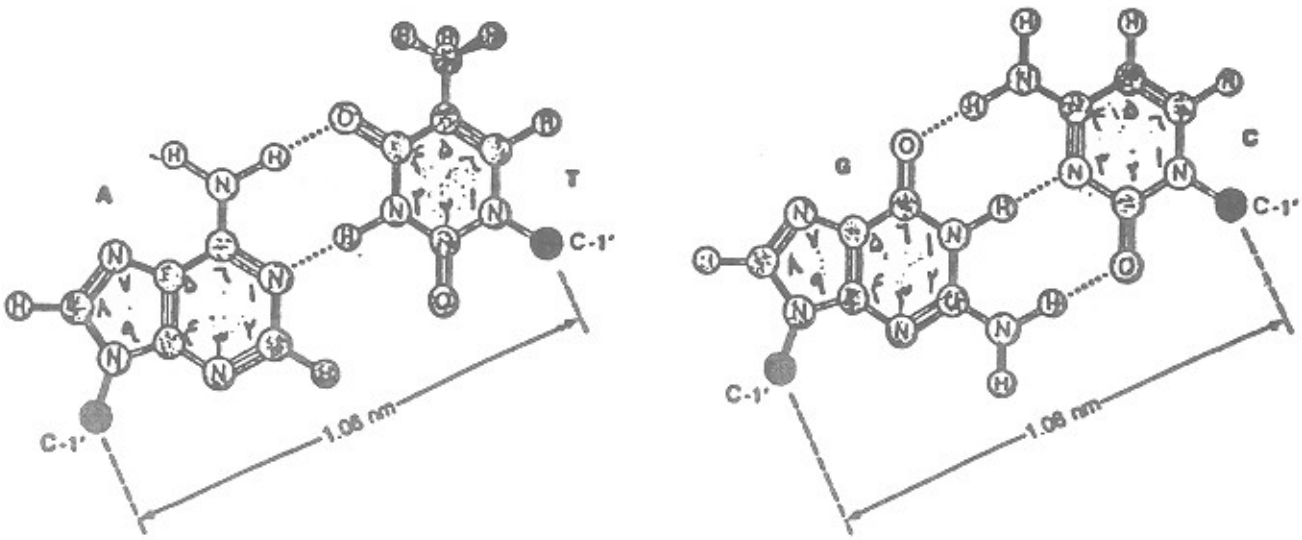
به دنبال سنتز مصنوعی DNAی تریپلکس در سال ۱۹۵۷، نخستین جرقه‌ای که سبب توجه دوباره به این مولکول گردید، در سال ۱۹۸۷ زده شد. DNAی تریپلکس که به وسیلهٔ سازندگان اولیه آن تولید شده بود به طور کلی یک پلیمر مصنوعی بود. اما در سال ۱۹۸۷ همزمان دو گروه مستقل مشتمل بر پیتر درون (peter Dervan) و همکارانش در انستیتوی تکنولوژی کالیفرنیا و گروهی از پژوهشگران در موزهٔ ملی تاریخ طبیعی پاریس نشان دادند که DNAی تریپلکس می‌تواند با ادغام یک رشتهٔ منفرد به یک مولکول DNAی دو رشته‌ای طبیعی که حاوی ژنهای واقعی هستند، ایجاد شود. **درون** در پژوهشهای خود که حدود ۱۴ سال طول کشید به جستجوی روشی شیمیایی برای ایجاد برش و قطع کردن مارپیچ دورشته‌ای بود. هدف او یافتن روشی بهتر و مناسبتر از روشهای زیستی بود. در روشهای زیستی به طور مثال استفاده از آنزیمهای محدودگر، از آنجا که این آنزیمها دارای عملکرد نامنظمی برای برش مولکول DNA دورشته‌ای هستند و چنانچه ذکر شد هر یک ردیفهایی از DNA را که به طور معمول شامل ۴ الی ۸ جفت باز ویژه هستند، به هنگام برش تشخیص می‌دهند، این امکان وجود دارد که در یک ژنوم بزرگ (مانند ژنوم انسان) به اندازهٔ دهها هزار نسخه از این ردیفهای کوتاه موجود باشد که کار روی آنها چندان آسان نیست. بنابراین، دِرون به دنبال یک مادهٔ شیمیایی بود که قادر به تشخیص ردیفهای ویژه‌ای با طول ۱۵ الی ۲۰ جفت باز باشد. ردیفهایی با این طول ممکن است تنها یک بار در طول ژنوم انسان رخ بدهد. هدف از ابداع این روش استفاده از اسید نوکلئیک سه‌رشته‌ای برای تشخیص محلهای مناسب جهت برش بود. در سال ۱۹۸۷ گروه دِرون با تولید رشته‌های DNAای مشتمل بر ۱۱ الی ۱۵ نوکلئوتید ویژه و الحاق آنها به جایگاههای مشخصی از یک DNAی کروموزومی یک DNAی تریپلکس ایجاد کردند. این رشته ساختگی تنها شامل دوباز پیریمیدین T و C بود که در اثر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

الحاق آن به مولکول دورشته‌ای، باز T، جفت باز مکمل آدنین - تیمین و باز C، جفت باز گوانین - سیتوزین را به ترتیب تشخیص داده و به آن متصل شده بودند. بنابراین اعتقاد دِرُوَن بازهای T و C، موجود در رشتهٔ سوم در نتیجه می‌توانند به گونه‌ای طراحی شوند که موجب ردیف‌یابی تعداد زیادی از ژنها گردند. کمی بعد از آن با تجهیز رشتهٔ سوم به یک مادهٔ شیمیایی اکسید کننده (به نام EDTA complexed with iron)، گروه دِرُوَن توانستند DNAی کروموزومی را در هرکجا که رشته سوم به آن متصل می‌شد، بشکنند. همزمان، گروه فرانسوی نیز اعلام کردند که با استفاده از یک مادهٔ مخرب سبک در رشته سوم توانسته‌اند DNA را از محلهای خاصی برش دهند(۳).

در سالهای بعد گروه درون با توسعه پژوهشهای خود نشان دادند که روش DNAی سه‌رشته‌ای را می‌توان برای برش قطعات ۲۰ نوکلئوتیدی از کروموزوم شماره III مخمر به کاربرد. عملکرد قطعات تک‌رشته‌ای مصنوعی بسیار دقیق بود، به گونه‌ای که در بین چهارده میلیون جفت باز تقریباً به درستی ردیف بازی مورد نظر پژوهشگران را برش می‌دادند. به این ترتیب، شواهد تجربی اولیه مبنی بر کارا بودن روش DNAی سه‌رشته‌ای بر روی ژنوم انسانی ارائه شد. این موفقیت‌ها، البته بدان معنا نیست که این روش خالی از اشکال است(۳).

شکل ۱ـ نحوهٔ جفت شدن بازهای موجود در دو رشتهٔ DNA بر اساس الگوی واتسن و کریک



تشکیل تریپلکس چگونه امکان‌پذیر است؟

بر اساس الگویی که واتسن و کریک برای ساختار مارپیچ دورشته‌ای DNA ارائه کرده‌اند، دو رشتهٔ این مولکول توسط پیوندهای هیدروژنی میان بازهای پورین و پیریمیدین به یکدیگر متصل نگهداشته می‌شوند. جفت شدن نوکلئوتیدهای پورین و پیریمیدین در دو رشته بسیار اختصاصی است و متکی بر پیوندهای هیدروژنی میان A با T و G با C است. جفت شدن بازهای موجود در دو رشته برابر پیشنهاد واتسن و کریک در شکل ۱ نشان داده شده است.

چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود پس از تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین بازهای پورین و پیریمیدین، اتمهایی بر روی این جفت بازها باقی می‌مانند که می‌توانند در تشکیل پیوند هیدروژنی با باز سوم شرکت کنند. به عبارت دیگر تشکیل جفت باز بین بازهای پورین و پیریمیدین، تمام اتمهایی را که می‌توانند در ایجاد پیوندهای هیدروژنی شرکت کنند درگیر نمی‌سازد، بلکه امکان ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین جفت باز و باز سوم باقی می‌ماند که از این امکان برای تشکیل DNAی سه‌رشته‌ای استفاده می‌شود. در ادامه بحث، نحوهٔ ایجاد پیوندهای هیدروژنی بین جفت باز و باز سوم و تشکیل تریپلت (Triplet) یا ساختارهای سه‌بازی مورد بررسی قرار گرفته است.

علاوه بر وجود پتانسیل تشکیل تریپلت، باید دید ردیفهای موجود در طول ژنوم چگونه امکان تشکیل تریپلکس را فراهم آورده‌اند؟

از زمان سنتز مصنوعی DNAی سه‌رشته‌ای در سال ۱۹۵۷، ویژگیهای ساختاری آن توسط روشهای مختلف از جمله کریستالوگرافی با پرتو ایکس، رزونانس مغناطیسی هسته‌ای (که به اختصار NMR خوانده می‌شود)، روشهای فیزیکوشیمیایی و آزمایشهای زیستی مورد بررسی قرار گرفته و نتایج فراوانی به دست

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

آمده است. DNAی سه‌رشته‌ای به طور معمول توسط ردیفهای پلی‌پورین - پلی‌پیریمیدین تشکیل می‌شود. البته در این رخداد، استثنایی هم وجود دارد و آن ایجاد مولکول تریپلکس با میانجیگری پروتئین Rec A است که در آن ردیف ویژه‌ای مورد نیاز نیست؛ این تریپلکس از نوع موازی بوده و در نوترکیبی همساخت به عنوان میانجی عمل می‌کند(۱۳). چنانچه می‌دانیم در طول ژنوم موجودات پیشرفته (یوکاریوت) انواع مختلفی از ردیفهای تکراری (متوسط یا بالاتر) وجود دارد، از جمله می‌توان به ردیفهای تکراری ALu و L1 اشاره کرد که در سرتاسر ژنوم پستانداران دیده می‌شوند. خانوادهٔ Alu، معمولی‌ترین ردیفهای تکراری در ژنوم انسان هستند و شامل حدود ۳۰۰ جفت باز و احتمالاً در ۰/۵ میلیون نسخه می‌باشند که حدود ۵٪ DNA انسانی را تشکیل می‌دهند. وجه تسمیه این خانواده از این واقعیت مشتق شده است که این ردیفها توسط آنزیم محدودگر Alu1 تشخیص داده شده و برش می‌خورند(۱۰).

شکل ۲ـ ساختار تریپلکس موازی ناهمسو. الگوی DNAی سه‌رشته‌ای شکل گرفته در جایگاه هدف در ژن myc (چپ). نمایش شماتیک یک مجموعه تریپلکس (راست)

خانواده L1 (LINE-1, long interspersed repetitive elements) نیز از ردیفهای تکراری در ژنوم انسان می‌باشند که حدود ۱۰۰ هزار نسخه از آنها وجود دارد و طول کامل هر ردیف آن ۶/۱کیلوباز می‌باشد ولی بیشتر این ردیفها از انتهای ۵ بریده شده و کوتاهتر از این می‌باشند. انتهای ۳ این ردیفها غنی از باز آدنین می‌باشد و اختلاف آنها در انتهای ۵ است. خانوادهٔ L1 به دلیل تفاوت در انتهای ۵، از نظر ترتیب نوکلئوتیدی و اندازه دارای ناهمگونی هستند(۶). همچنین ردیفهای تکراری بسیار ساده‌ای که به عنوان ریزماهواره (microsatellite) شناخته می‌شوند و شامل ردیفهای پلی (dA) ـ پلی (dT) هستند، صدها و یا هزاران بار در طول ژنوم یوکاریوتها تکرار شده‌اند و حدود ۰/۳٪ از ژنوم انسان را دربرمی‌گیرند. بررسیهای جدید انجام شده نشان داده است که ردیفهای پلی‌پورین ـ پلی‌پیریمیدین به میزان چهار برابر بیشتر از آنچه قبلاً انتظار می‌رفت در ژنوم یوکاریوتها وجود دارد، در حالیکه چنین ترجیحی در ژنوم موجودات ابتدایی (پروکاریوتها) دیده نشده است. از نقطه نظر تحولات مولکولی، این ردیفها در نتیجهٔ اشتباههای فرایندهای همانندسازی یا کراسینگ اوربین کروموزومهای خواهری ایجاد شده‌اند(۷). به دلیل فراوانی این ردیفهای تکرار شونده، پژوهشگران، در فعالیتهای زیستی نقش‌های احتمال زیادی برای آنها در نظر گرفته‌اند، که به طور مشخص می‌توان به تاخوردگی کروماتین در سطوح بالا، شروع رونویسی، ممانعت از همانندسازی DNA و فعال کردن نوترکیبی اشاره کرد(۷).

از سلولهای Hela پروتئینی را تخلیص کرده‌اند که می‌تواند به طرزی اختصاصی به ردیفهای پلی (dA) ـ پلی (dT) متصل شود. وجود چنین پروتئینی نشان می‌دهد که ردیفهای پلی (dA) ـ پلی (dT) و تشکیل تریپلکس در این نواحی می‌تواند از جهت زیستی حائز اهمیت باشد. برای مثال، محلهای حساس به آنزیم نوکلئازی S1 که اغلب در ناحیه پروموتر ژنها قرار دارند شامل ردیفهای پلی‌پورین ـ پلی‌پیریمیدین می‌باشند. وجود این ردیفها سبب می‌شود یک ساختار سه‌رشته‌ای درون مولکولی ایجاد گردد که در نتیجه یک رشته جفت نشده بجا می‌گذارد و زمینه را برای فعالیت آنزیم نوکلئاز S1 در این ناحیه فراهم می‌کند. علاوه بر آنچه ذکر شد، با تشکیل DNAی سه‌رشته‌ای و پایداری آن در محیط آزمایشگاهی (تحت شرایط pH خنثی و غلظت فیزیولوژیک یونهای فلزی مانند Mg^{++}) منطقی بنظر می‌رسد که چنین ساختاری در محیط زنده نیز پایدار باشد. در واقع، وجود ساختار DNAی سه‌رشته‌ای در موجودات زنده با رنگ‌آمیزی کروموزومهای متافازی موش و استفاده از پادتن اختصاصی علیه ساختار تریپلکسی به اثبات رسیده است(۷).

انواع تریپلکس

تریپلکس‌ها را برحسب اینکه رشتهٔ سوم نسبت به رشتهٔ

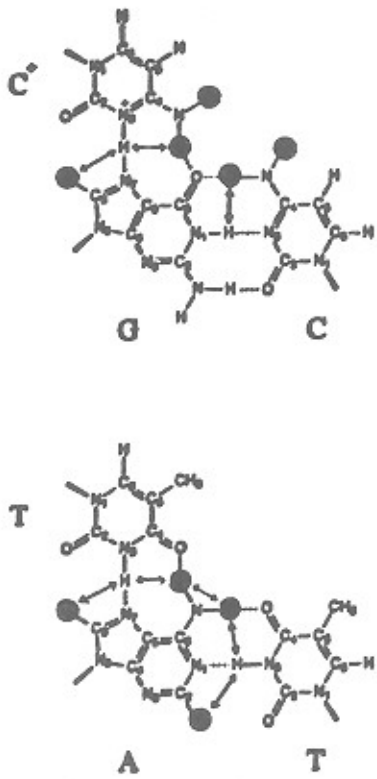
[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

مشابهش در DNA دورشته‌ای (دوپلکس) در چه جهتی قرار گرفته باشد به دو دسته ،کلاسیک یا ناموازی یا موازی ناهمسو (Antiparallel) و موازی (parallel) تقسیم‌بندی می‌کنند :

الف) ساختار تریپلکس کلاسیک یا موازی ناهمسو

در ساختار تریپلکس، رشتهٔ سوم توسط پیوندهای هیدروژنی به دوپلکس DNA متصل شده و در شیار بزرگ (major groove) قرار می‌گیرد. چنانچه جهت رشته سوم در تریپلکس طوری باشد که نسبت به رشتهٔ مشابهش در دوپلکس بشکل موازی ناهمسو قرار گرفته باشد (انتهای ۵ رشته سوم در طرف ۳ رشته مشابهش باشد) تریپلکس را کلاسیک یا موازی ناهمسو می‌نامند. پایداری این نوع تریپلکس بیش از پایداری تریپلکس موازی است که در ادامه شرح آن آمده است. در شکل ۲ الگویی از یک تریپلکس کلاسیک نشان داده شده است. در این شکل محلی از ژن myc را که مورد اثر واقع شده است مشاهده می‌شود.

شکل ۳ـ نمایش پیوندهای هیدروژنی بین جفت باز و باز سوم و تشکیل تریپلت (Triplet).



در شکل ۳ چگونگی تشکیل پیوندهای هیدروژنی در تریپلکس کلاسیک نشان داده شده است. در ساختار تریپلت‌های بازی، اتصال پیریمیدین دوم به جفت باز را جفت شدن بازی هوگ‌استین (Hoogsteen) می‌نامند(۱۲).

ب) ساختار تریپلکس موازی یا نوترکیب

مطالعات شیمی فضایی نشان داده است که تشکیل تریپلکس موازی یا نوترکیب نیز امکان‌پذیر است(۱). در این تریپلکس رشتهٔ سوم نسبت به رشتهٔ مشابهش در دوپلکس در جهت موازی قرار گرفته است (انتهای ۵ رشته سوم در طرف ۵ رشته مشابهش می‌باشد). نظر به اینکه این ساختار، پس از ساختار کلاسیک، مورد شناسایی قرار گرفته است آنرا شکل نوترکیب DNA (R-Triplex یا Recombinant form of DNA) نامیده‌اند. پایداری تریپلکس موازی کمتر از پایداری تریپلکس کلاسیک است. چگونگی تشکیل ساختار سه‌رشته‌ای موازی و پیوندهای هیدروژنی پیشنهادی در شکل ۴ نشان داده شده است.

پایداری تریپلت‌ها به طور نسبی به ترتیب زیر است :

G:C-G = A: T-A >> T:A-T> C: G-C

بر این اساس پایدارترین تریپلت، G: C-G بوده و ناپایدارترین آن C: G-C می‌باشد در تشکیل تریپلکس‌ها، باز سوم تنها با یک باز پیوند هیدروژنی ایجاد نمی‌کند بلکه با هر دو باز پیوند برقرار می‌سازد(۱).

تشکیل تریپلکس پایدار از DNAی تک‌رشته‌ای

پژوهشگران نشان داده‌اند که ردیفهای DNAی جور پورین (Homopurine) و جور پیریمیدین (Homopyrimidine) در شرایط مناسب می‌توانند به آسانی ساختار سه‌رشته‌ای ایجاد کنند. تریپلکس درون مولکولی که از تاخوردگی یک رشته DNA به وجود می‌آید به این ترتیب تشکیل می‌شود که ناحیه‌ای از DNA که دارای ردیفهای جور پورین و جور پیریمیدین است بر روی خود تا خورده و یک دوپلکس شکل می‌گیرد. سپس DNAی دوپلکس بر روی DNAی تک‌رشته‌ای تا می‌خورد و در نتیجه دو رشته جورپیریمیدین و یک رشتهٔ جور پورین به یکدیگر متصل می‌شوند. اتصال دومین رشته جور پیریمیدین به نحوی است که در شیار بزرگ دوپلکس قرار می‌گیرد(۱۲).

نتایج مطالعات ترمودینامیکی و جنبشی تشکیل DNAی سه‌رشته‌ای

مطالعات ترمودینامیکی و جنبشی تشکیل DNAی سه‌رشته‌ای که در شرایط pH زاید بین ۳/۸ تا ۷/۴ و دمای صفر تا ۳۵C انجام گرفته است. موارد زیر را نشان داده است(۶) :

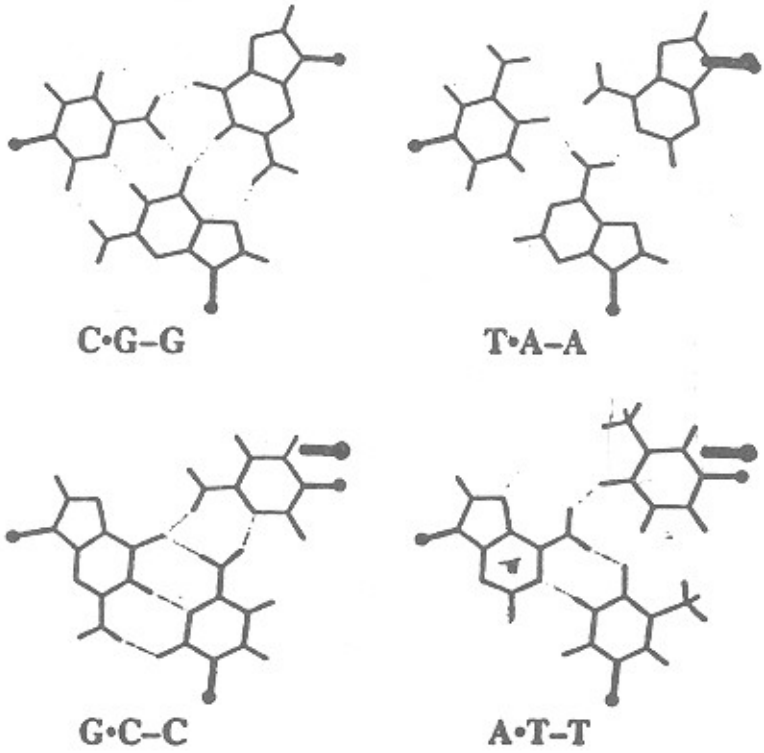
۱ـ ثابت تفکیک تریپلکس به دلیل تعادل سریع اسید ـ باز که رشته‌های منفرد پیریمیدین از خود نشان می‌دهند، به pH محیط بستگی دارد.

۲ـ میزان اتصال رشته‌های منفرد به دوپلکس با افزایش pH کاهش می‌یابد. pHهای اسیدی (۴ تا ۶) برای تشکیل تریپلکس مناسب‌ترند.

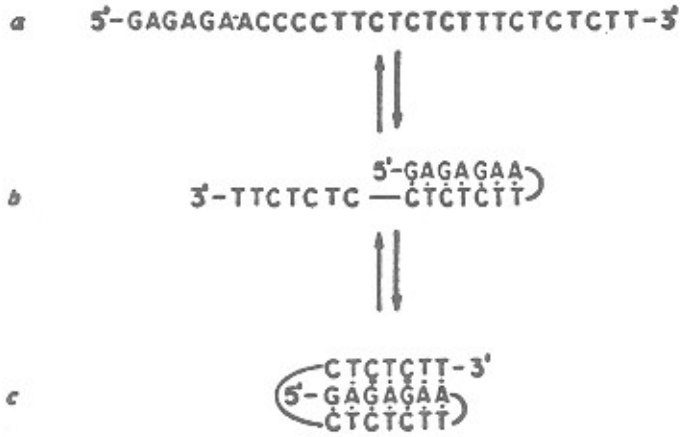
۳ـ در حالیکه ثابت تفکیک تریپلکس در pH پائین به درجه حرارت محیط بستگی ندارد، با افزایش pH به شدت به درجه

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

شکل ٤ـ نمایش پیوندهای هیدروژنی در چهار نوع تریپلکس موازی. خطوط ضخیم‌تر محل پیوندهای گلیکوزیدی را نشان می‌دهند



شکل ۵ـ نمایش تریپلکس از DNA تک‌رشته‌ای



حرارت محیط وابسته می‌شود.

۴ـ سرعت تشکیل تریپلکس با افزایش درجه حرارت محیط کاهش می‌یابد.

۵ـ واکنش تشکیل تریپلکس در pHهای پایین یک واکنش درجه دو می‌باشد در حالیکه در pH خنثی یک واکنش درجه سه است.

این مسأله بیانگر وجود مسیرهای مختلف تشکیل تریپلکس می‌باشد که وابسته به pH محیط عمل می‌کنند.

۶ـ ردیفهای پلی‌پورین ـ پلی‌پیریمیدین برای تشکیل تریپلکس مناسب‌تر هستند. این ردیفها در نواحی تنظیمی و ساختاری (رمزدهنده) بسیاری از ژنها مشاهده شده است.

۷ـ تریپلکس‌های درون مولکولی DNA از تریپلکس‌هایی که از رشته‌های جداگانه تشکیل می‌شوند پایدارترند.

۸ـ ساختار DNAی سه‌رشته‌ای در انتهای قطعات DNA از این ساختار در وسط مولکول DNA پایدارتر است.

۹ـ تریپلکس کلاسیک از تریپلکس موازی پایدارتر است.

۱۰ـ پایداری تریپلکس موازی در حضور یونهای دوظرفیتی و اسپرمیدین (spermidine) افزایش می‌یابد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

جلوگیری از همانندسازی DNA توسط تریپلکس

ردیفهای تکراری پلی‌پورین (GA) و پلی‌پیریمیدین (CT) به نحو گسترده‌ای در طول ژنوم یوکاریوتها پراکنده شده‌اند. این ردیفهای تکراری در DNAی ابرپیچ (Supercoli) سبب تشکیل مارپیچ سه‌رشته‌ای می‌شوند و در شرایط آزمایشگاهی نیز به دلیل تشکیل تریپلکس از همانندسازی DNAی تک‌رشته‌ای جلوگیری می‌کنند. این تریپلکس بین نواحی پلی‌پورین یا پلی‌پیریمیدین که به طور ناقص همانندسازی شده است و نیز قسمت همانندسازی نشده شکل می‌گیرد. مشاهده شده است که چنانچه dATP و dGTP به ترتیب با مشابه‌های 7-deaza dATP و 7-deaza dGTP جایگزین شوند، ممانعت از همانندسازی رفع می‌گردد یا اگر رشته‌های الگو قبلاً با پروتئین متصل شونده به DNAی تک‌رشته‌ای (مربوط به کلی‌باسیل) مجاور گردند ممانعت پیش نمی‌آید(۱۱).

نتایج پژوهشهای سال ۱۹۹۴ نشان داده‌اند که حضور ردیفهای پلی‌پورین - پلی‌پیریمیدین در ویروس پولیوما (polyoma) می‌تواند حرکت چنگال همانندسازی را در محیط زنده آهسته سازد. علاوه بر این نواحی پلی‌پورین - پلی‌پیریمیدین، حرکت چنگال همانندسازی ویروس SV40 را در محیط زنده متوقف می‌سازند(۱۱).

مشاهدات بالا که نشان می‌دهد ردیفهای پلی‌پورین - پلی‌پیریمیدین می‌توانند حرکت چنگال همانندسازی را متوقف سازند، احتمالاً بیانگر نقش این ردیفها در کنترل همانندسازی DNA و تفویت ژنی در طول ژنوم یوکاریوتهاست(۱۱).

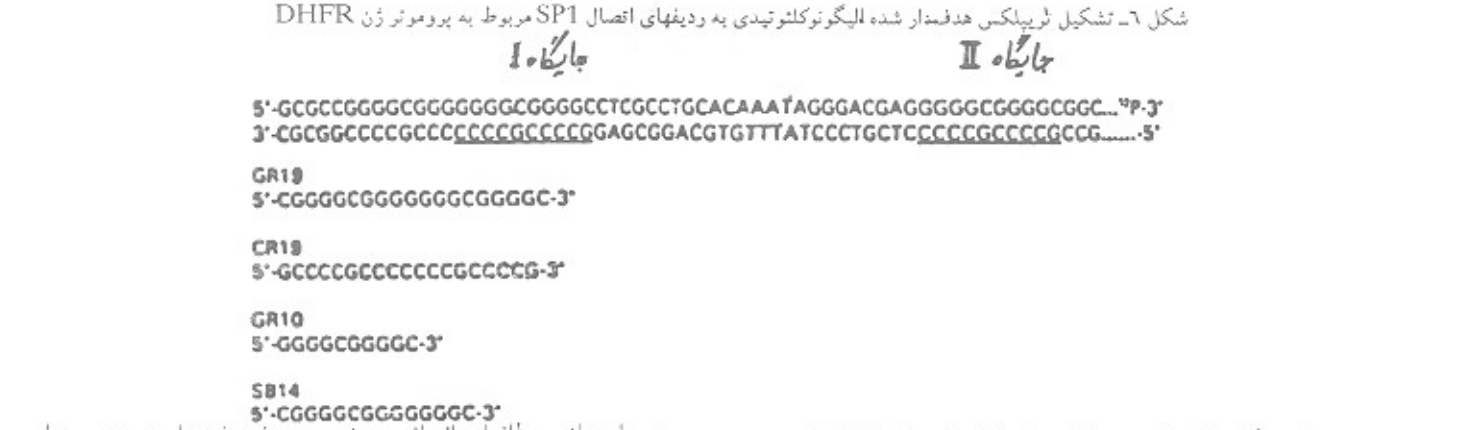
ممانعت از نسخه‌برداری ژنها و کنترل بیان ژن در سطح رونویسی توسط تریپلکس

آنزیم Dihydrofolate Reductase (به اختصار DHFR) یکی از آنزیمهای مهم متابولیسم فولیت (Folate) است که ژن آن در همه سلولهای یوکاریوتیک بیان می‌شود. تنظیم و کنترل بیان ژن DHFR پیچیده بوده و سطح بیان آن توسط عوامل مختلف تغییر می‌کند.

پروموتر ژن DHFR انسانی دارای دو ردیف ابقاء شده برای اتصال پروتئین تنظیمی SP1 می‌باشد. اهمیت اتصال SP1 برای عمل نسخه‌برداری از این ژن به دلیل آن است که حذف ردیفهای محل اتصال SP1، عمل پروموتر ژن DHFR را دچار اختلال می‌سازد(۵).

داروهایی مانند میترامایسین (Mithramycin) که به طرز اختصاصی به ردیف C-G در DNA متصل شده و بیان ژن DHFR را متوقف می‌سازند، در واقع از اتصال عامل SP1 به پروموتر DHFR جلوگیری می‌کنند. دو جایگاه اتصال پروموتر ژن DHFR برای عامل SP1 با فاصله ۲۴ جفت باز از یکدیگر قرار گرفته‌اند. در سال ۱۹۹۲ پژوهشگران نشان داده‌اند که تشکیل، تریپلکس در جایگاه شماره I، از اتصال عامل نسخه‌برداری SP1 به پروموتر ژن DHFR جلوگیری کرده و رونویسی از آن را مختل می‌سازد. این پژوهشگران با ارائه شواهدی مستقیم نشان داده‌اند که اولیگونوکلئوتید غنی از G می‌تواند با رشتهٔ پلی‌پیریمیدین DNA در جایگاه اتصال SP1 تریپلکس تشکیل داده و به این ترتیب از اتصال پروتئین SP1 جلوگیری بعمل آورد. بنابراین تشکیل تریپلکس در جایگاه اتصال SP1 و جلوگیری از اتصال این عامل می‌تواند نسخه‌برداری از ژن DHFR را متوقف سازد. بایستی اضافه کرد که هرچند جایگاههای اتصال SP1 در پروموتر بسیاری از ژنهای یوکاریوتیک شناسایی شده است، اما نقش دقیق این پروتئین در فرایند رونویسی هنوز به درستی روشن نشده است. بنظر می‌رسد که این پروتئین برای نسخه‌برداری از برخی ژنها از جمله ژن DHFR ضروری می‌باشد(۵). این پژوهشها همچنین نشان می‌دهد که هرچند حضور ردیفهای پلی‌پورین - پلی‌پیریمیدین در مولکول DNA دو رشته‌ای، تسهیلاتی را برای تشکیل تریپلکس فراهم می‌آورد، اما یک ضرورت مطلق برای ایجاد ساختمان سه‌رشته‌ای به حساب نمی‌آید. چنانچه در شکل ۶ نشان داده شده است، در جایگاه اتصال SP1 یکی از رشته‌های DNA غنی از G و دیگری غنی از C می‌باشد اما به طور کامل پلی‌پورین یا پلی‌پیریمیدین نیست(۵).

شکل ۶ـ تشکیل تریپلکس هدفمدار شده الیگونوکلئوتیدی به ردیفهای اتصال SP1 مربوط به پروموتر ژن DHFR



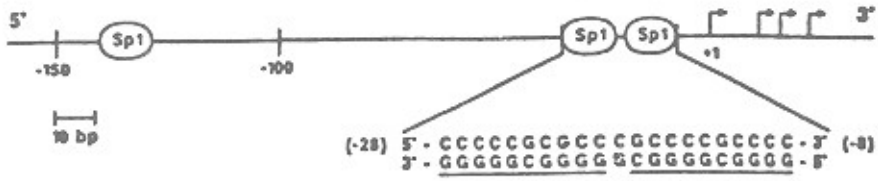
مثال دیگری که نقش تریپلکس را در کنترل بیان ژن نشان می‌دهد مربوط به انکوژن Ha-ras انسانی است(۲). نقش انکوژنهای ras در بسیاری از سرطانهای انسانی به خوبی روشن شده است و همین امر پژوهشگران را بر آن داشته است تا بدنبال ممانعت کننده‌هایی باشند

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

که بتوانند به نحو اختصاصی از نسخه‌برداری انکوژن ras جلوگیری کنند. پروموتر آنکوژن Ha-ras انسانی شامل سه جایگاه برای اتصال عامل رونویسی SP1 می‌باشد که برای عمل نسخه‌برداری از ژن ضروری است. دو عدد از این جایگاههای اتصال SP1 (که جایگاههای اصلی شروع رونویسی بوده و محل مناسبی برای عوامل اتصالی به DNA می‌باشند) در یک ناحیه ۲۱ جفت بازی (۸- تا ۲۸-) در بالا دست ژن قرار گرفته‌اند و رونویسی از این ژن مهم را کنترل می‌کنند. این ناحیه از پروموتر غنی از جفت بازهای G:C می‌باشد که در شکل ۷ نشان داده شده است.

ردیف غنی از G:C که در پروموتر انکوژن Ha-ras وجود دارد و

شکل ۷ـ نقشه پروموتر Ha-ras انسانی با سه جایگاه اتصال SP1 و ردیف ۲۱ جفت بازی غنی از G:C



ردیف هدف تریپلکس

محل اتصال عامل رونویسی SP1 می‌باشد به عنوان هدفی برای تشکیل تریپلکس محسوب می‌شود. به طور کلی وجود نواحی غنی از G:C که محل اتصال عوامل SP1 می‌باشند از جمله ویژگیهای بسیاری از پروموترهای یوکاریوتیک است(۲).

یک گروه هفت نفره از پژوهشگران دانشگاه آلاباما (Alabama) با هدف کنترل انکوژن Ha-ras در سطح رونویسی، اقدام به طراحی و ساخت الیگونوکلئوتیدهایی کرده‌اند که می‌توانند با نواحی غنی از G:C پروموتر انکوژن، تریپلکس تشکیل داده و از عمل رونویسی آن جلوگیری نمایند. الیگونوکلئوتید ساخته شده می‌تواند با رشتهٔ غنی از پورین DNA در ناحیه ۸- تا ۲۸- پروموتر، یک ساختار مارپیچ سه رشته‌ای ایجاد کند. رشته الیگونوکلئوتید نسبت به رشتهٔ غنی از پورین به صورت موازی ناهمسو قرار می‌گیرد. ویژگی خاص ردیف هدف در DNAی دورشته‌ای تعداد گوانین موجود در جفت بازهای G:C می‌باشد(۲).

توانایی الیگونوکلئوتیدهایی که در تشکیل تریپلکس برای رقابت با پروتئین‌هایی که به محلهای خاصی در DNA متصل می‌شوند، شرکت می‌کنند برای اولین بار در سال ۱۹۸۹ توسط ماهر (Maher) و همکارانش گزارش شد. در این گزارش آمده است که تشکیل تریپلکس می‌تواند از اتصال Ava I و Taq I methylase جلوگیری کند.

در سال ۱۹۹۱ پوستل (Postel) و همکارانش نشان دادند که تشکیل تریپلکس بوسیله پروموترژن C-myc از عمل رونویسی آن در سلولهای سالم انسانی جلوگیری بعمل می‌آورد. محل تشکیل تریپلکس در پروموتر C-myc در ناحیه ۱۱۵- تا ۱۴۲- قرار گرفته است. چنین بنظر می‌رسد که تشکیل تریپلکس مکانیسمی برای مهار رونویسی است که می‌تواند بیان ژن myc را کنترل کند.

مک‌شن (Mcshan) و همکارانش نشان دادند یک الیگونوکلئوتید که با جایگاه اتصال SP1 در ویروس HIV-I تریپلکس تشکیل می‌دهد می‌تواند از رونویسی ژنهای ویروسی در سلولهای آلوده جلوگیری نماید.

زاید در سال ۱۹۹۴ تعداد بیشتری الیگونوکلئوتید که می‌توانند با جایگاههای اتصال عوامل رونویسی، تریپلکس ایجاد کرده و رونویسی را مهار نمایند گزارش شده است(۲).

کاربردهای پزشکی و خواص درمانی مولکول DNAی سه‌رشته‌ای

کار بر روی خواص درمانی و کاربردهای پزشکی مولکول سه‌رشته‌ای DNA نیز به سرعت در حال انجام است. از آنجا که احتمال داده می‌شد که DNAی تریپلکس ممکن است از فرایند رونویسی ژنها جلوگیری کند، اولین پژوهشهای تجربی از سال ۱۹۸۷ آغاز شد و طی آن هوگان (Hogan) و همکارانش نشان دادند که حداقل در شرایط آزمایشگاهی، DNAی تریپلکس قادر است به صورت انتخابی روی یک ژن مشخص عمل کند. این پژوهش روی ممانعت از فعالیت یک ژن انسانی به نام myc متمرکز بود. یک سال بعد پژوهشگران فرانسوی نشان دادند که اسید نوکلئیک مصنوعی که به عنوان رشته سوم به کار می‌رود، می‌تواند عوامل رونویسی را که

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

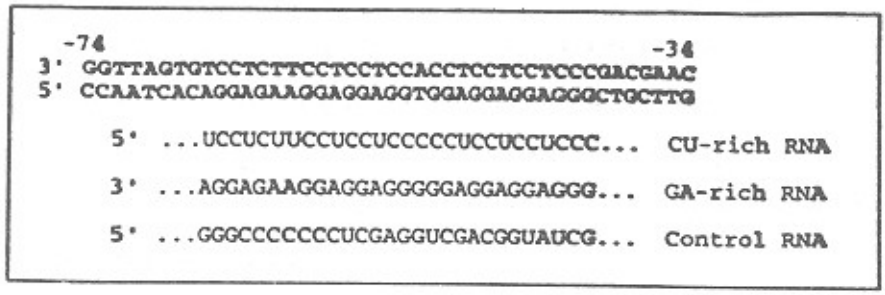
موجب تنظیم ژن در موجودات یوکاریوت می‌شوند، سد کند. جذب چنین رشته‌های سوم مصنوعی به داخل هسته می‌بایستی اصلاح شود. هوگان به شدت تحت تأثیر کاربردهای درمانی توانایی این روش، که از لحاظ نظری سبب سد شدن فعالیت هر ژنی می‌شود، قرار گرفت، تا جایی که یک شرکت دارویی موسوم به "تریپلکس" را تأسیس کرد و روشهای درمانی جدیدی را بر مبنای DNAی سه رشته‌ای ایجاد کرد. او و همکارانش همچنین نشان دادند که یک DNAی صناعی می‌تواند از سرعت همانندسازی ویروسها در سلولهای آلوده شده در محیط کشت مصنوعی بکاهد. امکان دیگر کاربرد DNAی سه‌رشته‌ای در سقط جنین است. چنانچه می‌دانیم هورمون پروژسترون تحریک کننده دیواره رحم است و برای جایگزینی جنین ضروری است. DNAی تریپلکس ممکن است با سد کردن فعالیت ژنهای محرک تولید پروژسترون، مانع جایگزینی جنین شود(۳). در مورد جلوگیری از رونویسی ژنهای ویروس HIV نیز قبلاً اشاره شد.

فن لکه‌گذاری تریپلکس

در سال ۱۹۹۴ با استفاده از توانایی تشکیل تریپلکس بین مولکولهای RNA و DNAی دو رشته‌ای، فن لکه‌گذاری تریپلکس (Triplex Blotting) ابداع شد. به طور کلی تشکیل تریپلکس بین الیگونوکلئوتید RNA و DNAی دو رشته‌ای نشانگر (پروب) رادیواکتیو که منجر به شناسایی و تشخیص RNAای خاص در کل RNA سلولی می‌گردد، لکه‌گذاری تریپلکس گفته می‌شود(۹). لکه‌گذاری تریپلکس مشابه روشهای لکه‌گذاری ساترن و نورترن می‌باشد. در این روش جدید، DNAی دو رشته‌ای رادیواکتیو به عنوان پروب به‌کار می‌رود. این DNA می‌تواند با ردیف خاصی از RNA هیبرید (دو رگه) شده و با ایجاد تریپلکس، موجبات شناسایی آن RNA را فراهم آورد. شرایط گوناگون دو رگه‌سازی مانند pH، درجه حرارت و قدرت یونی می‌تواند بر تشکیل تریپلکس تأثیر گذارد. در شکل ۸ مولکول دو رشته‌ای DNA که پررنگ‌تر نشان داده شده است در واقع ۴۳ جفت باز (۷۶- تا ۳۴-) از پروتوآنکوژن B2/neu HER2/c-erb می‌باشد که به عنوان پروب عمل می‌کند. این ناحیه از DNA که به صورت جورپورین - جورپیریمیدین است در تشکیل تریپلکس شرکت می‌کند.

ردیف RNA غنی از CU می‌تواند به طور محکم به DNAی دورشته‌ای متصل شده و تشکیل تریپلکس دهد. ایجاد تریپلکس در

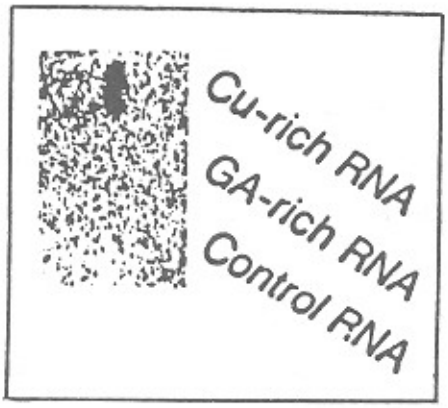
شکل ۸ـ پروب کاوشگر دو رشته‌ای DNA و ردیفهای RNA ایجاد شده در



این حالت به pH بستگی داشته و جهت آن به نحوی است که رشته RNA موازی رشته DNA پلی‌پورین بوده و درون شیار بزرگ DNA قرار می‌گیرد. تشکیل ساختار مارپیچ سه‌رشته‌ای بین RNA غنی از GA و DNAی دورشته‌ای، تاکنون در هیچ شرایطی گزارش نشده است.

در یک تجربه آزمایشگاهی برای انجام لکه‌گذاری تریپلکس، RNAهای مختلف از جمله RNAهای غنی از GA و CU با روش الکتروفورز از یکدیگر جدا شده و به یک فیلتر نایلونی انتقال یافتند. سپس با استفاده از پروب DNAی دو رشته‌ای نشاندار شده با ^{32}P عمل دورگه‌سازی روی فیلتر صورت گرفت. در شکل ۹ نتیجهٔ آزمایش که در آن RNA غنی از CU به دلیل تشکیل تریپلکس، با دقت و حساسیت بالایی مورد شناسایی قرار گرفته است نشان داده

شکل ۹ـ فن لکه‌گذاری تریپلکس توسط RNAی ایجادشده در محیط خارج از موجود زنده



[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]

شده است. طبیعتاً، RNA غنی از GA و RNA کنترل که مخلوطی ازبازهای پورین و پیریمیدین می‌باشد به دلیل آنکه در تشکیل تریپلکس شرکت نمی‌کنند، شناسایی نشده‌اند(۹).

علیرغم آنکه از کشف مولکول DNAی سه رشته‌ای، زمان چندانی نمی‌گذرد، اما به دلیل اهمیت بالا و به ویژه کاربردهای متعدد پزشکی آن، پژوهش پیرامون خواص درمانی و کاربردهای پزشکی آن به طرزی تصاعدی در حال انجام است. در پزشکی مولکولی، این مولکول می‌تواند در کنترل همانندسازی DNA، رونوشت برداری از ژنها و فرایند ترجمه (پروتئین‌سازی) به عنوان یک ابزار مولکولی دقیق عمل کرده به مثابه یک استراتژی جدید برای مقابله با بیماریهای مهم و خطرناک متعدد ـ مانند ایدز و سرطان ـ به کار رود.

منابع

1- Anna K. Shchyolkina, Edward N. Timofeev, Olga F. Borisova, et al (1994) The R-form of DNA does exist. FEBS letters, 339, 113-118.

2- Charles Mayfield, Scot Ebbinghaus, Jay Gee, etal. (1994) Triplex Formation by the Human Ha-ras promoter Inhibits SP1 Binding and in vitro Transcription. The Journal of Biological Chemistry, 269, 27, 18232-18238.

3- David Davies. (1991). Triplex DNA Finally Comes of Age. Science, 252, 1374-1375.

4- David A. Hartman, Shu-Ru Kuo, Thomas R. Broker and et al. (1992). Intermolecular Triplex Formation Distorts the DNA Duplex in the Regulatory Region of Human papillomavirus Type -11. the Journal of Biological chemistry, 267,8,5488-5494.

5- Jay E. Gee, Scott Blume, Richard C. Snyder, and etal. (1992). Triplex Formation prevents SP1 Bindingcal Chemistry, 267, 16, 11163-11167.

6- Kazazian H.H., Wong C., Youssoufian H., and et al, (1988). Haeophilia A resulting from de novo insertion of L1 sequences represents a novel mechanism for mutation in man, Nature, 332, 164-166.

7- Ryoiti Kiyama, Naoko Nishikawa and Michio Oishi, (1994). Enrichment of human DNAs that Flank poly (dA). poly(dT) Tracts by Triplex DNA Formation, J. Mol.Biol., 237, 193-200

8- Shindo H., Torigoe H. and sarai A., (1993), Thermodynamic and kinetic studies of DNA triplex formation of an oligohomopyrimidine and a matched duplex by filter binding assay, Biochemistry, 32, 8963-8969.

9- Short Technical Reports. (1994). Biotechniques, 16, 6, 1070-1071.

10- Singer, M. and Berg, P. (1991), Gene and Genome, University Science Books and Blackwell Scientific publications.

11- Sridhara Rao B., (1994), Pausing of simian virus 40 DNA replication fork movement in vivo by (dG-dA)n. (dT-dC)n tracts, Gene, 140, 233-237.

12- Vladimir sklenar and Juli Feigon, (1990), Formation of a stable triplex from a single DNA strand, Nature, 345, 836-838.

13- Zhurkin V.B., Raghunathan G., Ulyanov N.B. and et al, (1994), A parallel DNA Triplex as a Model for the Intermediate in Homologous Recombination, J. Mol. Biol., 239, 181-200.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-08-14]