Proces składania RNA jako cel oddziaływania terapeutycznego

Jarosław Paluszczak

ORCID: 0000-0002-6187-7549

Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu

Adres do korespondencji: Katedra Biochemii Farmaceutycznej, Uniwersytet Medyczny im. K. Marcinkowskiego, Świącickiego 4, 60-781 Poznań, e-mail: paluszcz@ump.edu.pl

Odkrycie nieciągłej struktury genów przez Roberts'a i Sharp'a, uhonorowanych za to osiągnięcie Nagrodą Nobla w dziedzinie fizjologii i medycyny w roku 1993, ujawniło istnienie procesu składania (ang. *splicing*) pierwotnego transkryptu (pre-mRNA) w organizmach eukariotycznych, obejmującego wycinanie intronów i łączenie eksonów w dojrzały transkrypt, który jest matrycą w procesie biosyntezy białka (translacji) [1]. Obecnie wiemy, że w genomie człowieka większość genów zawiera 3–8 intronów (przeciętnie – 7–8) [2]. Jednym z rekordzistów jest gen *DMD*, który zawiera ich aż 78. Istnieje także niewielka pula genów (~680), które nie zawierają w swojej sekwencji intronów [3]. Wyniki badań nad wycinaniem intronów nie tylko wskazały na fascynującą złożoność procesu ekspresji genów, ale znalazły też praktyczne zastosowanie w projektowaniu nowych form terapii. Ten drugi aspekt jest tematem niniejszego artykułu.

Proces składania RNA

W procesie transkrypcji informacja zapisana w genie zostaje przepisana z DNA na sekwencję pre-mRNA, który następnie ulega obróbce, na którą składają się trzy podstawowe procesy: dodanie czapki do końca 5', dodanie traktu poliadeninowego (ogona poliA) do końca 3', a także wycięcie sekwencji niekodujących (intronów) i połączenie eksonów [4]. Procesy te zachodzą przeważnie równocześnie z transkrypcją. W wyniku takiej obróbki powstaje dojrzały, pozbawiony intronów, transkrypt, który zostaje przetransportowany z jądra komórkowego do cytoplazmy, gdzie zachodzi proces biosyntezy białka. Wycięcie intronu wymaga pełnej precyzji,

Therapeutic targeting of alternative splicing • Gene transcription leads to the generation of pre-mRNA molecules which contain both coding sequences (exons) and intervening non-coding sequences (introns). The primary transcript needs further processing which involves the excision of introns and ligation of exons. This process is called RNA splicing. Nearly all primary transcripts undergo alternative forms of splicing, which may lead to exon skipping or intron inclusion in the final mRNA. Thus, the translation of alternatively spliced RNA molecules results in the formation of slightly different proteins, which may, in some cases, exert antagonistic activity. Splicing is a multistage process which is conducted by a complex machinery comprising small nuclear RNA molecules and many proteins called splicing factors. The process undergoes precise regulation by means of cis acting internal RNA sequences and trans acting protein factors which may either enhance or silence the splicing of an exon. Many diseases are associated with aberrations of alternative splicing and its modulation may be used therapeutically, e.g. for the treatment of spinal muscular atrophy (SMA) or Duchenne muscular dystrophy (DMD). This article presents current knowledge of the ways of pharmacological modulation of alternative splicing. The focus is on the use of those therapeutics which have been already approved for clinical application or have entered clinical trials. The chemistry and mechanism of action of specific splice switching oligonucleotides is presented. Nusinersen promotes exon inclusion during splicing of *SMN2* and is used for SMA treatment. On the other hand, eteplirsen is an oligonucleotide promoting exon skipping during splicing of mutated *DMD* and has been conditionally approved for DMD treatment. Moreover, small molecule modulators of alternative splicing (e.g. branaplam) are also described. The dynamic developments in this field should result in the approval of new drugs acting by the modulation of alternative splicing in the nearest future.

Keywords: alternative splicing, RNA splicing modulators, antisense oligonucleotides, nusinersen, eteplirsen.

© Farm Pol, 2019, 75(11): 605–616

ponieważ błędy mogłyby skutkować zmianą ramki odczytu i powstawaniem nieprawidłowego białka. Dodatkowa komplikacja wynika z faktu, że introny są zwykle znacznie dłuższe od eksonów: średnia długość eksonu wynosi 163 nukleotydy, natomiast średnia długość intronu – 5849 nukleotydów [5]. Cały proces jest uzależniony od rozpoznania granic eksonu przez komponenty kompleksu składającego RNA (spliceosomu) oraz łączenia wszystkich wykrytych eksonów poprzez wycięcie znajdujących się między nimi intronów. Jeśli nie dojdzie do rozpoznania granic danego eksonu z sąsiadującymi z nim dwoma intronami, ekson ten nie zostanie uwzględniony w ostatecznym transkrypcie [6]. Za cały proces składania pre-mRNA odpowiedzialna jest skomplikowana maszyna złożona z cząstek RNA i białek, tworzących kompleksy rybonukleoproteinowe.

Niemal wszystkie introny zbudowane są według wspólnego, ogólnego planu, który warunkuje dokładne rozpoznanie ich lokalizacji i granic ekson/intron (**rycina 1**). Intron, od strony 5', zaczyna się

sekwencją 5'-GU, a na końcu 3' zamyka go sekwencja AG-3'. Blisko końca 3' zlokalizowany jest trakt polipirymidynowy oraz tzw. miejsce rozgałęzienia zawierające resztę adeniny (A), która jest kluczowa dla zajścia pierwszej reakcji transestryfikacji w trakcie wycinania intronu. Taki układ rozpoznawany jest przez kompleksy małych jądrowych RNA (snRNA) z wieloma różnymi białkami [2]. snRNA, na zasadzie komplementarności lub na drodze innych oddziaływań, rozpoznają i wiążą określone sekwencje w intronie i na granicy ekson/intron. Przykładowo, cząsteczka U1 snRNA rozpoznaje miejsce donorowe (miejsce cięcia po stronie 5' intronu), a U2 łączy się w miejscu rozgałęzienia, co inicjuje powstanie kompleksu składającego. Za ostateczne wycięcie intronu oraz połączenie sąsiadujących eksonów odpowiedzialny jest makrokompleks złożony z U2, U5 i U6 snRNA oraz wielu białek [4]. Wycięcie intronu obejmuje dwie następujące po sobie reakcje transestryfikacji. Najpierw wiązanie fosfodiesterowe 3'-5' pomiędzy ostatnim nukleotydem w eksonie X i pierwszym nukleotydem w intronie (wspomniana wyżej reszta G w miejscu donorowym) zostaje przerwane, z jednoczesnym wytworzeniem nowego wiązania fosfodiesterowego 2'-5' między pierwszą resztą G intronu a resztą A występującą w miejscu rozgałęzienia wewnątrz intronu. Skutkuje to powstaniem pętli, co nadaje wycinanemu intronowi strukturę „lassa”. Następnie wolny koniec 3' eksonu X atakuje wiązanie fosfodiesterowe pomiędzy ostatnim nukleotydem intronu (wspomniana wyżej reszta G dinukleotydu AG-3') oraz pierwszym nukleotydem kolejnego eksonu (X+1), co prowadzi do wytworzenia nowego wiązania fosfodiesterowego 3'-5' pomiędzy ostatnim nukleotydem eksonu X oraz pierwszym nukleotydem eksonu X+1, z jednoczesnym uwolnieniem wyciętego intronu, który ulega następnie degradacji [7].

Kanoniczne składanie pre-mRNA oznacza każdorazowo wycięcie wszystkich intronów oraz połączenie wszystkich eksonów w dojrzały transkrypt mRNA. Zaobserwowano jednak, że ponad 90% genów ulega alternatywnemu składaniu. Najczęstszym wariantem jest pominięcie jednego z eksonów. Możliwy jest także wybór alternatywnych miejsc cięcia 5' lub 3'. Rzadziej zdarza się zachowanie intronu [4]. Alternatywne składanie pre-mRNA zwiększa różnorodność powstających białek – z jednej cząsteczki pre-mRNA otrzymujemy kilka wariantów mRNA, na bazie których powstają białka o nieco innej strukturze i funkcji. Dzięki temu możliwa jest m.in. tkankowo-specyficzna lub determinowana zmiennymi warunkami fizjologicznymi regulacja aktywności białek [6].

Proces alternatywnego składania pre-mRNA podlega precyzyjnej kontroli [7]. Odpowiedzialne są za to zarówno elementy cis (wewnętrzne

Rycina 1. Schemat ogólnej budowy intronu oraz dwuetapowej transestryfikacji zachodzącej w trakcie składania RNA. Przerywane czerwone linie oznaczają miejsca uczestniczące w reakcji transestryfikacji.

Figure 1. Schematic presentation of intron structure and the two-step transesterification occurring during RNA splicing. Red dashed lines indicate sites involved in transesterification.

fragmenty sekwencji pre-mRNA), jak i czynniki trans (białka regulatorowe rozpoznające sekwencje cis lub oddziałujące w inny sposób na kompleks składający). Sekwencje cis, które nasilają wykrywanie granic eksonu i wycinanie intronu, a co za tym idzie, włączenie danego eksonu do ostatecznego transkryptu, nazywamy wzmacniaczami składania. Takie sekwencje mogą być obecne zarówno wewnątrz intronu (intronowe sekwencje wzmacniające, ISE), jak i wewnątrz eksonu (eksonowe sekwencje wzmacniające, ESE). Z kolei sekwencje, które blokują wykrywanie granic eksonu i wycinanie intronu, a co za tym idzie promują pominięcie eksonu, nazywane są wyciszaczami składania. Tak jak sekwencje wzmacniające, wyciszacze mogą być obecne wewnątrz intronu (intronowe sekwencje wyciszające, ISS) lub eksonu (eksonowe sekwencje wyciszające, ESS) [6]. Aby wyrzucić efekt, sekwencje wzmacniające i sekwencje wyciszające muszą zostać rozpoznane i związane przez właściwe białka, odpowiednio, białka z rodziny SR i hnRNP (**rycina 2**). Pierwsze z nich zatem stymulują, a drugie – hamują tworzenie kompleksu składającego na granicy ekson/intron, z którą sąsiadują [6]. Białka SR i hnRNP same również podlegają regulacji, na przykład poprzez ich odwracalną fosforylację, przez co ich aktywność może być precyzyjnie dopasowywana do aktualnego zapotrzebowania komórki na dany wariant białka.

To, czy dany ekson zostanie włączony do dojrzałego transkryptu, czy też nie, zależy również od tempa transkrypcji. Szybkie tempo transkrypcji sprzyja pomijaniu alternatywnego eksonu w trakcie składania, natomiast spowolnienie tempa transkrypcji sprzyja jego włączeniu do dojrzałego mRNA. Tempo samej transkrypcji zależy od różnych czynników, wśród których ważną rolę odgrywają modyfikacje epigenetyczne [8]. DNA występuje w jądrze komórkowym w połączeniu z zasadowymi białkami histonowymi, tworząc podstawowe struktury chromatyny jądrowej zwane nukleosomami. Różne kowalencyjne modyfikacje histonów i DNA (np. ich metylacja) wpływają na gęstość upakowania nukleosomów w chromatynie. Gęstsze upakowanie nukleosomów sterycznie utrudnia transkrypcję, zatem jej przebieg może być regulowany poprzez wpływ na stopień upakowania nukleosomów. Odkryto na przykład, że gen kodujący neuronalne białko neureksynę ulega u myszy alternatywnemu składaniu, które zależy od trimetylacji reszty lizyny (K), która występuje jako dziewiąta z kolei w łańcuchu histonu H3 (H3K9me3) [9]. W różnych rejonach mózgu ekson 22 tego genu ulega w trakcie składania RNA usunięciu i nie pojawia się w dojrzałym transkrypcie. Pojawienie się H3K9me3 w rejonie chromatyny obejmującej sekwencję

Rycina 2. Uproszczony schemat oddziaływania sekwencji wzmacniających składanie RNA (eksonowych – ESE i intronowych – ISE) oraz wyciszających składanie RNA (ESS i ISS) na aktywność kompleksu składającego (spliceosomu). Zaznaczono udział białek SR i hnRNP.

Figure 2. A simplified presentation of the effect of RNA splicing enhancers (exonic – ESE, and intronic – ISE sequences) and splicing silencers (ESS and ISS) on the activity of the spliceosome. The involvement of SR and hnRNP proteins is included.

eksonu 22 powoduje kondensację nukleosomów, przez co polimeraza RNA wolniej przesuwa się wzdłuż sekwencji genu w trakcie transkrypcji, co daje czas na utworzenie kompleksu składającego wokół granic eksonu 22, dzięki czemu pojawia się on w dojrzałym transkrypcie. Co ciekawe, wspomniany proces zachodzi w komórkach hipokampa, umożliwiając konsolidację śladów pamięciowych [8, 9]. Zaobserwowano również, że aktywność białka MeCP2, które rozpoznając i wiążąc zmetylowany DNA, prowadzi do zwiększenia kondensacji nukleosomów, także wpływa na profil składania wielu genów poprzez spowolnienie syntezy pre-mRNA przez polimerazę RNA II [8, 10].

Wcześniej zorientowano się, że zaburzenia w procesie składania pre-mRNA są związane z różnymi stanami chorobowymi. Jednym z pierwszych przykładów było odkrycie, że niektóre z mutacji w genie kodującym beta-globinę, wywołujące beta-talasemie, skutkują wprowadzeniem nowych,

nieprawidłowych miejsc cięcia 5' wewnątrz intronów 1 lub 2 oraz aktywują kryptowe (słabe i wcześniej nieaktywne) miejsce cięcia 3', przez co dojrzały transkrypt zawiera fragment intronu, i powstaje dłuższe, niefunkcjonalne białko [1]. Już 25 lat temu wykazano, że blokowanie, będących wynikiem mutacji, miejsc składania przy użyciu specyficznych oligonukleotydów powoduje przywrócenie prawidłowego wzorca składania RNA i stymulację syntezy prawidłowej wersji beta-globiny w układzie *in vitro* [11]. Trudne jednak okazało się uzyskanie wymiernych efektów użycia takiej strategii w modelach *in vivo*, m.in. ze względu na niską wydajność przenikania oligonukleotydów do komórek prekursorowych erytrocytów w szpiku kostnym [12]. Tego typu obserwacje stworzyły jednak przestrzeń do prac nad terapeutycznymi modulatorami alternatywnego składania (MAS). Dalsza część artykułu w większości prezentuje wiedzę na temat modulatorów składania RNA, które znalazły już zastosowanie kliniczne lub znajdują się w fazie zaawansowanych badań klinicznych.

MAS w rzadkich chorobach neurodegeneracyjnych

Alternatywne składanie RNA było i jest przedmiotem wielu badań w kilku chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak np. stwardnienie zanikowe boczne, choroba Alzheimera czy otępienie czołowo-skroniowe [13]. Co więcej, jest to pierwsza grupa chorób, w przypadku których wprowadzono do terapii leki oparte o modulację procesu składania RNA. Najgłośniejszym przykładem jest dopuszczenie nusinersenu (Spinraza) do leczenia rdzeniowego zaniku mięśni (SMA, ang. *spinal muscular atrophy*) [14]. Lek ten jest refundowany w Polsce od 1 stycznia 2019 r. dla wszystkich pacjentów z SMA. Kolejnym lekiem jest eteplirsen (Exondys 51), który warunkowo dopuszczono w USA do leczenia dystrofii mięśniowej Duchenne'a (DMD) [15]. Kilka innych preparatów znajduje się aktualnie w fazie zaawansowanych badań klinicznych. Można spodziewać się zatem, że liczba dostępnych na rynku MAS powiększy się w ciągu kilku najbliższych lat.

Tabela 1. Podział rdzeniowego zaniku mięśni (SMA) na typy.
Table 1. The typology of spinal muscular atrophy (SMA).

Typ SMA	Moment wystąpienia objawów	Objawy motoryczne	Liczba kopii SMN2
0	Obecne od urodzenia	Bardzo ciężki przebieg	1
1	Przed 6 mies. życia	Nigdy nie siedzą samodzielnie	2
2	Między 6 a 18 mies. życia	Nigdy nie chodzą samodzielnie	3
3	Po 18 mies. życia	Utrata zdolności chodzenia	3-4
4	Pojawiają się w dorosłości	Łagodne osłabienie mięśni	≥4

Rdzeniowy zanik mięśni

SMA jest rzadką (~1:11000 urodzeń), autosomalną recesywną chorobą genetyczną uwarunkowaną utratą funkcji genu *SMN1*, niemal zawsze w wyniku delecji odcinka chromosomu 5q13 [16]. Brak białka SMN prowadzi do zaburzenia funkcji komórek różnych tkanek, ale jego najważniejszą konsekwencją jest degeneracja motoneuronów obecnych w rdzeniu kręgowym. Degeneracja motoneuronów zaburza stymulację nerwową mięśni poprzecznie prążkowanych, co prowadzi do postępującego osłabienia mięśni, ogólnego upośledzenia motoryki oraz narastających trudności w oddychaniu. Wyróżnia się pięć typów SMA (tabela 1), które znacząco różnią się przebiegiem [17, 18]. Około 60% pacjentów cierpi na SMA typu 1. Choć niemal wszyscy pacjenci z SMA charakteryzują się delecją genu *SMN1*, to przebieg choroby jest modyfikowany między innymi przez liczbę kopii genu *SMN2*, który jest paralogiem *SMN1*. Sekwencja obu genów różni się tylko kilkoma nukleotydami, jednak różnica ta jest odpowiedzialna za odmienny wzór składania RNA genu *SMN2* [19]. Uważa się, że zamiana jednego z nukleotydów w sekwencji eksonu 7 (zamiana C na T w pozycji 6) genu *SMN2* powoduje, że rejon ten przestaje być rozpoznawany jako eksonowy wzmacniacz składania, co zaburza wykrywanie granicy eksonu 7. Ponadto, w intronie 7 genu *SMN2* aktywny jest intronowy wyciszacz składania (oznaczany symbolem ISS-N1) [17]. Prowadzi to do wykluczenia eksonu 7 z dojrzałego transkryptu. Syntetyzowane jest zatem krótsze białko SMN (oznaczane jako SMNΔ7), które pozbawione jest fragmentu kodowanego przez ekson 7. Białko to ulega szybkiej degradacji. Taki wzór składania nie jest jednak w pełni wydajny. Okazuje się bowiem, że około 10% dojrzałych transkryptów powstających na bazie sekwencji *SMN2* zawiera ekson 7. Taki wariant mRNA prowadzi do powstania białka pełniącego taką samą funkcję jak produkt genu *SMN1* (rycina 3). Pacjenci z SMA różnią się liczbą kopii genu *SMN2*. Im więcej jego kopii, tym przebieg choroby jest łagodniejszy, ponieważ powstaje więcej funkcjonalnego białka SMN [16].

Odkrycie istnienia genu *SMN2*, który ulegając alternatywnej obróbce może generować syntezę niewielkich ilości funkcjonalnego białka SMN, otworzyło drogę terapiom molekularnym, które przywracają ekspresję funkcjonalnego SMN. Dzieje się to poprzez nasilenie tej ścieżki alternatywnego składania *SMN2*, która prowadzi do włączenia eksonu 7 w dojrzały transkrypt. Wykorzystuje się w tym celu dwie odmienne strategie modulacji. Pierwsza oparta jest o użycie antysensownych oligonukleotydów, które działają poprzez wiązanie na zasadzie komplementarności i blokowanie intronowego wyciszacza składania ISS-N1 w intronie 7.

Z kolei skuteczność drobnocząsteczkowych leków wynika zarówno z oddziaływania z elementami cis, jak i oddziaływania na elementy regulatorowe trans, choć mechanizmy działania tych związków nie zawsze zostały do tej pory dokładnie określone. W wyniku zastosowania takiej formy leczenia, ta ciężka, i nierzadko śmiertelna choroba zostaje przekształcona w chorobę przewlekłą o znacznie łagodniejszym przebiegu [15].

Inną, przełomową strategią leczenia przyczynowego SMA było opracowanie terapii genowej, której celem jest wprowadzenie sekwencji genu *SMN1* do komórek organizmu [16]. Preparat Zolgensma, okrzyknięty najdroższym lekiem na świecie, wykorzystuje jako wektor do przenoszenia DNA wiriony niepatogennego wirusa towarzyszącego adenowirusom AAV9, do którego wprowadzono sekwencję cDNA genu *SMN1*, usuwając przy tym genom wirusa. Wektor wprowadza sekwencję genu do jądra komórek, w tym – motoneuronów, co umożliwia w nich produkcję białka SMN. Materiał genetyczny nie integruje się z genomem jądrowym (nie wbudowuje się do chromosomów), a zatem długoterminowa synteza białka SMN możliwa jest tylko w dzielących się komórkach [20]. Lek ten stosowany jest w postaci jednorazowego podania dożylnego, jednak wyłącznie u pacjentów poniżej 2 roku życia.

Oligonukleotydowe przełączniki składania RNA

Antysensowne oligonukleotydy (ASO) są krótkimi (zwykle o długości 15–30 nukleotydów), jednociowymi cząsteczkami chemicznie modyfikowanych kwasów nukleinowych, które na zasadzie komplementarności rozpoznają i wiążą docelowe sekwencje w RNA [21]. Aby ekson 7 pojawił się w dojrzałym transkrypcie *SMN2*, konieczne jest zablokowanie działania intronowego wyciszacza składania. Antysensowne oligonukleotydy rozpoznają na zasadzie komplementarności zasad azotowych właśnie ten fragment pre-mRNA *SMN2* i sterycznie blokują jego rozpoznanie przez odpowiednie białka. Uniemożliwia to utworzenie kompleksu, który hamowałby detekcję granicy ekson/intron. W konsekwencji granica między eksonem 7 i intronem 7 jest wykrywana, co skutkuje włączeniem eksonu 7 do dojrzałego transkryptu (**rycina 3**). Opracowano przynajmniej kilka oligonukleotydów, które stymulowały syntezę funkcjonalnego białka SMN na drodze opisanego wyżej mechanizmu [13]. Jeden z nich, nusinersen, został dopuszczony do leczenia SMA zarówno w Europie, jak i USA. Przed podaniem leku konieczne jest potwierdzenie delekcji odcinka chromosomu 5q, w którym obecny jest gen *SMN1* [22].

Rycina 3. Schemat składania pre-mRNA *SMN2*. Dominująca ścieżka składania, wynikająca z obecności reszty tyminy (T) w pozycji 6 sekwencji eksonu 7 oraz z obecności sekwencji ISS-N1 w intronie 7, prowadzi do powstania cząsteczki mRNA pozbawionej eksonu 7, i w konsekwencji do syntezy białka SMAΔ7. W dolnej części zobrazowano mechanizm działania nusinersenu, który na zasadzie komplementarności wiąże odcinek ISS-N1, znosząc tym samym jego hamujący wpływ na utworzenie kompleksu składającego na granicy eksonu 7 z intronem 7.

Figure 3. Schematic presentation of *SMN2* splicing. The prevailing mode of splicing, resulting from the presence of thymine residue (T) in position 6 of the sequence of exon 7 and the presence of ISS-N1 sequence in intron 7, leads to the exclusion of exon 7 from mRNA and the production of shortened SMAΔ7 protein. The lower part depicts the mechanism of action of nusinersen, which binds ISS-N1 sequence by base-pair complementarity and abolishes the inhibition of spliceosome formation at exon 7 and intron 7 boundary.

Nusinersen jest 18-mercym oligonukleotydem, w którym zmodyfikowano chemicznie szkielet cukrowo-fosforanowy [17]. W celu zwiększenia stabilności cząsteczki, w miejsce grup fosforanowych wprowadzono grupy tiofosforanowe (**rycina 4**), co zmniejsza wrażliwość na degradację enzymatyczną przez nukleazy obecne w płynach biologicznych. Ponadto, pierścień rybozy został zmodyfikowany w pozycji 2' przez wprowadzenie ugrupowania 2-metoksyetylowego, co niweluje rozpoznawanie dupleksu utworzonego przez nusinersen i pre-mRNA *SMN2* przez enzym rybonukleazę H, co skutkowałoby rozkładem pre-mRNA

Rycina 4. Budowa chemiczna oligonukleotydów. Po lewej przedstawiono fragment cząsteczki nusinersenu. W górnej części przedstawiono ogólny wzór budowy eteplirsenu. W ramce umieszczono schemat budowy cząsteczki RNA. Poniżej przedstawiono ogólnie strukturę chemiczną nukleotydów zawierających zmodyfikowane reszty rybozy – z grupą metoksyłową w pozycji 2' oraz z wewnętrznym mostkiem metylenowym (ang. *locked nucleic acids*, LNA) B oznacza zasadę azotową.
Źródło: wikimedia.com (zmodyfikowane).

Figure 4. The chemical structure of oligonucleotides. A fragment of nusinersen molecule is shown on the left. The general structure of eteplirsen is shown in the upper-right panel. The structure of RNA is shown in the frame. Underneath, the structure of oligonucleotides containing a modified ribose ring is shown: oligos methoxylated at position 2' (2'OMe) or locked nucleic acids (LNA). B stands for base. Source: wikimedia.com (with modifications).

i zahamowaniem syntezy białka SMN. Nusinersen *in vivo* zwiększa poziom funkcjonalnego białka SMN, przez co zmniejsza degenerację neuronów w rdzeniu kręgowym. Powoduje znaczące spowolnienie lub wręcz zahamowanie progresji choroby. Co więcej, część pacjentów uzyskuje wskaźniki rozwoju motorycznego, takie jak na przykład samodzielne siedzenie lub chodzenie, które byłyby niemożliwe

do uzyskania przy braku leczenia. Lek wykazywał skuteczność we wszystkich typach SMA (nie testowano leku w typie 0) [23]. Obecnie prowadzone są badania kliniczne w grupie pacjentów presymptomatycznych, u których testami genetycznymi potwierdzono delecję *SMN1* oraz obecność dwóch/trzech kopii *SMN2*, a co za tym idzie, u których rozwinie się SMA typu 1 lub 2. Uważa się, że

wcześniejsze podanie leku może skuteczniej niwelować lub opóźniać objawy choroby, znacząco zwiększając szanse bardziej prawidłowego rozwoju. Choć badanie nie zostało jeszcze zakończone, zaobserwowano już u dzieci pozytywny wpływ na rozwój motoryczny, w tym uzyskanie zdolności do samodzielnego siedzenia czy zdolności chodzenia, które nie mogłyby rozwinąć się u nieleczonych dzieci z SMA typu 1/2 [18].

Nusinersen podawany jest w postaci roztworu (12 mg w 5 ml) poprzez nakłucie lędźwiowe, dooponowo, bezpośrednio do płynu mózgowo-rdzeniowego. Podanie dożylnie jest nieskuteczne, ze względu na nikłą penetrację nusinersenu przez barierę krew-mózg. Ze względu na drogę podania, preparat prawdopodobnie nie wykazuje istotnego działania farmakologicznego poza ośrodkowym układem nerwowym. Lek wykazuje bardzo długi czas półtrwania w płynie mózgowo-rdzeniowym (około 150 dni). Po przeniknięciu do krwi, nusinersen eliminowany jest przez nerki. Pierwsze cztery dawki leku (dawki wysycające) podawane są w stosunkowo krótkich odstępach czasu (w 1., 15., 29. i 64. dniu), po czym, co cztery miesiące, podawane są dawki podtrzymujące. Szacunkowy koszt jednej dawki leku to 125 tysięcy USD. Lek może wywoływać małopłytkowość. Istnieje także podwyższone ryzyko uszkodzenia nerek [18].

Drobnocząsteczkowe MAS

Znacząca korzyść terapeutyczna ze stosowania nusinersenu wynika głównie z jego działania redukującego objawy powiązane z degeneracją motoneuronów w OUN. Białko SMN syntetyzowane jest jednak w mniejszych ilościach we wszystkich tkankach organizmu. Potencjalnym ograniczeniem nusinersenu jest zatem niemożność modulacji objawów obwodowych (np. sercowo-naczyniowych) SMA [24]. Korzystne byłoby zatem opracowanie doustnych preparatów o działaniu systemowym, przenikających do OUN [17, 25]. Przeprowadzono szeroko zakrojony skrining drobnocząsteczkowych substancji chemicznych, który umożliwił wyłonienie struktur chemicznych, które nasilały włączanie eksonu 7 podczas składania RNA SMN2. Zaskakujące było odkrycie, że drobnocząsteczkowe związki chemiczne mogą wykazywać wysoką wybiórczość, wpływając na modulację składania RNA tylko jednego lub kilku genów, spośród wielu tysięcy genów ulegających ekspresji w komórkach [26]. Zmieniło to też sposób myślenia o spektrum możliwych celów molekularnych dla drobnocząsteczkowych związków chemicznych. Większość leków stanowią inhibitory białek enzymatycznych lub receptorów. Okazało się jednak, że możliwe jest pozyskanie wybiórczych modulatorów oddziaływać

w kompleksach RNA-RNA i RNA-białko [27]. Jak na razie jednak, wiedza na temat struktury przestrzennej takich kompleksów jest zbyt mała, aby możliwe było jej wykorzystanie do racjonalnego projektowania potencjalnych leków działających poprzez taki mechanizm.

Risdiplam (**rycina 5**), rozwijany przez firmę Roche i Fundację SMA, jest pochodną związku RG7800, którą zoptymalizowano pod względem selektywności oraz parametrów farmakodynamiczno-farmakokinetycznych [25, 28]. Ten lek eksperymentalny wykazuje wysoką wybiórczość modulacji składania RNA względem transkryptu SMN2, choć może wpływać na alternatywne składanie niewielkiej puli innych genów, np. *FOXM1* czy *STRN3*. Risdiplam wiąże się z transkryptem SMN2 w dwóch miejscach – w miejscu sekwencji ESE w eksonie 7 oraz w miejscu donorowym intronu 7, przez co nasila jego rozpoznanie i wiązanie przez U1 snRNP [27]. Dzięki temu ekson 7 nie zostaje wycięty z transkryptu i syntetyzowane może być pełne białko SMN.

Risdiplam nie jest substratem dla białka transportowego MDR1, a co za tym idzie, dobrze

Rycina 5. Wzory chemiczne drobnocząsteczkowych modulatorów wymienionych w tekście.

Figure 5. The chemical structure of small molecule modulators of alternative splicing mentioned in the text.

przenika przez barierę krew-mózg. Jego stężenie w płynie mózgowo-rdzeniowym jest porównywalne ze stężeniem wolnego leku w krwi. Ponadto, lek dobrze penetruje do tkanek obwodowych. W badaniu klinicznym w grupie pacjentów z SMA typu 2 i 3 risdiplam powodował ponad dwukrotny wzrost stężenia białka SMN w krwi. Wcześniej, w modelach zwierzęcych ustalono, że wzrost stężenia SMN w krwi odzwierciedla jego wzrost w mózgu i mięśniach. W badaniach klinicznych, u około 60% pacjentów odnotowano poprawę funkcji motorycznych po 12 miesiącach stosowania preparatu [29]. Choć ostateczne wyniki testów klinicznych nie zostały jeszcze ogłoszone, to częściowe sprawozdania wskazują na dobrą skuteczność risdiplamu.

Branaplam (**rycina 5**), opracowany przez firmę Novartis, jest kolejnym eksperymentalnym dostępnym, przenikającym przez barierę krew-mózg, preparatem modyfikującym składanie SMN2 i zwiększającym poziom białka SMN. Branaplam również nasila wiązanie kompleksu U1 snRNP do miejsca składania na granicy eksonu 7 i intronu 7 SMN2 [30]. Aktualnie prowadzone są badania kliniczne, które mają zweryfikować jego skuteczność w terapii SMA.

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a

Dystrofia mięśniowa Duchenne'a (DMD) jest recesywną chorobą genetyczną sprzężoną z chromosomem X, co powoduje, że występuje prawie wyłącznie u chłopców. DMD jest chorobą nieuleczalną [6]. Aktualnie, w celu spowolnienia progresji choroby, stosowane są m.in. kortykosteroidy. Poszukuje się wciąż skuteczniejszych form leczenia. Przyczyną DMD są mutacje w genie *DMD*, złożonym z 79 eksonów, i kodującym mięśniowe białko strukturalne dystrofina. Włókna mięśniowe pozbawione dystrofiny ulegają łatwiej uszkodzeniu, co stopniowo prowadzi do utraty ich funkcji. Stwierdzono wiele różnych mutacji, które prowadzą do rozwoju DMD [31–33]. Często dochodzi do delecji fragmentu genu. Rzadziej występują mutacje nonsensowne, wprowadzające przedwczesny kodon stop w transkrypcie, przez co powstaje zbyt krótkie białko. Te z delecji, które powodują zmianę ramki odczytu (przesunięcie w odczytywaniu trójek nukleotydów tworzących kodony) prowadzą zwykle do rozwoju cięższych objawów (właściwej dystrofii mięśniowej Duchenne'a). Z kolei delecje, które nie zmieniają ramki odczytu, prowadzą do rozwoju łagodniejszej postaci dystrofii mięśniowej, zwanej dystrofią Beckera. Dzieje się tak, ponieważ syntetyzowana wtedy dystrofina, która jest krótsza o fragment, który uległ delecji, może nadal częściowo pełnić swoje funkcje. W przypadku zmiany ramki odczytu syntetyzowane jest natomiast nieprawidłowe białko, które

nie spełnia swojej roli [31]. W przypadku około połowy pacjentów delecje pojawiają się w obrębie regionu obejmującego eksony 45–55. U pacjentów z DMD wywołaną delecjami prowadzącymi do zmiany ramki odczytu można zastosować strategię pomijania zmutowanego eksonu w trakcie składania pre-mRNA, co ma na celu przywrócenie właściwej ramki odczytu w trakcie translacji. Taka strategia terapeutyczna ma zatem na celu przekształcenie dystrofii mięśniowej Duchenne'a w łżejszą postać dystrofii Beckera. Strategia pomijania tylko jednego eksonu jest potencjalnie skuteczna u około 70% chorych z delecjami. U około 10% pacjentów konieczne jest pominięcie dwóch eksonów. Konieczne jest wtedy zastosowanie dwóch odrębnych oligonukleotydów, co wykazuje mniejszą wydajność *in vivo* [32]. Ze względu na duże spektrum mutacji, u różnych pacjentów skuteczne będą leki, które indukują pominięcie różnych eksonów, w zależności od lokalizacji mutacji w sekwencji genu. W celu indukcji pomijania eksonu, zastosować można ASO, które będą oddziaływać z miejscem donorowym lub akceptorowym na granicy ekson/intron, lub będą sterycznie blokować motyw ESE, przez co nie dojdzie do utworzenia kompleksu składającego na granicy ekson/intron, a ekson zostanie pominięty w trakcie składania pre-mRNA [31, 32].

Eteplirsen jest 30-merycznym oligonukleotydem typu PMO (ang. *phosphorodiamidate morpholino oligonucleotide*), który jest pozbawiony ładunku, ze względu na chemiczne modyfikacje szkieletu (**rycina 4**). Reszty rybozy zostały w PMO zamienione ugrupowaniami morfolinowymi, a zamiast grup fosforanowych znajdują się reszty fosforamidowe [33]. Eteplirsen, poprzez pomijanie eksonu 51, może przywrócić właściwą ramkę odczytu w przypadku około 14% chorych. Lek prowadził u pacjentów do zwiększenia poziomu dystrofiny w mięśniach szkieletowych. W wyniku jego stosowania, zaobserwowano spowolnienie utraty zdolności chodzenia, czy spowolnienie pogorszenia funkcji oddechowych, choć korzyści kliniczne były niejednoznaczne, co spowodowało, że lek został tylko warunkowo dopuszczony do obrotu w USA, a nie został zarejestrowany w Europie. Lek podaje się w postaci iniekcji dożylnych, raz w tygodniu, w dawce 30 mg/kg. Brak ładunku powoduje, że cząsteczki leku słabo wiążą się z białkami osocza, co skutkuje szybką eliminacją z moczem [34]. Być może zwiększenie częstotliwości dawkowania oraz wielkości jednorazowej dawki wpłynęłyby na zwiększenie klinicznej skuteczności eteplirsenu [35].

W trakcie zaawansowanych badań klinicznych znajdują się kolejne antysensowne oligonukleotydy, które wpływają na syntezę dystrofiny, poprzez stymulowanie pomijania eksonu 45 (casimirsen) lub

eksonu 53 (golodirsen) [31]. Ocena skuteczności klinicznej leków z tej grupy napotyka trudności metodologiczne, nie tylko ze względu na niedoskonałość wskaźników pomiarowych umożliwiających ilościową ocenę stanu motorycznego pacjentów. Wynika to również z faktu, że celem tej formy leczenia jest indukowanie zmiany fenotypu chorobowego na łagodniejszy, w którym jednak wciąż obserwuje się występowanie objawów. Ważnym czynnikiem ograniczającym skuteczność ASO stosowanych w leczeniu DMD jest utrudniona dystrybucja leku, związana z istnieniem dużej liczby mięśni w ciele człowieka oraz ze zbyt słabą penetracją leku do tkanki mięśniowej [32].

Co ciekawe, drisapersen, zbliżony do eteplirsenu antysensowny oligonukleotyd indukujący pomijanie eksonu 51, okazał się nieskuteczny w badaniach klinicznych. Oba preparaty różni m.in. budowa chemiczna szkieletu cząsteczki. Drisapersen jest pochodną tiofosforanową, posiadającą reszty rybozy podstawione w pozycji 2' grupą metoksyłową (2'OMe), zaś eteplirsen należy do grupy PMO [31]. Pokazuje to, jak kluczowe znaczenie dla stabilności, toksyczności i działania farmakologicznego antysensownych oligonukleotydów odgrywają modyfikacje szkieletu cukrowo-fosforanowego w cząsteczce. W związku z tym, duży nacisk kładzie się obecnie na zidentyfikowanie najbardziej optymalnych modyfikacji chemicznych, które będą warunkować nie tylko trwałość, wybiórczość i siłę działania, ale również będą poprawiać dystrybucję cząsteczek ASO w organizmie człowieka. Obiecujące wyniki uzyskano na przykład dla stereochemicznie homogennych ASO [31]. W przypadku PMO poprawę wchłaniania oligonukleotydów do komórek i tkanek zaobserwowano dla koniugatów PMO z peptydami [32]. Bada się także zastosowanie nanonośników dla ASO. Przykładowo, nanocząsteczki zbudowane z polimetylometakrylanu (PMMA) wypełnione ASO ze szkieletem tiofosforanowym i zmodyfikowanymi resztami rybozy (2'OMe) znacząco zwiększały poziom dystrofiny w mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym u myszy [2]. Nadzieje wiąże się także z zastosowaniem nowych modyfikacji chemicznych szkieletu cukrowo-fosforanowego. Zablockowane kwasy nukleinowe (ang. *locked nucleic acids*, LNA) charakteryzują się obecnością zmodyfikowanej reszty rybozy, wewnątrz której występuje mostek metylenowy łączący atom tlenu z grupy hydroksylowej w pozycji 2' z atomem węgla w pozycji 4' pierścienia (**rycina 4**). Nadaje to LNA sztywną konformację, przez co cechują się one bardzo dużym powinowactwem i siłą wiązania do RNA, dzięki czemu możliwe jest stosowanie krótszych oligomerów, tzw. mikrosmerów, w których część nukleotydów ma budowę LNA, a część posiada reszty 2'OMe rybozy [24].

Opisane powyżej ASO indukujące pomijanie eksonu mogą wykazać skuteczność tylko u pacjentów z niektórymi typami mutacji wywołujących DMD. Inne typy mutacji wymagają zastosowania odmiennych strategii molekularnych. Ataluren (Translarna) (**rycina 5**) jest drobnocząsteczkowym lekiem stosowanym w leczeniu tych pacjentów z DMD, u których przyczyną choroby są nonsensowne mutacje skutkujące wprowadzeniem przedwczesnego kodonu stop. Takie mutacje powodują przedwczesną terminację syntezy białka dystrofiny, przez co nie powstaje funkcjonalne białko. Przed rozpoczęciem podawania leku konieczne jest przeprowadzenie badań genetycznych w celu potwierdzenia występowania tego typu mutacji. Ataluren umożliwia translację pełnej sekwencji mRNA, pomimo obecności przedwczesnego kodonu stop [31]. Ataluren wyraźnie spowalnia utratę zdolności motorycznych, w tym utratę chodzenia, u pacjentów z DMD. Dla osiągnięcia skuteczności, preparat musi być dawkowany trzy razy dziennie.

Inne choroby neurodegeneracyjne

Zaburzenia składania RNA obserwuje się w szeregu chorób neurodegeneracyjnych, takich jak np. stwardnienie zanikowe boczne, choroba Alzheimera czy otępienie czołowo-skroniowe [1]. Przykładowo, najnowsze badania pokazały, że jedna z form otępienia czołowo-skroniowego jest związana z mutacją w genie *MAPT*, kodującym białko Tau, które ważne jest dla stabilizacji mikrotubul w komórkach. *MAPT* ulega alternatywnemu składaniu, które polega na pomijaniu eksonu 10 pod wpływem sekwencji ISS znajdującej się w sąsiadującym intronie. Mutacje zakłócające działanie ISS powodują dominację dłuższej formy transkryptu, co zaburza funkcję Tau, która zależy od właściwego stosunku obu form białka. Prowadzi to do powstawania złożeń Tau i degeneracji neuronów. W modelach eksperymentalnych do przywrócenia pomijania eksonu 10 wykorzystano nowe możliwości edycji sekwencji kwasów nukleinowych, jakie daje technika CRISPR/Cas [8]. Jest jednak zdecydowanie za wcześnie, aby można było stwierdzić, czy ta obiecująca technologia okaże się skuteczna klinicznie.

Choroby nowotworowe

Choroby nowotworowe są wynikiem złożonego procesu związanego z kumulacją mutacji w genach supresorowych, protoonkogenach i innych genach regulatorowych, które skutkują przede wszystkim nadmierną proliferacją komórek, niewrażliwością na sygnały indukujące apoptozę i zaburzeniami przebiegu tego procesu. Obecnie wiele wiadomo także na temat znaczenia deregulacji

alternatywnego składania genów w przebiegu kan- cerogenezy [36, 37]. Zaobserwowano na przykład, że inaktywacja genów supresorowych nierzadko wynika z zatrzymania sekwencji intronu w doj- rzałym transkrypcie [38]. W wielu typach nowo- tworów wykrywa się mutacje zarówno w genach kodujących czynniki splicingowe (czynniki trans), jak i mutacje sekwencji cis regulatorowych, co pro- wadzi do zmiany wzorca składania genów kluczo- wych dla zachowania homeostazy komórkowej [7, 37, 39].

W przypadku wielu genów, proces alterna- tywnego składania pre-mRNA prowadzi do syn- tezy białek o odmiennej lub wręcz przeciwstaw- nej funkcji. Co ciekawe, w nowotworach obserwuje się często zaburzenie równowagi ilościowej między różnymi alternatywnymi formami transkryptów genów supresorowych, protoonkogenów i innych genów regulatorowych. Przykładowo, składanie pre-mRNA genu *Bcl-x* prowadzić może do syn- tezy krótszego (*Bcl-xS*) lub dłuższego (*Bcl-xL*) wariantu mRNA, przy czym *Bcl-xS* wykazuje dzia- łanie proapoptotyczne, zaś *Bcl-xL* – antyapopto- tyczne. W nowotworach piersi, płuc czy jelita gr- bego, obserwuje się podwyższony poziom *Bcl-xL*, co skutkuje zmniejszoną podatnością do induk- cji programowanej śmierci komórki, a tym samym nasiloną przeżywalnością komórek. W różnych modelach eksperymentalnych skuteczność prze- ciwnowotworową wykazywały oligonukleotydy, które indukowały pomijanie eksonu 2 w trakcie składania pre-mRNA *Bcl-x*, co nasilało syntezę *Bcl-xS* [7, 36].

Nieprawidłowości w procesie składania pre- mRNA, które wynikają z nadmiernej ekspre- sji białkowych czynników trans w nowotworach, stwarzają pole do poszukiwania terapeutycznych inhibitorów tych białek. Jak do tej pory, odno- towano mutacje i/lub nadekspresję m.in. białek SRSF1, SRSF2, SRSF6, U2AF1 czy HnRNPA1 i A2 [9, 10]. Spliceostatynę A oraz pladienolid B ziden- tyfikowano w trakcie skriningu w poszukiwaniu związków o działaniu przeciwnowotworowym [1]. Okazało się, że oba związki są inhibitorami czynnika splicingowego SF3B1, który jest jednym ze skład- ników kompleksu U2 snRNP, odpowiedzialnego za rozpoznawanie miejsca rozgałęzienia w intro- nie. Ich działanie opiera się zatem o niespecyficzną genowo modulację alternatywnego składania RNA na drodze zaburzenia wczesnych etapów tworzenia kompleksu składającego [10]. Aktywujące mutacje genu kodującego SF3B1 wykrywa się między innymi u pacjentów z zespołem mielodysplastycznym, przewlekłą białaczką limfocytową czy nowotwo- rami piersi [37]. Związek E7107 (**rycina 5**), który jest pochodną pladienolidu B, wykazywał skutecz- ność w mysich modelach ostrej białaczki szpikowej

oraz został poddany pierwszej fazie badań klinicz- nych w grupie pacjentów z nowotworami. Odno- towano, zależne od dawki, odwracalne zahamowa- nie składania genów w komórkach krwi obwodowej pacjentów, jednak badań nie kontynuowano, ze względu na obserwowane poważne działania nie- pożądane (utrata wzroku) u niewielkiego odsetka pacjentów [40]. Inne inhibitory SF3B1, należące do grupy sudemycyn, cechujące się większą sta- bilnością chemiczną oraz silniejszym działaniem, również skutecznie modulowały składanie genów w eksperymentalnych modelach nowotworów. Opracowano także inne inhibitory SF3B1, takie jak H3B-8800 czy herboksydieny, których dzia- łanie przeciwnowotworowe jest aktualnie weryfi- kowane [1].

Aktywność czynników trans splicingowych jest regulowana w komórkach między innymi na drodze ich potranslacyjnej fosforylacji. Odpowie- dzialne za to są kinazy z grupy CLK i SRPK, któ- rych aktywność również ulega rozregulowaniu w nowotworach, np. SRPK1 ulega nadekspresji w wielu typach nowotworów. Opracowano drob- nocząsteczkowe substancje hamujące fosforyla- cję czynników splicingowych, poprzez blokowa- nie aktywności białek z rodziny CLK lub SRPK. Inhibitorem CLK1 o działaniu przeciwnowotwo- rowym w modelach *in vitro* jest związek TG003. Z kolei związek SRPIN340 wykazuje działanie antyangiogenne poprzez blokowanie aktywno- ści SRPK1 i SRPK2 [39]. Związki te poddawane są aktualnie badaniom w przedklinicznych modelach eksperymentalnych.

Nie wiadomo jeszcze, jakie zmienne mają wpływ na skuteczność inhibitorów czynników trans w nowotworach. Nie jest na razie do końca jasne, czy leki takie będą skuteczne tylko u pacjentów, u których obecne są mutacje genów kodujących białka splicingowe. Zaobserwowano na przykład, że E7107 wykazywał większą skuteczność wtedy, gdy w komórkach białaczki szpikowej obecna była mutacja *SRSF2* lub *SF3B1* [41]. Ponadto, nie do końca przewidzieć można skutki zaburzenia pro- cesu składania w konkretnym typie komórek. Inhi- bitory z tej grupy wykazują działanie plejotropowe, ponieważ wpływają na składanie wielu różnych pre-mRNA, a ich skuteczność może być związana z kumulacją nieprawidłowych transkryptów róż- nego typu.

Podsumowanie

Do niedawna celami farmakologicznymi były niemal wyłącznie cząsteczki białek enzymatycznych i receptorowych, co znacząco ograniczało liczbę możliwych celów molekularnych [35]. Najnowsze zdobycze biologii molekularnej dają coraz więcej

możliwości ingerencji we wcześniejsze etapy procesu prowadzącego ostatecznie do syntezy białka. Pomimo wiedzy na temat zakresu zmian w profilu ekspresji genów, które obserwuje się w przebiegu wielu chorób, do niedawna nie udawało się opracować skutecznych metod terapii, które wpływałyby bezpośrednio na proces ekspresji informacji genetycznej. Zdobywcze chemii medycznej, które umożliwiły udoskonalenie właściwości terapeutycznych oligonukleotydów, wzbudziły ponowne zainteresowanie tą grupą terapeutyków. Jednocześnie, coraz lepsze rozumienie mechanizmów regulacji ekspresji genów stopniowo umożliwia jej wykorzystanie do wdrożenia nowych strategii terapeutycznych. Modułacja alternatywnego składania RNA daje nadzieję nie tylko na przełączanie między możliwymi formami transkryptów (jak w przypadku np. nusinersenu), ale umożliwia także naprawę nieprawidłowości występujących w sekwencji genów. Technologia SMaRT została opracowana w celu umożliwienia transkądania RNA. Oligonukleotyd umożliwiający składanie w układzie trans zawiera fragment komplementarny do odcinka 3' intronu w docelowym pre-mRNA. Fragment ten zawiera także miejsce rozgałęzienia i trakt polipirymidynowy, sam pełni więc funkcję intronu. Dołączony jest do niego fragment eksonu, który ma zostać wbudowany do składanego transkryptu zamiast zmutowanego fragmentu eksonu. W przeciwieństwie do terapii genowej, która ma na celu wprowadzenie całej sekwencji brakującego genu do komórki, technologia SMaRT daje możliwość wymiany eksonu zawierającego defekt na jego prawidłową wersję. W rezultacie pojawia się możliwość syntezy prawidłowego białka na bazie naprawionego mRNA. Technologia SMaRT została wykorzystana do naprawy zmutowanej wersji *CFTR* charakterystycznej dla chorych na mukowiscydozę, a także do modyfikacji *MAPT*, którego mutacje prowadzą do tauopatii, m.in. otępienia czołowo-skroniowego [2].

Na podstawie dynamicznego rozwoju wiedzy na temat znaczenia zaburzeń składania RNA w chorobach i możliwości ingerowania w jego przebieg, spodziewać się można, że w najbliższych latach do leczenia wprowadzone zostaną kolejne leki, będące oligonukleotydowymi lub drobnocząsteczkowymi mulatorami alternatywnego składania RNA.

Podziękowania

Marcin Skalski oraz Jakub Szymarek uprzejmie zgodzili się zapoznać się z tekstem artykułu na ostatnim etapie jego powstawania. Bardzo dziękuję za ich uwagi.

Otrzymano: 2019.10.25 · Zaakceptowano: 2019.11.09

Piśmiennictwo

- Montes M, Sanford BL, Comiskey DF, Chandler DS. RNA Splicing and Disease: Animal Models to Therapies. *Trends Genet.* 2019; 35: 68–87. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.10.002>.
- Suñé-Pou M, Prieto-Sánchez S, Boyero-Corral S, Moreno-Castro C, El Yousfi Y, Suñé-Negre J, et al. Targeting Splicing in the Treatment of Human Disease. *Genes* 2017; 8: 87. <https://doi.org/10.3390/genes8030087>.
- Grzybowska EA. Human intronless genes: functional groups, associated diseases, evolution, and mRNA processing in absence of splicing. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012; 424: 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.06.092>.
- Wysokiński D, Błasiak J. Perspektywy wykorzystania interferencji RNA w terapii chorób związanych z zaburzeniami alternatywnego składania RNA. *Postępy Hig Med Dosw.* 2012; 66: 683–695.
- Kataoka N. Modulation of aberrant splicing in human RNA diseases by chemical compounds. *Hum Genet.* 2017; 136: 1237–1245. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1789-4>.
- Zhao S. Alternative splicing, RNA-seq and drug discovery. *Drug Discov Today* 2019; 24: 1258–1267. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2019.03.030>.
- Wisnomska H, Piekietko-Witkowska A, Nauman A. Zaburzenia różnicowego składania pierwotnego transkryptu w kancerogenezie. *Postępy Biochem* 2011; 57: 257–265.
- Lipscombe D, Lopez Soto EJ. Alternative splicing of neuronal genes: new mechanisms and new therapies. *Curr Opin Neurobiol.* 2019; 57: 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2018.12.013>.
- Ding X, Liu S, Tian M, Zhang W, Zhu T, Li D, et al. Activity-induced histone modifications govern Neurexin-1 mRNA splicing and memory preservation. *Nat Neurosci.* 2017; 20: 690–699. <https://doi.org/10.1038/nn.4536>.
- Cheng T-L, Chen J, Wan H, Tang B, Tian W, Liao L, et al. Regulation of mRNA splicing by MeCP2 via epigenetic modifications in the brain. *Sci Rep.* 2017; 7: 42790. <https://doi.org/10.1038/srep42790>.
- Sierakowska H, Sambade MJ, Agrawal S, Kole R. Repair of thalassemic human γ -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci.* 1996; 93: 12840–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.23.12840>.
- Kole R, Krainer AR, Altman S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat Rev Drug Discov.* 2012; 11: 125–140. <https://doi.org/10.1038/nrd3625>.
- Bennett CF, Krainer AR, Cleveland DW. Antisense Oligonucleotide Therapies for Neurodegenerative Diseases. *Annu Rev Neurosci.* 2019; 42: 385–406. <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-070918-050501>.
- Hoy SM. Nusinersen: First Global Approval. *Drugs* 2017; 77: 473–479. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0711-7>.
- Aartsma-Rus A, Krieg AM. FDA Approves Eteplirsen for Duchenne Muscular Dystrophy: The Next Chapter in the Eteplirsen Saga. *Nucleic Acid Ther.* 2017; 27: 1–3. <https://doi.org/10.1089/nat.2016.0657>.
- Jędrzejowska M, Kostera-Pruszczyk A. Rdzeniowy zanik mięśni – nowe terapie, nowe wyzwania. *Neurol Dziecięca* 2017; 26: 11–17. <https://doi.org/10.20966/chn.2017.52.400>.
- Meijboom K, Wood M, McCreary G. Splice-Switching Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *Genes* 2017; 8: 161. <https://doi.org/10.3390/genes8060161>.
- Neil EE, Bisaccia EK. Nusinersen: A Novel Antisense Oligonucleotide for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy. *J Pediatr Pharmacol Ther.* 2019; 24: 194–203. <https://doi.org/10.5863/1551-6776-24.3.194>.
- Lorson CL, Rindt H, Shababi M. Spinal muscular atrophy: mechanisms and therapeutic strategies. *Hum Mol Genet.* 2010; 19: R111–8. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq147>.
- Rao VK, Kapp D, Schroth M. Gene Therapy for Spinal Muscular Atrophy: An Emerging Treatment Option for a Devastating Disease. *J Manag Care Spec Pharm.* 2018; 24: S3–16. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2018.24.12-a.s3>.
- Havens MA, Hastings ML. Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: 6549–6563. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw533>.
- Hoy SM. Nusinersen: A Review in 5q Spinal Muscular Atrophy. *CNS Drugs* 2018; 32: 689–696. <https://doi.org/10.1007/s40263-018-0545-1>.
- Gidaro T, Servais L. Nusinersen treatment of spinal muscular atrophy: current knowledge and existing gaps. *Dev Med Child Neurol.* 2019; 61: 19–24. <https://doi.org/10.1111/dmcn.14027>.
- Wood MJA, Talbot K, Bowerman M. Spinal muscular atrophy: antisense oligonucleotide therapy opens the door to an integrated therapeutic landscape. *Hum Mol Genet.* 2017; 26: R151–9. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx215>.

25. Ratni H, Ebeling M, Baird J, Bendels S, Bylund J, Chen KS, et al. Discovery of Risdiplam, a Selective Survival of Motor Neuron-2 (SMN2) Gene Splicing Modifier for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J Med Chem*. 2018; 61: 6501–6517. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b00741>.
26. Taladriz-Sender A, Campbell E, Burley GA. Splice-switching small molecules: A new therapeutic approach to modulate gene expression. *Methods* 2019; 167: 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.06.011>.
27. Sivaramakrishnan M, McCarthy KD, Campagne S, Huber S, Meier S, Augustin A, et al. Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Commun*. 2017; 8: 1476. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01559-4>.
28. Kletzl H, Marquet A, Günther A, Tang W, Heuberger J, Groeneveld GJ, et al. The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 2019; 29: 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2018.10.001>.
29. Poirier A, Weetall M, Heinig K, Bucheli F, Schoenlein K, Alsenz J, et al. Risdiplam distributes and increases SMN protein in both the central nervous system and peripheral organs. *Pharmacol Res Perspect*. 2018; 6: e00447. <https://doi.org/10.1002/prp2.447>.
30. Cheung AK, Hurley B, Kerrigan R, Shu L, Chin DN, Shen Y, et al. Discovery of Small Molecule Splicing Modulators of Survival Motor Neuron-2 (SMN2) for the Treatment of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *J Med Chem*. 2018; 61: 11021–11036. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.8b01291>.
31. Shimizu-Motohashi Y, Komaki H, Motohashi N, Takeda S, Yokota T, Aoki Y. Restoring Dystrophin Expression in Duchenne Muscular Dystrophy: Current Status of Therapeutic Approaches. *J Pers Med*. 2019; 9: 1. <https://doi.org/10.3390/jpm9010001>.
32. Niks EH, Aartsma-Rus A. Exon skipping: a first in class strategy for Duchenne muscular dystrophy. *Expert Opin Biol Ther*. 2017; 17: 225–236. <https://doi.org/10.1080/14712598.2017.1271872>.
33. Li D, Mastaglia FL, Fletcher S, Wilton SD. Precision Medicine through Antisense Oligonucleotide-Mediated Exon Skipping. *Trends Pharmacol Sci*. 2018; 39: 982–994. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.09.001>.
34. Pitout I, Flynn LL, Wilton SD, Fletcher S. Antisense-mediated splice intervention to treat human disease: the odyssey continues. *F1000Research* 2019; 8: 710. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18466.1>.
35. Yin W, Rogge M. Targeting RNA : A Transformative Therapeutic Strategy. *Clin Transl Sci*. 2019; 12: 98–112. <https://doi.org/10.1111/cts.12624>.
36. Wang B-D, Lee N. Aberrant RNA Splicing in Cancer and Drug Resistance. *Cancers* 2018; 10: 458. <https://doi.org/10.3390/cancers10110458>.
37. Urbanski LM, Leclair N, Anczuków O. Alternative-splicing defects in cancer: Splicing regulators and their downstream targets, guiding the way to novel cancer therapeutics. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2018; 9: e1476. <https://doi.org/10.1002/wrna.1476>.
38. Jung H, Lee D, Lee J, Park D, Kim YJ, Park W-Y, et al. Intron retention is a widespread mechanism of tumor-suppressor inactivation. *Nat Genet*. 2015; 47: 1242–1248. <https://doi.org/10.1038/ng.3414>.
39. Lin J-C. Therapeutic Applications of Targeted Alternative Splicing to Cancer Treatment. *Int J Mol Sci*. 2017; 19: 75. <https://doi.org/10.3390/ijms19010075>.
40. DeNicola AB, Tang Y. Therapeutic approaches to treat human spliceosomal diseases. *Curr Opin Biotechnol*. 2019; 60: 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2019.01.003>.
41. Lee SC-W, Dvinge H, Kim E, Cho H, Micol J-B, Chung YR, et al. Modulation of splicing catalysis for therapeutic targeting of leukemia with mutations in genes encoding spliceosomal proteins. *Nat Med*. 2016; 22: 672–678. <https://doi.org/10.1038/nm.4097>.