Rybozomy i DNazy – budowa molekularna, mechanizm działania i zastosowanie w terapii genowej

Arkadiusz Kazula

Adres do korespondencji: Arkadiusz Kazula, ul. Portowa 18/4, 27-600 Sandomierz, e-mail: Kazula.gen@interia.pl

1. Wstęp

Do lat 80. ubiegłego wieku panowało przekonanie, że enzymy białkowe i ich właściwości katalityczne są uwarunkowane budową polipeptydową. Natomiast cząsteczki RNA były postrzegane jako most łączący DNA, nośnik informacji genetycznej, z białkami, cząsteczkami ważnymi do budowania struktur biologicznych, przekazywania sygnałów czy katalizy podstawowych procesów biochemicznych w komórce. W koncepcji tej cząsteczki RNA pośredniczyły w przekazywaniu informacji genetycznej z DNA na odpowiednią strukturę białek. Poglądy dotyczące roli RNA zostały uzupełnione w latach 80. ubiegłego wieku, kiedy odkryto enzymatyczne cząsteczki RNA o właściwościach katalitycznych [1, 2]. Odkrycie katalitycznego RNA było skutkiem prowadzonych badań nad składaniem (*splicing*) i dojrzewaniem (*maturation*) cząsteczek RNA w komórkach. Pierwsze naturalnie występujące cząsteczki RNA o aktywności katalitycznej zostały opisane u orzęsków *Tetrahymena thermophila*, a były nimi samo wycinające się introny grupy I. Te specyficznie pofalowane cząsteczki RNA wykazują aktywność katalityczną bez białkowego kofaktora [3, 4]. Wkrótce potem odkryto, że komponent rybonukleazy RNAzy P, bez frakcji białkowej, z *E. coli* był w stanie katalizować modyfikowanie prekursorowych cząsteczek tRNA w ich dojrzałe odpowiedniki tRNA [2–5]. Badania powyższe dowiodły, że istnieją cząsteczki RNA, które oprócz swojej podstawowej funkcji w genomie związanej z przenoszeniem informacji genetycznej, posiadają inne właściwości i podobnie jak enzymy mogą katalizować wiele reakcji nukleolitycznych, a przez to dodatkowo wpływać na ekspresję określonych genów. Cząsteczki RNA, które katalizują reakcje chemiczne

Ribozymes and DNAsymes – molecular structure, mechanism action and application in gene therapy

The discovery of catalytic nucleic acids RNA provided scientists with valuable tools for the identification of new therapies for several untreated diseases through down regulation or modulation of endogenous gene expression involved in these ailments. Ribozymes, can be mostly used to down-regulate (by RNA cleavage) or repair (by RNA trans-splicing) unwanted gene expression involved in disease. Because of their high specificity, wide range of target selection and action before protein translation, the different classes of both natural and artificial ribozymes have been claimed to be used as specific suppressors of gene functions with the additional aim of validating disease-related genes as potential targets for new therapeutic interventions. However, the lack of suitable delivery systems in to target cells still hampers the clinical development of ribozyme-based therapeutics. Introduction to different types of ribozymes with a special focus on the hammerhead and hairpin ribozyme, major challenges in the process of developing ribozymes for medical purposes will be described in the present review. DNAsymes, derived by in vitro selection processes are also able to bind and cleave RNA targets and therefore down-regulate gene expression in therapy. Subsequently, examples of ribozymes and DNAsymes applications in animal models for various diseases including cancer, viral infections, rheumatoid arthritis and cardiovascular diseases will be given. This review briefly summarizes the ever increasing evidence to the use of ribozymes as innovative nucleic acid-based enzymes along with their classifications, their mechanism in initiating catalytic effect and their potential pharmaceutical applications and their roles in gene function study and in target validation.

Keywords: catalytic nucleic acids, ribozyme, DNAsyme, hammerhead ribozyme, hairpin ribozyme.

© Farm Pol, 2018, 74(4): 223–246

i zachowują swoją strukturę po zakończeniu przez nich katalizowanej reakcji zostały nazwane rybozymami, podkreślając w ten sposób podobieństwo do

enzymów [3, 6]. Dzięki swojej odpowiedniej strukturze trzeciorzędowej oraz zdefiniowanej sekwencji rybonukleotydowej, rybozomy rozpoznają i hydrolizują wiązania fosfodiesterowe w mRNA oraz są zdolne do katalizowania innych reakcji biochemicznych wewnątrz komórek [7, 8].

Należy podkreślić, że rybozomy są enzymatycznymi cząsteczkami RNA o specyficznej sekwencji nukleotydowej, które katalizują rozszczepianie i inaktywację cząsteczek wirusowego oraz komórkowego RNA, a efektem tego może być hamowanie biosyntezy odpowiednich białek [9]. Cząsteczki rybozomów mają specyficzne centra katalityczne do cięcia RNA [10, 11]. Odkrycie rybozomów o właściwościach katalizujących rozszczepianie innych cząsteczek RNA pobudziło zainteresowanie nad wykorzystaniem tych cząsteczek w terapii [12]. Rybozomy są obecnie najintensywniej badanymi naturalnie występującymi cząsteczkami RNA o funkcjach katalitycznych. Zdolność do specyficznego rozszczepiania określonych sekwencji mRNA może służyć w terapii do hamowania ekspresji zmutowanych i niepożądanych genów oraz do analizy funkcji genów [13]. Oprócz występowania naturalnych cząsteczek rybozomów, konstruuje się sztuczne rybozomy o ściśle określonych strukturach, tak aby rozpoznawały i degradowały odpowiednie cząsteczki RNA w sposób zależny od sekwencji RNA [14]. W badaniach tych szczególnie wykorzystuje się dwa rodzaje rybozomów, tzw. rybozomy o strukturze młotka (*hammerhead*) i rybozomy o strukturze szpilki (*hairpin*). Struktury tych rybozomów są badane ze względu na ich niewielkie rozmiary i wysoką wydajność rozszczepienia cząsteczek RNA [15]. Podobnie jak inne terapeutyczne antysensowne cząsteczki RNA, rybozomy oferują obiecujący potencjał w terapii różnych chorób wrodzonych, zaburzeń metabolicznych oraz zakażeń wirusowych i nabytych chorób, takich jak nowotwory [16, 17]. Obecnie otrzymano kilka rybozomów, które próbuje się wykorzystać w badaniach klinicznych chorób, takich jak AIDS i nowotwory. Badania kliniczne z użyciem rybozomów, ukierunkowane przeciw wirusowi niedoboru odporności typu 1 (HIV-1), wykazały, że rybozym anty-HIV-1 gag, który został dostarczony wewnątrzkomórkowo za pomocą specyficznych wektorów może wpływać hamująco na cykl replikacji i transkrypcji wirusowego RNA (wirusa HIV-1) wewnątrz zainfekowanych komórek [18, 19].

Rozwinięta na początku lat dziewięćdziesiątych metoda selekcji kwasów nukleinowych *in vitro* pozwoliła zidentyfikować kilkadziesiąt cząsteczek enzymatycznego RNA, tzw. nowych rybozomów [3]. Te nowe rybozomy charakteryzują się obecnością wewnątrzcząsteczkowych oddziaływań trzeciorzędowych i katalizują reakcję transestryfikacji RNA, hydrolizy/ligacji RNA, syntezy peptydów, fosorylacji, adenylacji aminokwasów, polimeryzacji RNA, syntezę nukleotydów pirymidynowych i wiele innych [20–25]. Reakcje te są katalizowane bez udziału dodatkowych czynników białkowych. Biorąc pod uwagę wielokierunkowość enzymatycznych właściwości RNA, zadano sobie pytanie, czy jednociowe cząsteczki DNA, w przeciwieństwie do genomowego, dwuniciowego DNA, mogą odgrywać podobną rolę. DNAzy, w odróżnieniu od rybozomów, nie były obserwowane w naturze, cząsteczki tego typu uzyskano w procesach naturalnej selekcji w warunkach *in vitro*, gdzie otrzymano szereg cząsteczek DNA o aktywności enzymatycznej, które katalizują hydrolizę wiązania fosfodiesterowego w substratach DNA i RNA [26, 27]. Katalityczna aktywność i specyficzność rybozomów i DNAzymów¹ została obszernie scharakteryzowana w warunkach *in vitro* i w hodowlach komórkowych. Szeroki zakres modyfikacji chemicznych powyższych cząsteczek pozwolił na syntezę oligonukleotydów *in vivo*, których stabilność jest zbliżona do większości konwencjonalnych leków [27]. W przeglądzie tym przedstawiono badania nad wykorzystaniem rybozomów i DNAzymów, jako innowacyjnych enzymów niebiałkowych, których aktywność i mechanizm działania można wykorzystać do konstrukcji nowych potencjalnie aktywnych terapeutycznie cząsteczek RNA i DNA.

2. Molekularne aspekty aktywności katalitycznej rybozomów

Od czasu odkrycia pierwszego naturalnego rybozomu ponad 30 lat temu, stało się jasne, że kwasy nukleinowe są nie tylko statycznymi cząsteczkami, w których jest magazynowana informacja genetyczna, ale posiadają również intrygujące aktywności katalityczne [28–30]. Właściwości katalityczne cząsteczki RNA zależą od jej konformacji, która ma charakter dynamiczny. Uniwersalność i wielokierunkowość tych katalizatorów popiera hipotezę „zaginionego świata”, w którym kluczową rolę pełnią

¹ Deoksyrybozomy to jednociowe fragmenty DNA o długości około kilkudziesięciu nukleotydów, mające zdolność katalizowania reakcji chemicznych. W większości substratami dla DNAzymów są kwasy nukleinowe, gdzie mamy do czynienia z reakcjami cięcia (poprzez hydrolizę bądź transestryfikację) lub ligacji. Nie wyczerpuje to jednak wszystkich możliwości. Znane są deoksyrybozomy mające zdolność modyfikacji aminokwasów, wykazując aktywność fosfatazy oraz kinazy, jak również takie, które sprzyjają reakcji tworzenia wiązania pomiędzy dwoma atomami węgla (reakcja Dielsa-Aldera). Ciekawym przykładem katalitycznych możliwości DNA jest zdolność użycia światła do naprawy (rozbitcia) dimerów pirymidynowych, powstających na skutek ekspozycji na promieniowanie UV. W przeciwieństwie do fotoliz, analogicznych enzymów białkowych, enzymy DNA nie wykorzystują dinukleotydu flawinoadeninowego (FADH) jako kofaktora. Ponadto niektóre deoksyrybozomy wykazują zdolności autokatalityczne, czego przykładem może być reakcja autofosforylacji, autoadenylacji z wytworzeniem wiązania 5', 5'-trifosforanowego (struktura analogiczna do czapeczki w mRNA).

cząsteczki RNA na długo zanim jeszcze powstały struktury białkowe, co napędza wiele badań nad praktyczną aplikacją tych cząsteczek [30]. Badania aktywności enzymatycznej rybozymów są interesujące z kilku powodów. Po pierwsze, uczestniczą one w ważnych reakcjach, których poznanie jest niezbędne, aby zrozumieć mechanizmy rządzące metabolizmem komórkowym. Po drugie, rybozymy mają zazwyczaj prostszą budowę od enzymów białkowych, składają się bowiem jedynie z czterech rodzajów monomerów, a dodatkowo można lepiej przewidzieć ich strukturę z uwagi na komplementarność wiązań wodorowych typu Watsona-Crika pomiędzy poszczególnymi zasadami (adeniną i uracylem oraz guaniną i cytozyną) [29]. Ponieważ rybozymy są mniej złożone niż enzymy białkowe, mechanizm ich działania powinien być prostszy do rozwikłania. Po trzecie, wykazują one działanie selektywne, co może być wykorzystane w terapii celowanej RNA, choć technika ta jest na razie we wczesnym stadium rozwoju, a jej zastosowanie będzie wymagało rozwiązania problemów związanych m.in. ze stabilnością chemiczną oligorybonukleotydów w środowisku komórkowym, transportem do odpowiedniego miejsca w komórce oraz fałdowaniem do aktywnej konformacji. Cząsteczki rybozymów na poziomie struktury pierwszorzędowej składają się z jednoliciowych łańcuchów poliribonukleotydowych. Poszczególne ich fragmenty mogą jednak łączyć się ze sobą wiązaniami wodorowymi, które wytwarzają się pomiędzy komplementarnymi zasadami (adenina z uracylem i cytozyna z guaniną) [30–35]. Efektem tego jest powstanie rozmaitych motywów strukturalnych, takich jak pętle, wybrzuszenia czy spiniki na skutek powstawania struktury drugorzędowej. Dalsze oddziaływanie tych struktur powoduje powstawanie przestrzennie sfaldowanych struktur trzeciorzędowych. Ponieważ każdy rybonukleotyd niesie ze sobą ładunek ujemny, do odpowiedniego sfaldowania się RNA, tj. powstania prawidłowej (natywnej) struktury trzeciorzędowej rybozemu konieczna jest obecność jonów dodatnich, które będą ekranować elektrostatyczne odpychanie między elementami składowymi łańcucha. W komórce najczęściej funkcję tę spełniają kationy magnezowe lub sodowe. Rybozymy potrafią nie tylko przeorganizować swoje miejsce aktywne, ale także katalizować reakcje poprzez zbliżenie do siebie dwóch substratów [36]. Reakcje katalizowane przez rybozymy obejmują m.in.: transestryfikację (np. rybozym typu *hairpin*), transfer nukleotydu (introny grupy I i II), hydrolizę (RNA RNazy P), a także syntezę wiązania peptydowego (rybosom). Większość znanych obecnie rybozymów katalizuje reakcje jednoobrotowe, czyli takie, w wyniku których następuje nieodwracalna zmiana rybozemu, a w konsekwencji utrata właściwości katalitycznych. Niektóre rybozymy

mogą jednak przeprowadzać wiele obrotów reakcji, są zatem katalizatorami w tradycyjnym znaczeniu tego terminu i nie zmieniają się w wyniku reakcji, podobnie jak enzymy białkowe. Przykładem może tu być rybozym występujący w rybosomie, a także RNA w RNazie P [37, 38]. W działaniu katalitycznym rybozymów, jak wspomniano wyżej, bardzo istotna jest odpowiednia struktura trzeciorzędowa. Aby kontrolować proces uzyskiwania zdolności katalitycznych przez cząsteczkę rybozemu, niezbędne jest zatem zrozumienie zależności drogi fałdowania tych cząsteczek od czynników zewnętrznych, takich jak stężenie jonów czy temperatura [38].

3. Zastosowanie rybozymów w terapii

Obecnie szeroka dostępność wielu typów kwasów nukleinowych, takich jak: rybozymy, mikro siRNA, ryboprzełączniki RNA (*riboswitches*), a także sztuczne aptamery, cząsteczki siRNA i deoksyrybozymy, otworzyła nową perspektywę dla potencjalnego wykorzystania tych cząsteczek w terapii i diagnostyce wielu chorób molekularnych i genetycznych [28–30]. Spośród wielu „inteligentnych” cząsteczek kwasów nukleinowych o właściwościach katalitycznych, rybozymy są cząsteczkami RNA obdarzonymi aktywnością katalityczną zdolną do specyficznego rozszczepiania i degradacji cząsteczek mRNA. Cząsteczki te zawierają specyficzne sekwencje, która pozwalają na komplementarne wiązanie do docelowych cząsteczek mRNA oraz zawierają również odpowiednie sekwencje, które są odpowiedzialne za reakcję rozszczepienia i degradacji docelowych cząsteczek mRNA. Duża różnorodność produktów genowych, które są odpowiedzialne za różnego typu patologiczne zaburzenia, może być z powodzeniem wykorzystana jako cel ukierunkowanej strategii z użyciem rybozymów [31]. W przypadku terapii zaburzeń genetycznych istnieją dwa podstawowe kierunki terapii. Jeden z kierunków terapii genowej polega na wyciszeniu aktywności zmutowanego genu, natomiast drugi sposób związany jest z podawaniem prawidłowego genu za pomocą wektorów ekspresyjnych celem naprawy zmutowanego genu. W przypadku choroby spowodowanej przez mutacje recesywne terapia genowa stara się uzupełniać wadliwy gen poprzez jego dostarczanie do docelowych komórek za pomocą wektorów ekspresyjnych. Natomiast w przypadku chorób wywołanych na skutek dominujących mutacji genetycznych, wprowadzenie prawidłowego genu będzie pozbawione działania terapeutycznego. Wiele z tych chorób związanych jest z hiperaktywacją (w przypadku onkogenów) lub agregacją zmutowanego białka (w przypadku chorób neurodegeneracyjnych) z normalną kopią tego samego genu, obecnym na drugim niezmutowanym

We wczesnych latach 80. wykazano, że niektóre cząsteczki RNA są zdolne do katalizowania wewnątrzkomórkowych procesów związanych ze składaniem genów (*splicing* RNA), nawet w przypadku braku składnika białkowego. Te cząsteczki RNA o właściwościach katalitycznych zostały nazwane rybozymami. Od tamtej pory odkryto kilka klas rybozymów, które występują w naturalnych systemach komórkowych. Potencjał rybozymów do ich zastosowania w medycynie wiąże się ze zdolnością do specyficznego rozcinania określonych fragmentów RNA. Odpowiednie rybozymy wprowadzone do komórek gospodarza mogą modulować ekspresję wybranych genów, na przykład takich, których produkty są odpowiedzialne za rozwój chorób. W chwili obecnej wiele ośrodków badawczych skupia się nad rozwojem rybozymów, które są obiecującym narzędziem w terapii chorób wirusowych w kontrolowaniu ekspresji onkogenów i hamowaniu ekspresji zmutowanych genów oraz jako narzędzi do badania funkcji genomów.

chromosomie. W tych przypadkach znaczenie terapeutyczne ma wyciszenie ekspresji wadliwego genu. Dla takich autosomalnych dominujących chorób genetycznych rybozymy są szczególnie atrakcyjnymi narzędziami terapeutycznymi, ponieważ mogą one być zastosowane do zmniejszenia ekspresji patogennych genów przez degradację zmutowanych cząsteczek mRNA. Podobnie jak inne antysensowe terapeutyczne czynniki, rybozymy oferują obiecujący potencjał w terapii nowotworów, chorób zakaźnych i zaburzeń genetycznych [32]. Rybozymy na skutek selektywnego cięcia odpowiedniego mRNA powodują zahamowanie ekspresji niepożądanych białek, które przyczyniają się do powstawania zmian patologicznych i nasilenia choroby na skutek kumulacji w organizmie zmutowanych form białek [33]. Najbardziej fascynujące właściwości RNA dotyczą tego, że cząsteczki te posiadają zarówno potencjał jako nośniki informacji genetycznej oraz odpowiedniej aktywności katalitycznej w ramach tej samej cząsteczki [34, 35].

4. Klasyfikacja rybozymów

Po odkryciu rybozymów pojawiło się wiele doniesień o aktywności katalitycznej RNA, samo-tnących i samo-składających się cząsteczek RNA [39, 40]. W ramach ogólnego podziału rybozymów ze względu na ich budowę i rodzaj przeprowadzanej reakcji, wyróżnić można intro-ny grup I i II, RNA RNazy P, rybozymy typu *hairpin*, *hammerhead*, VS (*Varkud Satellite*), HDV (*Hepatitis Delta Virus*) oraz spliceosomy i makrokompleksy rybonukleoproteinowe [41]. Inny podział rybozymów opiera się na wielkości cząsteczek: istnieją rybozymy małe, o niezbyt skomplikowanej budowie oraz duże, złożone z licznych pętli i części helikalnych. Duże rybozymy obejmują od kilkuset do 3000 nukleotydów i generują produkty reakcji z wolną grupą 3'-hydroksylową i grupą 5'-fosforanową. W przeciwieństwie do tego, małe, aktywne, katalityczne cząsteczki RNA, których sekwencja zawiera od 30 do 150 nukleotydów, generują produkty zawierające 2'-3'-cykliczny fosforan i grupę 5'-hydroksylową.

4.1. Rybozymy o strukturze młotka (*hammerhead*)

Rybozymy typu *hammerhead* o strukturze przypominającej młotek należą do najintensywniej badanych cząsteczek tego rodzaju. Obecność tego typu rybozymów pierwotnie stwierdzono u kilku wirusów roślinnych RNA, w wiroidach i w transkryptach satelitarnego, jądrowego DNA. Rybozymy tego typu odkryto jako domeny samowycinającego się genomowego RNA wiroidów roślinnych i wirusoidów [42]. Rybozym tego typu jest najmniejszym z naturalnie występujących rybozymów i odgrywa ważną rolę podczas replikacji RNA patogenów roślinnych. Najmniejszy zidentyfikowany rybozym typu *hammerhead* składa się z około 30 nukleotydów i jest zdolny do rozszczepiania wiązania fosfodiesterowego w specyficznym miejscu, które jest rozpoznawane na zasadzie komplementarności nici RNA [43]. W badaniach wykazano, że cząsteczki tego rybozymu posiadają zdolność cięcia cząsteczek RNA i z tego względu trwają badania nad możliwym wykorzystaniem tego rybozymu w terapii genowej związanej z hamowaniem ekspresji zmutowanych genów [44]. Motywem przewodnim struktury rybozymu *hammerhead* jest obecność trzech domen helikalnych. Te trzy helisy rybozymu są ułożone w kształt litery Y [44, 45]. Głównym problemem, który należy rozwiązać w zastosowaniu rybozymów o strukturze *hammerhead* w systemach wewnątrzkomórkowych do celów terapeutycznych jest wymóg podwyższonych stężeń jonów dwuwartościowych, aby uzyskać wysoką aktywność katalityczną. Zazwyczaj w badania *in vitro* nad rybozymami *hammerhead* przeprowadzano w obecności 10 mM jonów Mg^{2+} , podczas gdy stężenie tych jonów wewnątrz komórek jest rzędu submilimolarnego [44]. Z tego względu poszukuje się rybozymów o odpowiedniej sekwencji, których aktywność katalityczna będzie optymalna w niższych stężeniach jonów Mg^{2+} [45]. W chwili obecnej znanych jest około 14 rybozymów rozszczepiających cząsteczki RNA, które posiadają odpowiednią sekwencję trinukleotydową w miejscu katalitycznego cięcia cząsteczki RNA [46] (**rycina 1**).

4.2. Rybozym o strukturze szpilki (*hairpin*)

Inny typ domeny katalitycznej RNA znaleziono w patogennych wirusach roślinnych RNA, gdzie katalizuje one reakcję samo-rozszczepienia kolistego genomu RNA wirusa podczas replikacji RNA wg. toczącego się koła. Rybozymy tego typu posiadają strukturę szpilki i, podobnie do innych typów małych rybozymów, wykazują zdolność cięcia docelowego RNA. W zależności od warunków reakcji rybozymy typu *hairpin*

mogą oprócz cięcia powodować ligację cząsteczek RNA. Katalityczna aktywność rybozymów typu hairpin jest rezultatem odpowiednich przekształceń przestrzennych i odpowiedniej orientacji docelowego RNA oraz katalizy kwasowo-zasadowej sąsiednich nukleotydów [47, 48]. Naturalnie występujące rybozomy typu szpilki o właściwościach katalitycznych posiadają w swojej strukturze cztery helisy. Minimalna jednostka katalityczna budująca ten typ rybozimu zawiera około 50 rybonukleotydów i posiada zdolność włączenia jonów metali do pełnienia właściwości katalitycznych. Pełna jednostka katalityczna składa się z dwóch domen zawierających domeny helikalne oddzielone wewnętrznymi pętlami. Katalityczna aktywność rybozimu o strukturze szpilki wynika z przekształceń przestrzennych i dokładnej orientacji względem substratu RNA i sekwencji nukleotydowej centrum aktywnego zawierającego jony metali [48]. Sztuczne rybozomy typu spinki zostały zaprojektowane głównie w celu zastosowania ich jako potencjalne narzędzie w terapii antywirusowej. Skonstruowano rybozomy o tej strukturze przeciw różnym sekwencjom genomowego RNA wirusa ludzkiego niedoboru odporności typu 1 (HIV-1), aktywność tego rybozimu powoduje hamowanie replikacji wirusa w kulturach komórkowych [49]. Wewnątrzkomórkowa ekspresja rybozymów tego typu nadaje odporność wobec wirusów HIV-1. Gdy limfocyty CD4+ zakażone wirusem HIV-1 dawców poddano transdukcji wektorem z genem terapeutycznym rybozimu anty-HIV, replikacja wirusa była hamowana [49]. Te obiecujące wyniki skłoniły do przeprowadzenia I fazy badań klinicznych w celu oceny bezpieczeństwa i skuteczności zastosowania wektorów z rybozymem *hairpin* w terapii genowej zakażeń wirusem HIV-1 (rycina 2).

4.3. RNaza P

Rybonukleaza P jest rybonukleoproteiną RNA składającą się z około 375 rybonukleotydów oraz niewielkiego polipeptydu. Rybozym tego typu powoduje rozszczepienie prekursorowego tRNA do dojrzałego tRNA. Proces dojrzewania prekursorów tRNA oraz innych cząsteczek RNA jest niezbędny do prawidłowego metabolizmu komórkowego. [50]. Aktywność kompleksu rybonukleoproteinowego zależy od katalitycznych aktywności części RNA. Naturalnie występująca w komórkach rybonukleaza P jest wszechobecnym enzymem, który działa jako endonukleaza do otrzymywania dojrzałych cząsteczek tRNA. W komórkach ludzkich RNaza P zawiera komponenty białkowe, a przy braku tych składników białkowych RNA posiada odpowiednie właściwości katalityczne [51]. W celu wykorzystania technologii

Rycina 1. Struktura przestrzenna rybozimu typu *hammerhead* (Ribozymes- Wikipedia)

Rycina 2. Struktury przestrzenne różnych rybozymów (Ribozymes- Wikipedia). A. Rybozymu typu *hairpin*. Linia ciągła oznacza część aktywną katalitycznie, przerywana zaś – część niekatalityczną. B. Schemat budowy rybozimu typu *hammerhead*

DNAzymy oprócz rybozymów stanowią następną grupę cząsteczek o właściwościach katalitycznych. Korzystając z metod selekcji *in vitro* różnych oligodeoksynukleotydów, otrzymano szereg cząsteczek DNA o właściwościach katalitycznych. DNAzymy zbudowane są z dwóch części – ramion wiążących oraz pętli katalitycznej. Ramiona są komplementarne do określonego substratu, co warunkuje specyficzność tych enzymów. Pętla katalityczna jest odpowiedzialna za przeprowadzenie określonej reakcji chemicznej. Sekwencja pętli katalitycznej danego enzymu jest unikalna, podobnie jak sekwencja każdego białka. Ramiona możemy zaprojektować w dowolny sposób, w zależności od tego, jaka cząsteczka ma być substratem. Wiadomo, że warunkiem efektywnej katalizy jest przybranie przez pętlę katalityczną odpowiedniej konformacji. Dużą zaletą DNAzymów jest względna łatwość syntezy i postępowania w porównaniu z rybozymami zbudowanymi z RNA. Ponadto cząsteczki DNA są mniej podatne na degradację przez nukleazy w tkankach i hodowlach komórkowych, co czyni je znacznie bardziej stabilnymi podczas ich egzogenego dostarczania w czasie terapii. DNAzymy, podobnie jak rybozymy RNA, próbuje się zastosować w badaniach nad hamowaniem ekspresji niepożądanych genów, np. w chorobach wirusowych, chorobach genetycznych i nowotworach.

RNazy P do terapii genowej nie jest potrzebne dostarczanie wektorów ekspresyjnych z RNazą P, tylko dostarczanie oligonukleotydów antysens, które, łącząc się z komplementarnymi docelowymi cząsteczkami mRNA, stymulują aktywność wewnątrzkomórkowej RNazy P. Technologia RNazy P próbuje się wykorzystać do hamowania ekspresji genów wirusowych, takich jak HIV-1, wirusa grypy czy wirusa zapalenia wątroby. Trwają również próby nad zastosowaniem RNazy P w terapii opornych zakażeń bakteryjnych i terapii nowotworów (poprzez hamowanie ekspresji onkogenów) [52].

4.4. Introny grupy I

Pierwszą aktywność katalityczną cząsteczek RNA zaobserwowano w dużej podjednostce RNA w *Tetrahymena thermophila*. Introny grupy I zostały również odkryte w różnych cząsteczkach tRNA, mRNA i rRNAs u bakterii i wielu innych organizmów [53]. Wszystkie one mają wspólną strukturę drugorzędową i podobne mechanizmy katalizy. Prekursor rRNA u *Tetrahymena thermophila* zawiera grupę I intronu zdolną do katalitycznego samowycinania. Samowycinający się intron wymaga obecności guanozynowego kofaktora i dwuwartościowego kationu, Mg^{2+} lub Mn^{2+} oraz przebiega poprzez dwie kolejne reakcje transestryfikacji [54]. Introny grupy I zawierają się w zakresie od kilkuset do około 3000 nukleotydów. Rybozymy tej grupy występują u grzybów, w roślinnych mitochondriach, w jądrowych cząsteczkach rRNA oraz chloroplastowym DNA (ctDNA) i bakteriofagowym RNA. Rybozymy grupy I intronów mogą okazać się ważnym narzędziem RNA w ukierunkowanej terapii. Cząsteczki tego typu mogą posłużyć do naprawy nieprawidłowych i zmutowanych cząsteczek mRNA [55]. W badaniach wykazano, że grupy zmodyfikowanych intronów grupy I są odpowiednie do korekty zmutowanego mRNA. Na przykład, wykorzystano

transaktywną grupę intronu I do naprawy zmutowanej β -globiny RNA w prekursorach erytrocytów u pacjentów z anemią sierpowatą, poprzez zastąpienie zmutowanej części beta-globiny RNA przez y-globiny-3'-egzon. Dodatkowo próbuje się wykorzystać rybozymy z tej grupy w terapii chorób wywołanych przez powtórzone sekwencje trinukleotydowe, np.: choroba Huntingtona i dystrofia miotoniczna [56].

4.5. Introny grupy II

Introny grupy II zostały odkryte u bakterii i w genomach organelli komórek eukariotycznych, głównie w mitochondrialnym i chloroplastowym RNA pochodzącym z roślin, grzybów i drożdży. Introny grupy II są mniej powszechne niż grupa I intronów. Należą one do dużych katalitycznych cząsteczek RNA, składających się ze specyficznych struktur oligorybonukleotydowych, które katalizują samowycinanie cząsteczek RNA. Występują one głównie w mRNA, ale również w tRNA i w genach tRNA [54]. Aktywność katalityczną posiada multidomena RNA metaloenzymów, które katalizują własne wycięcie ze swoich pierwotnych transkryptów według mechanizmu przypominającego działanie spliceosomu. Aktywność tej grupy rybozymów opiera się na obecności jonów metali, które są zaangażowane w strukturalne i katalityczne funkcje tych cząsteczek oraz tworzenie specyficznych interakcji z substratem [56]. W porównaniu do intronów grupy I, introny te nie wymagają guanozynu jako kofaktora. Badania wykazały, że ta klasa rybozymów jest zdolna do wprowadzenia intronu do danego genu, co można wykorzystać w terapii genowej dotyczącej korekty zmutowanego genu [57, 58] (tabela 1.).

Tabela 1. Podział rybozymów ze względu na budowę

Rodzaj rybozymu	liczba znanych przykładów	długość (nt)
Intron grupy I	1500	210
Intron grupy II	900	500
Hammerhead	11	40
Hairpin	1	70
RNaza P	500	300
Spliceosom (snRNA)	150	300
Rybosom (23S rRNA)	900	2600
HDV (Hepatitis Delta Virus)	2	90

5. Deoksyrybozymy (DNAzymy)

Podczas gdy rybozymy występujące w naturze składają się z RNA, to cząsteczki DNA o aktywnościach katalitycznych wydaje się, że nie

wywoluowały w naturze. Ten brak DNAzymów² w naturze, nie oznacza, że cząsteczki zbudowane z DNA nie posiadają zdolności do przeprowadzenia reakcji katalitycznych. Korzystając z metod selekcji *in vitro* różnych oligodeoksynukleotydów, otrzymano szereg cząsteczek DNA o właściwościach katalitycznych [59]. Deoksurybozomy to jednoniciowe fragmenty DNA, o długości około kilkudziesięciu nukleotydów, które posiadają zdolność katalizowania reakcji chemicznych. DNA-enzymy zbudowane są z dwóch części – ramion wiążących oraz pętli katalitycznej. Ramiona mają długość około 10–20 nukleotydów i są komplementarne do określonego substratu, co warunkuje specyficzność tych enzymów. Pętla katalityczna to fragment o długości około 30–40 nukleotydów, który jest odpowiedzialny za przeprowadzenie określonej reakcji chemicznej [60]. Centra katalityczne DNAzymów zbudowane są z określonej sekwencji nukleotydowej o dużej konserwatywności, są one unikalne, podobnie jak sekwencje katalityczne enzymów białkowych [33]. Ramiona dla poszczególnych DNAzymów można zaprojektować w dowolny sposób, w zależności od tego, jaka cząsteczka ma zostać substratem dla tych enzymów. W większości substratami dla enzymów DNA są kwasy nukleinowe, które podlegają reakcji cięcia (poprzez hydrolizę bądź transestryfikację) lub ligacji (reakcja łączenia DNA, RNA). Ponadto znane są deoksurybozomy posiadające zdolność modyfikacji aminokwasów oraz wykazujące aktywność fosfatazy, kinazy, jak również takie, które sprzyjają reakcji tworzenia wiązania pomiędzy dwoma atomami węgla (reakcja Dielsa-Aldera) [61].

Jeden z najaktywniejszych DNAzymów tnących cząsteczki RNA jest „10–23 deoksurybozym”, który został skonstruowany przez Santoro i Joyce w 1997 r. [60]. Jego nazwa pochodzi od tego, że został on znaleziony w 23 klonie, w 10 rundzie poszukiwań. „10–23” DNAzym wykazuje zdolność cięcia RNA, reakcja jest zależna od obecności dwuwartościowych jonów Mg^{2+} , a końcowym efektem jego działania jest produkt RNA wolnej grupy 5'-hydroksylowej i 2'-3'-cyklofosforanowej. Enzym „10–23” zawiera konserwatywną 15-nukleotydową domenę katalityczną. Zamiana G w pozycji 13 na A całkowicie niweluje aktywność katalityczną deoksurybozomu. Wykazano, że jedynie w pozycji 15 występuje pewna tolerancja na zamienność deoksurybonukleotydów, jednak spośród trzech możliwych deoksurybonukleotydów T, C lub A enzym

zawierający tymidynę charakteryzował się najwyższą aktywnością katalityczną. Właściwości katalityczne „10–23” DNAzymów przedstawiają się korzystniej od rybozymów RNA [35]. W badaniach porównujących aktywność „10–23” DNAzymów i rybozymów typu *hammerhead* wobec tego samego mRNA najbardziej aktywnym enzymem był DNAzym [62]. Innym przykładem DNAzymów jest deoksurybozym „8–17”. Enzym ten zawiera 9-nukleotydową sekwencję o strukturze spinki do włosów (typu *hairpin*) oraz 4-nukleotydową sekwencję jednoniciową. Trzon tej spinki zbudowany jest z trzech par zasad, z czego dwie są zawsze parami G–C. Dodatkowym istotnym wymaganiem sekwencyjnym enzymu „8–17” jest występowanie pary typu G–T tuż za miejscem hydrolizy łańcucha substratu. Mutacja pary G–T na parę typu Watsona – Cricka G–C całkowicie niweluje aktywność katalityczną deoksurybozomu. Domeny rozpoznawania substratu w obu wyżej wspomnianych deoksurybozymach zawierają dwa ramiona komplementarne do sekwencji substratu. Wykazano, że optymalna długość każdego z ramion wynosi od 7 do 10 nukleotydów [62]. Dodatek krótkich oligomerów DNA, komplementarnych do sekwencji substratu na zewnątrz domeny, zwiększa rozpoznanie substratu i aktywność katalityczną deoksurybozomu „10–23” do 200 razy [63]. Wykazano także, że zamiana regionów wiążących substratu RNA na homologiczne DNA zwiększa szybkość reakcji hydrolizy wiązania internukleotydowego w chimerycznym substracie 5'-DNA-GpC-DNA-3' (GpC jest dimerem rybonukleotydowym) [62]. Sugeruje się, że zwiększenie charakteru formy B-DNA dwuniciowej helisy substrat / enzym jest odpowiedzialne za wzrost aktywności katalitycznej deoksurybozymów. Deoksurybozomy, podobnie jak rybozomy, posiadają zdolność hydrolizy wiązania fosfodiesterowego docelowych substratów RNA w warunkach fizjologicznych, rozpoznając komplementarny substrat RNA poprzez wiązania typu Watsona–Cricka [63]. Deoksurybozym o strukturze „8–17” hydrolizuje wiązanie internukleotydowe pomiędzy nukleozydami purynowymi, 5'-A i 3'-G, natomiast deoksurybozym „10–23” hydrolizuje wiązanie pomiędzy 5'-nukleozydem purynowym i 3'-nukleozydem pirymidynowym (preferencyjnie pomiędzy G i U oraz A i U) [59]. Produktami reakcji są: oligonukleotyd zawierający od końca 5': 2',3'-cykliczny fosforan oraz oligonukleotyd, który od końca 3' posiada wolną

² Jak dotąd brak jednoznacznych dowodów na potwierdzenie lub zaprzeczenie tej hipotezy, a sami naukowcy mają odmiennie opinie na ten temat. Z jednej strony, pomimo że znamy sekwencje genomów wielu organizmów, nie znamy wszystkich funkcji pełnionych przez ich kwas dezoksurybonukleinowy. Istnieje zatem szansa, że wśród niekodujących odcinków DNA znajduje się miejsce dla deoksurybozymów. Z drugiej strony wiadomo, że DNA w komórce prawie zawsze występuje w formie podwójnej helisy, a przecież deoksurybozomy tworzą swoje pętla katalityczne z DNA jednoniciowego. Kiedy porównano sekwencje wyizolowanych DNAzymów z naturalnymi sekwencjami DNA zdeponowanymi w bazie danych RefSeq i Global Ocean Survey, okazało się, że enzymy wyizolowane sztucznie w laboratorium mają swoje odpowiedniki (analogiczne sekwencje) w naturze. Udowodniono, że część ze wspomnianych naturalnie występujących sekwencji DNA również wykazuje właściwości autokatalityczne w obecności jonów cynku. Prowadzi to do destabilizacji określonych fragmentów genomu. Jednak na pytanie, czy taki rodzaj aktywności jest rzeczywiście wykorzystany w żywych organizmach mogą odpowiedzieć wyłącznie przyszłe badania.

grupą 5'-hydroksylową [62]. Mechanizm działania deoksyrybozymów nie został jeszcze dokładnie poznany. Wiadomo, że warunkiem efektywnej katalizy jest przybranie przez pętlę katalityczną odpowiedniej – aktywnej konformacji oraz, że enzymy DNA w większości używają jony metali jako kofaktorów. Podobnie jak w przypadku rybozymów typu *hammerhead*, szybkość reakcji degradacji wiązania fosfodiesterowego przez enzym „10-23” jest zależna zarówno od obecności dwuwartościowego kationu metalu jak i od pH otoczenia [64]. Te parametry sugerują mechanizm hydrolizy wiązania fosfodiesterowego poprzez katalizowaną jonem metalu deprotonację grupy 2'-hydroksylowej nukleozydu, znajdującego się w sąsiedztwie reaktywnej grupy fosforanowej. Wytworzony anion alkoholany w pozycji 2' atakuje atom fosforu wiązania internukleotydowego z jednoczesnym rozzerwaniem wiązania P-O od końca 5'.

Dużą zaletą DNAzym jest względna łatwość syntezy i postępowania w porównaniu z rybozymami zbudowanymi z RNA. Ponadto cząsteczki DNA są mniej podatne na degradację przez nukleazy w tkankach i hodowlach komórkowych, co czyni je

znacznie bardziej stabilnymi podczas ich egzogenego dostarczania w czasie terapii. DNAzy, podobnie jak rybozy RNA, próbuje się zastosować w badaniach nad hamowaniem ekspresji niepożądanych genów, np. w chorobach wirusowych, chorobach genetycznych i nowotworach [64]. Dla przykładu, „10-23” DNAzy zostały wykorzystane jako narzędzie przeciwwirusowe bezpośrednio skierowane przeciwko sekwencjom genomowego RNA wirusa HIV-1 oraz jako cząsteczki uniemożliwiające wejście wirusa do komórki na skutek obniżenia ekspresji receptora CCR5 [63]. Ponadto skonstruowano DNAzy skierowane wobec docelowych genów związanych z nowotworami, takimi jak onkogeny chimeryczne *BCR-ABL* lub białkowe kinazy C [64] (rycina 3).

6. Farmakokinetyka rybozymów i deoksyrybozymów

Losy farmakokinetyczne cząsteczek rybozymów czy deoksyrybozymów w organizmie są wynikiem ich oddziaływań z tkankami docelowymi i ich interakcjami z białkami osocza. Oddziaływania te zależą od właściwości chemicznych i stabilności łańcucha polinukleotydowego. Niemodyfikowane cząsteczki RNA i DNA są prawie natychmiast degradowane przez 3'-egzonukleazy i pirymidyno specyficzne endonukleazy obecne w ludzkiej surowicy [65]. Również syntetyczne rybozy i DNAzy, podobnie jak naturalne poliribonukleotydy, są podatne na działanie endo- i egzonukleaz. Aby otrzymać rybozy i DNAzy odporne na działanie nukleaz, co będzie wpływało na wydłużenie ich okresu półtrwania w osoczu pacjentów i tym samym wydłużenie czasu terapeutycznego działania, stosuje się odpowiednie modyfikacje szkieletu polinukleotydowego. Do modyfikacji tych należy np. podstawienie atomu siarki w miejsce atomu tlenu w wiązaniu fosfodiesterowym, obecność grupy 2'-fluoro, 2'-amino, 2'-O-metylo w reszcie rybozy, wprowadzenie tymidyny tworzącej wiązanie 3'-3' na końcu 3' cząsteczki rybozemu. Podczas modyfikacji wiązań fosfodiesterowych wszystkie atomy tlenu mogą zostać zastąpione atomami siarki, co powoduje powstanie cząsteczek oligonukleotydowych z wiązaniami fosforotioatowymi [71]. Cząsteczki rybozymów zawierające zmodyfikowane ugrupowania fosfodiesterowe wykazują zwiększoną trwałość, ale wysoki poziom niespecyficznego wiązania się z białkami osocza w obrębie tkanek. Obecność, tak zmodyfikowanych wiązań może posiadać zarówno pozytywne, jak i szkodliwe efekty. Klirens osoczowy fosforotioatów i ich wydalanie nerkowe zachodzi około 10 razy wolniej niż rybozymów i DNAzymów zawierających normalne wiązania fosfodiesterowe [71]. Analogi siarkowe są dobrze redystrybuowane

Schemat hydrolizy wiązania fosfodiesterowego przy udziale deoksyrybozymów

Rycina 3. Schemat działania deoksyrybozymów „10-23” i „8-17”.

Deoksyrybozy zawierają dwie funkcjonalne domeny: zmienną rozpoznania substratu i konserwatywną, zawierającą centrum katalityczne. Domena katalityczna enzymu „8-17” zbudowana jest z 9-nukleotydowej sekwencji o strukturze spinki do włosów (typu *hairpin*) i jednoniciowej sekwencji 5'-ACGA-3'. Trzon spinki zawiera trzy pary zasad, z czego dwie muszą być parami G-C. Tuż za miejscem hydrolizy łańcucha substratu występuje para typu G-T. DNAzym typu „10-23” zawiera konserwatywną 15-nukleotydową domenę katalityczną. Domena rozpoznania substratu w obu deoksyrybozymach składa się z dwóch ramion komplementarnych do sekwencji substratu. Miejsce hydrolizy wiązania fosfodiesterowego w RNA wskazane jest strzałką. DNAzym „8-17” hydrolizuje wiązanie internukleotydowe pomiędzy nukleotydami purynowymi, 5'-A i 3'-G, a DNAzym „10-23” pomiędzy 5'-nukleotydem purynowym i 3'-nukleotydem pirymidynowym

do tkanek, a po podaniu pozajelitowym są metabolizowane powoli, okres ich półtrwania w osoczu wynosi od 20 do 120 godzin u szczurów i małp, w zależności od tkanek i narządów [72]. Szybki wlew rybozymów fosforosiarczanowych (u małp) może powodować negatywne skutki ze strony układu sercowo-naczyniowego, mogące doprowadzić do zapaści sercowo-naczyniowej [72]. Należy jednak dodać, że dawki stosowane w próbach klinicznych są na ogół dobrze tolerowane. Niektóre problemy związane ze stosowaniem fosfortioatowych oligonukleotydów można przezwyciężyć za pomocą ich dodatkowej modyfikacji w pozycji 2'C rybozy. Duża liczba modyfikowanych w pozycji 2'C rybozy oligonukleotydów antysensowych została przetestowana, a cząsteczki 2'-O-metylo-2'-metoksyetylo RNA są powszechnie stosowane w badaniach odnośnie do terapii. Wykazano, że oligonukleotydy zawierające te modyfikacje są mniej toksyczne niż związki fosfortioatowe i wykazują zwiększone powinowactwo do sekwencji docelowej. Ponadto dostępność biologiczna tych analogów po podaniu doustnym jest znacznie poprawiona w porównaniu do fosfortioaninów [73]. Wprowadzenie modyfikowanych nukleotydów do katalitycznie aktywnych cząsteczek oligonukleotydowych rybozymów jest szczególnie trudne, ponieważ modyfikacje mogą wpływać na struktury trójwymiarowe tych cząsteczek, co skutkuje zmniejszeniem ich aktywności wobec docelowych cząsteczek RNA. Prowadzone są obecne rozległe prace nad stabilizacją rybozymu o strukturze *hammerhead* bez zakłócenia jego katalitycznej aktywności. Badania wykazały, że optymalna cząsteczka rybozymu tego typu zawiera pięć niezmodyfikowanych rybonukleotydów purynowych w centrum katalitycznym. Od końców 3'- i 5' rybozym ten jest chroniony przez wiązania fosfortioatowe i odwróconą 3'-3'-pozbawioną zasady cząsteczkę cukru. Nowo zaprojektowane cząsteczki są znacznie bardziej stabilne w surowicy ludzkiej w stosunku do cząsteczki wyjściowej i są testowane w badaniach klinicznych [73].

DNAazy są z natury bardziej stabilne niż rybozymy zbudowane z RNA. Okres półtrwania niezmodyfikowanych cząsteczek DNAazy w ludzkiej surowicy wynosi w przybliżeniu około 2 godzin, w porównaniu do rybozymów o strukturze *hammerhead*, która wynosi około 2 min. Pomimo większej stabilności, aby je zastosować w hodowli komórkowej lub w warunkach *in vivo*, dodatkowa stabilizacja jest niezbędna. Znacząca poprawa odporności wobec nukleaz została osiągnięta dzięki wprowadzeniu do cząsteczek DNAazymów odwróconej zasady do końca 3' [74]. Do innych modyfikacji należy zaliczyć metylację wiązania fosfodiesterowego tzw. 2'-O-metylacja oraz blokowanie DNAazymów za pomocą analogów nukleotydów (LNA), które

zawierają mostki metylenowe między tlenem O2' i węglem C4' rybozy [74]. Modyfikacje te mają dodatkową zaletę, gdyż podwyższają powinowactwo substratu do DNAazy, co powoduje wzrost szybkości reakcji oraz zwiększenie siły wiązania DNAazymów do trudno dostępnych miejsc docelowych.

Skuteczne wykorzystanie powyższych cząsteczek do hamowania ekspresji pożądanych genów zależy od szeregu czynników: w tym od wyboru tkanki docelowej, sposobu dostarczania rybozymów, stabilności rybozymów i jego wewnątrzkomórkowej lokalizacji. Swoistość rybozymów i DNAazymów wobec określonego miejsca cięcia docelowego RNA jest determinowana: (1) na skutek zachodzącego parowania komplementarnego pomiędzy nukleotydami rybozymu (DNAazy) i jego docelowego substratu mRNA (rybozymy o strukturze młotka, spinki lub introny grupy I) oraz na skutek wiązania komplementarnego rybozymu z jego docelową sekwencją na DNA (grupa II intronów). Przykładem może być rybozym typu *hammerhead*, który rozszczepia substrat po dinukleotydzie UX, gdzie X może być dowolnym rybonukleotydem za wyjątkiem guanozyny, szybkość cięcia substratu jest najwyższa, jeśli X jest cytozyną. Wydajność katalityczna rybozymu zależy również od nukleotydu poprzedzającego urydynę. W praktyce sekwencja trinukleotydowa NUX (gdzie N może być dowolnym rybonukleotydem - zazwyczaj GUC, CUC lub UUC) jest wymagana w docelowym mRNA dla odpowiedniej aktywności katalitycznej rybozymów. Wysoka specyficzność syntetycznych rybozymów i DNAazymów jest zapewniana w wyniku projektowania odpowiednich sekwencji antysensowych odpowiedzialnych za tworzenie komplementarnych wiązań z sekwencjami docelowymi substratu RNA. Ze względu na fakt, że etap rozszczepienia nukleolitycznego jest bardzo szybki, to etap uwalniania substratu (RNA, DNA) limituje prędkość reakcji [67].

Obecnie próbuje się zastosować w terapii dwa typy rybozymów: rybozymy o strukturze szpilki i młotka (*hammerhead and hairpin*). Każdy z powyższych typów rybozymów posiada własną minimalną sekwencję niezbędną do prawidłowej aktywności katalitycznej. Rybozymy o strukturze *hairpin* wymagają sekwencji GUC w miejscu cięcia docelowego RNA, podczas gdy rybozymy typu *hammerhead* wymagają obecności aktywnej sekwencji NUHN (gdzie N oznacza dowolną zasadę, a H oznacza A, C lub U). Nie wszystkie sekwencje docelowego RNA są dostępne, ze względu na tworzenie przez sekwencje RNA struktur drugorzędowych, wiązanie białek i komplementarnych kwasów nukleinowych oraz w wyniku wiązania dodatkowych czynników wpływających na aktywność rybozymów. Aby zapewnić wysoką wydajność konstruowanego rybozymu, należy przeanalizować sekwencję docelowego

substratu mRNA w celu określenia najbardziej podatnych miejsc do cięcia katalitycznego. Jedną ze strategii zwiększania aktywności syntetyzowanego rybozemu jest zaprojektowanie i przyłączenie do rybozemu krótkich fragmentów DNA lub RNA komplementarnych do sekwencji docelowej substratu, co powoduje zwiększenie selektywności przyłączania rybozemu i zwiększenie jego katalitycznej wydajności [68]. Dotyczy to projektowania rybozemu typu spinki, w których część katalityczna może wynosić około 35 nukleotydów, która to część utrudnia przyłączanie do substratu [69]. Możliwość projektowania określonych rybozemu do selektywnego rozpoznawania wybranych docelowych cząsteczek RNA znacznie rozszerzyła ich potencjał terapeutyczny. Przykładem modyfikowanych rybozemu mogą być allosteryczne rybozemy, których aktywność jest regulowana za pomocą zewnętrznych czynników. Kontrola ich aktywności nukleolitycznej zachodzi poprzez wiązanie cząsteczki efektorowej do allosterycznego miejsca wiązania. Strategia ta może być wykorzystywana w sytuacjach, w których jest pożądana regulacja aktywności katalitycznej cząsteczki RNA przez czynnik zewnętrzny, np. do degradacji RNA wirusów podczas infekcji komórkowych. Do allosterycznych rybozemu należą tzw. syntetyczne maxizymy, których działalność jest regulowana przez specyficzną sekwencję w docelowym RNA. Ta sekwencja jest nazywana sekwencją czujnika lub sensora i jest ona fizycznie różna od miejsca rozszczepiania. Pierwotnie opracowano rybozemy, które rozszczepiają docelowy RNA w dwóch różnych miejscach. Składają się one z dwóch minizymów (rybozemy typu *hammerhead*), które działają tylko wtedy, gdy tworzą katalityczny dimer [70]. Maxyzym jest allosterycznie sterowanym rybozemy z mocnym biosensorem. Funkcje biosensora umożliwiają specyficzne hamowanie ekspresji ściśle określonego genu, bez żadnego wpływu na pozostałe cząsteczki RNA.

7. Strategie dostarczania rybozemu i deoksyrybozemu do sekwencji docelowych

Jednym z najtrudniejszych etapów aplikacji rybozemu i deoksyrybozemu w terapii jest ich dostarczanie do określonych subpopulacji komórek docelowych wewnątrz organizmu pacjenta. Bezpośrednie wprowadzenie rybozemu do komórki wymaga pokonania bariery, jaką stanowią błony biologiczne, a dostarczanie tych cząsteczek jest kwestią złożoną, gdyż docelowe cząsteczki RNA, na które działają rybozemy lub DNAazy, mogą być zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych, takich jak: jądra, jąderka lub cytoplazma [75]. Obecnie istnieją dwie dostępne metody dystrybucji

terapeutycznych cząsteczek, tj. metoda egzogenna i endogenna. Mechanizm egzogennej dostarczania rybozemu polega na bezpośrednim dostarczaniu modyfikowanych chemicznie rybozemu do komórek docelowych, podczas gdy endogenne dostarczanie tych cząsteczek polega na transfekcji komórek docelowych wektorem ekspresyjnym z wbudowanym genem terapeutycznym kodującym określony rybozym, którego ekspresja przebiega już w obrębie komórki docelowej [76, 77]. Stabilizowane rybozemy, o okresie półtrwania mierzonego w godzinach, mogą być dostarczane w powtarzanych dawkach poprzez dożylne lub miejscowe wstrzyknięcia (na przykład bezpośrednio do guza łitego), strategia ta jest obecnie testowana w badaniach klinicznych rybozemu typu *hammerhead* w terapii nowotworów i terapii zapalenia wątroby typu C [77]. W celu zwiększenia efektywności przenoszenia próbuje się wykorzystać inne metody fizyczne w dostarczaniu terapeutycznych rybozemu, takie jak: elektroporacja oraz mikroiniekcje [78, 79]. W szczególności, mikroiniekcja jest prostym, mechanicznym sposobem stosowanym w kierowaniu rybozemu do określonego przedziału wewnątrzkomórkowego [79].

7.1. Wektory niewirusowe

Problemy związane z toksycznością i immunogennością wektorów wirusowych przyczyniły się do rozwoju niewirusowych, alternatywnych systemów dostarczania rybozemu zamiast wektorów wirusowych [78]. Wektory niewirusowe są głównie wykorzystywane do dostarczania egzogennej rybozemu. Choć ich niska wydajność pozostaje główną wadą tych systemów, jednak niewirusowe wektory wykazują również wiele zalet w porównaniu z wektorami wirusowymi. Do zalet tych należą: łatwość otrzymywania, niższa toksyczność i immunogenność oraz niski koszt otrzymywania takich wektorów [79]. Ponadto niewirusowe wektory zapewniają różne metody ochrony fizycznej rybozemu w czasie ich bezpiecznego dostarczania terapeutycznego do komórek docelowych. Wektory tego typu ochraniają rybozemy przed działaniem układu filtracyjnego, enzymatyczną degradacją i procesami immunologicznymi ograniczającymi ostatecznie efekt terapeutyczny tych cząsteczek [79]. Większość niewirusowych wektorów opracowanych w terapii rybozemy jest cząsteczkami o naturze kationowej [80]. Do najpowszechniej stosowanych wektorów należą lipidy kationowe, kationowe polimery, dendrimery oraz kationowe peptydy [81–83].

Wiele danych na temat egzogennej transportu antysensownych oligonukleotydów można przełożyć na cząsteczki rybozemu, które posiadają podobne właściwości fizykochemiczne. Jedną z takich właściwości jest fakt, że dodatkowo naładowane

rybozomy wykazują się słabą zdolnością do przenikania przez błony hydrofobowe. W celu zwiększenia stopnia wychwytu terapeutycznych cząsteczek oligonukleotydów czy rybozymów przez komórki poddaje się je procesowi kompleksowania z preparatami zawierającymi fosfolipidy, posiadające dodatkowo naładowane grupy funkcyjne. Takie lipidy kationowe połączone z rybozymem mogą być umieszczane w liposomach, które ułatwiają absorbowanie do błon komórkowych i ich pobieranie w wyniku endocytozy [84]. Aby ułatwić uwolnienie terapeutycznych cząsteczek RNA czy DNA z endosomów, do cząsteczek nośnika dołącza się związki promujące zmiany w błonie pęcherzyków endosomalnych takie jak cholesterol. W niektórych badaniach *in vivo* wykazano, że liposomy mogą posiadać właściwości toksyczne i immunostymulujące oraz są szybko usuwane z komórek przez komórkowy układ siateczkowo-śródbłonkowy. Aby otrzymać przedłużone działanie terapeutyczne i wydłużyć czas ich obecności w układzie krwionośnym, próbuje się zmniejszyć ich fagocytozę poprzez użycie zmodyfikowanych liposomów zawierających cząsteczki glikolu polietylenowego. Dożylnie podawanie rybozymów, DNazymów, których struktura jest stabilizowana za pomocą liposomów w formie liposomowo-polinukleotydowych konjugatów, jest szczególnie korzystne w terapii schorzeń wątroby i płuc, w których to organach po wstrzyknięciu dożylnym mogą się te związki gromadzić i odgrywać ważne znaczenie terapeutyczne [85–87]. Próbuje się również opracować inne systemy odpowiedzialne za transport rybozymów [85]. Przykładem może być zastosowanie systemów wielkocząsteczkowych, które służą do egzogennej dostawy rybozymów do komórek docelowych. Tymi związkami wielkocząsteczkowymi są silnie rozgałęzione węglowodany, jak: dendrymery i biodegradowalne matryce polimerowe, np. polilaktydy i kopolimery kwasu mlekowego i glikolowego. Dostarczenie rybozymów, ale również i deoksyrybozymów za pomocą takich biodegradowalnych polimerów posiada ważną zaletę, gdyż przedłuża uwalnianie i tym samym działanie związanych z tymi nośnikami, rybozymów i DNazymów nawet do miesiąca [85].

Na skutek sprzęgania rybozymów z odpowiednimi ligandami i przeciwciałami można osiągnąć specyficzne ukierunkowanie terapeutycznych cząsteczek wobec określonych komórek [86]. Wnikanie rybozymów na skutek endocytozy może być pominięte na skutek sprzęgania rybozymów czy deoksyrybozymów z krótkimi cząsteczkami peptydów transportowych. Takimi peptydami może być tat-peptyd z wirusa HIV-1, peptyd VP-22 z wirusa *herpes simplex* i czynnik transkrypcyjny ANTP z *Drosophila melanogaster*. Powyższe peptydy są domenami, które promują transport

oligonukleotydów przez błony biologiczne niezależny od receptorów i białek transporterowych. Istnieją również peptydy, np. hemoaglutynina z wirusa grypy, które stabilizują endosomy i ułatwiają transport rybozymów za pomocą procesu endocytozy [86]. Reasumując, nie ma prostej reguły dla procesu wychwytu, rybozymów do określonych komórek docelowych, a skuteczność ich dostarczania zależy od wielu parametrów związanych z rodzajem komórek docelowych i ich cyklem komórkowym [87]. Niektóre wyniki wykazały niespodziewanie, że proste wstrzyknięcie chemicznie stabilizowanych rybozymów w roztworze soli prowadzi do skutecznej absorpcji i pożądaných efektów biologicznych *in vivo*.

7.2. Wektory wirusowe

Inna strategia dostarczania rybozymów wykorzystuje wektory wirusowe, które przenoszą terapeutyczne geny do transportu rybozymów do określonych komórek i tkanek organizmu. Dostarczanie genów kodujących określone rybozomy (endogenna dostawa rybozymów) z użyciem wektorów wirusowych w terapii genowej jest główną alternatywą dla bezpośredniego dostarczania rybozymów (czyli egzogenna dostawa rybozymów) do tkanek docelowych [88]. Do najczęściej wykorzystywanych należą wektory wirusowe takie jak: wektory retrowirusowe, wektory adenowirusowe i wektory adenosatelitarne [89]. Wektory wirusowe są uprzednio modyfikowane, aby wyeliminować ich toksyczność i utrzymać ich wysoką zdolność transferu genów. Przedmiotem wielu badań przedklinicznych są modyfikacje wektorów dotyczące głównie ich genów odpowiedzialnych za replikację i sekwencji niekodujących, które są częściowo lub całkowicie zastąpione przez terapeutyczne geny [90]. Pomimo wysokiej wydajności transfekcji osiągananej przy użyciu wektorów wirusowych, istnieją ograniczenia w ich zastosowaniu dotyczące wielkości transportowanego genu terapeutycznego i zdolności kierowania terapeutycznych genów do odpowiednich komórek docelowych i ich bezpieczeństwa [91]. Próbuje się opracować wektory do transportu rybozymów tak, aby posiadały prostą budowę, powtarzalność działania, zmniejszoną immunogenność i zdolność przenoszenia do odpowiednich komórek docelowych [92]. Do często używanych należą wektory retrowirusowe, które są dostępne od ponad dziesięciu lat, mają one wiele zalet, szczególnie podczas dostarczania genów *ex vivo* do komórek macierzystych pobranych z organizmu i po transdukcji ponownie wszczepianych do organizmu. Mimo ostatnich postępów dotyczących wektorów retrowirusowych, wektory tego typu posiadają szereg wad, w tym ograniczony tropizm komórkowy, niską efektywność uzyskania replikacji komponentów wirusa

podczas pakowania terapeutycznych genów. Następnym typem wektorów stosowanych są wektory adenowirusowe. Ekspresja terapeutycznych genów w tych wektorach jest tylko przejściowa, ponieważ ich materiał genetyczny nie integruje się z genomem komórek docelowych [94]. Wektory tego typu są łatwe do wytwarzania oraz wykazują szeroki zakres w zakażeniu dzielących i nie dzielących się komórek. Wadą tego systemu jest fakt, że rekombinowane wektory adenowirusowe wywołują szereg zarówno humoralnych, jak i komórkowych odpowiedzi immunologicznych, które ograniczają ich przydatność w terapii genowej [94]. Alternatywą wobec tych wektorów wirusowych mogą być wektory konstruowane na bazie wirusów adenosatelitarnych, które posiadają wszystkie zalety wektorów adenowirusowych, ale nie stymulują stanu zapalnego oraz komórkowej odpowiedzi immunologicznej [95]. W odróżnieniu do adenowirusów, terapeutyczne geny przenoszone za pomocą wektorów AAV podlegają długotrwałej transdukcji genetycznej w zainfekowanych komórkach, prawdopodobnie na skutek integracji wektora i klonowanych do niego terapeutycznych genów do genomu komórek gospodarza w ściśle określonych miejscach, podczas utajonych infekcji. Wadą tego typu wektorów jest fakt, że zaledwie 4,5 kb terapeutycznego DNA może zostać wstawione do rekombinowanego wektora. Ten limit pakowania terapeutycznego materiału genetycznego jest przeszkodą w niektórych terapiach genowych, pomimo tego sekwencja rybozymów jest na tyle mała, że wektory AAV zapewniają wystarczającą przestrzeń do klonowania genów rybozymów i sygnałów regulacyjnych niezbędnych do kontrolowania ich ekspresji [96].

7.3. Promotory

W celu prawidłowej ekspresji rybozymów sekwencje kodujące te cząsteczki klonowane są do wektorów pod kontrolą odpowiednich promotorów polimerazy RNA. Wybór właściwego promotora ma zasadnicze znaczenie dla docelowej lokalizacji wektora z terapeutycznym genem w obrębie komórki. Rybozymy mogą ulec transkrypcji z promotorów polimerazy II lub polimerazy III (Pol II i Pol III). Transkrypcja za pomocą Pol II prowadzi do dodawania do transkryptu od końca 5' osłonki -cap i poliadenylacji (poliA), w wyniku czego zwiększa się stabilność transkrybowanych genów rybozymów w cytoplazmie komórki docelowej [97]. Promotory Pol II mogą być stosowane do transkrypcji genów rybozymowych specyficznych tkankowo. Natomiast odpowiednia aktywność promotorów Pol III powoduje ekspresję dużej liczby cząsteczek rybozymów [98]. Wadą stosowania promotorów Pol III jest to, że ich aktywność nie może być regulowana, a bezpośrednia synteza dużej liczby rybozymów nie

przebiega w każdej zainfekowanej komórce. Z tego względu regulowane w komórkach docelowych promotory typu Pol II mają znaczącą przewagę w terapii genowej. Ekspresja rybozymów z promotorów Pol II przebiega w cytoplazmie, w której jest obecny docelowy mRNA [99]. Na przykład promotor rodopsyny (typu Pol II) został wykorzystany w celu osiągnięcia wysokiego poziomu transkrypcji rybozymów, których ekspresja jest ograniczona do komórek pręcikowych fotoreceptorów siatkówki [26]. W wielu przypadkach interferencja rybozemu z jego genem docelowym może prowadzić do hamowania aktywności genów w niepożądanych komórkach i z tego względu próbuje się ekspresję genu terapeutycznego kontrolować za pomocą specyficznych przełączników. Przykładem tego może być użycie zależnego od tetracykliny białkowego transktywatora TTA, składającego się z domeny aktywującej transkrypcję z wirusa *herpes simplex* i represora tetracykliny z *E.coli*. Podczas obecności tetracykliny, cząsteczka tego związku wiąże się z domeną represora, a na skutek tego wiązania następuje aktywacja transkrypcji, natomiast podczas braku tetracykliny następuje hamowanie transkrypcji [100]. Wprowadzenie promotorów regulowanych za pomocą antybiotyków lub syntetycznych hormonów umożliwia zależną od dawki (antybiotyku lub hormonu) ekspresję klonowanych genów, w tym rybozymów [101, 102]. Umożliwia to odpowiednią aktywność terapeutyczną związaną z ekspresją klonowanych rybozymów, pozwalającą na zadziałanie terapeutycznego genu i następnie jego wyłączenie.

8. Potencjał terapeutyczny rybozymów i DNAzymów

Rybozymy i deoksyrzybozymy znajdują coraz szersze zastosowanie w terapii genowej, specyficzne cięcie mRNA przez te cząsteczki może osłabiać lub zapobiegać translacji niepożądanych czy zmutowanych białek. W terapii tego typu odpowiedni gen dla rybozemu, rozpoznający określoną cząsteczkę mRNA, wprowadza się za pomocą wektora ekspresyjnego do komórki docelowej [103]. Ulegający ekspresji w komórce rybozym degraduje specyficznie zmutowany mRNA, który zawiera sekwencję komplementarną do skonstruowanego rybozemu. Jednym z najpopularniejszych zastosowań rybozymów jest ich wykorzystanie do genoterapii chorób wirusowych oraz nowotworów. Przykładem takiego wykorzystania jest degradacja RNA wirusa HIV-1, wirusa brodawczaka ludzkiego (*human papilloma virus*, HPV) lub degradacja mRNA niektórych onkogenów, np. mRNA zmutowanego genu Ras w celu hamowania transformacji nowotworowej [103]. Rybozymy mogą przeprowadzać reakcje transestryfikacji (*hairpin*), transferu nukleotydów

(introny), hydrolizy (RNA RNazy P) czy syntezy wiązania peptydowego (rybosom). Są one ważnymi pod względem biologicznym cząsteczkami, wciąż prowadzone są badania nad ich aktywnością, ponieważ rybozomy biorą udział w wielu ważnych reakcjach, których zbadanie jest niezbędne do poznania metabolizmu komórki, a ich selektywność działania może być wykorzystana w celowanej terapii RNA [104].

Natomiast potencjał deoksyrybozymów w terapii wiąże się z ich zdolnością do specyficznego rozcinania określonych fragmentów DNA lub RNA. Katalityczne cząsteczki DNAzymów (deoksyrybozym), wprowadzone do komórek gospodarza, mogą modulować ekspresję wybranego genu – na przykład takiego, którego produkt odpowiedzialny jest za rozwój choroby. Przewagą deoksyrybozymów nad rybozymami jest przede wszystkim ich cena i stabilność. Synteza oligonukleotydów DNA jest tańsza, a ponadto są one odporniejsze na degradację w warunkach fizjologicznych, przez co nie jest konieczna znaczna modyfikacja ich struktury do zastosowań *in vivo*. Wyzwaniem pozostaje natomiast, podobnie jak w przypadku innych produktów terapii genowej, specyficzne dostarczanie deoksyrybozymów wyłącznie do chorych komórek, co wiąże się m.in. z projektowaniem deoksyrybozymów w kierowanej terapii przeciwnowotworowej [104].

8.1. Wykorzystanie rybozymów i DNAzymów w chorobach OUN

Strategie rybozymów i DNAzymów próbuje się wykorzystać w terapii chorób OUN, takich jak: choroba Huntingtona, Alzheimer i Parkinsona. Choroba Huntingtona (HD) jest postępującą chorobą mózgu, która powoduje niekontrolowane ruchy, problemy emocjonalne i utratę zdolności racjonalnego myślenia. W latach 90. ubiegłego wieku wykazano, że wiele schorzeń neurodegeneracyjnych jest spowodowanych wydłużaniem powtórzeń sekwencji trinukleotydowych [105]. Zjawisko takie występuje w przypadku choroby Huntingtona, która jest zaliczana do chorób ekspansji glutaminowych. Mutacja w tej chorobie dotyczy genu HTT, umiejscowionego na krótkim ramieniu chromosomu 4p16.3. W wyniku ekspresji zmutowanego genu HTT powstaje nieprawidłowa forma białka huntingtyny (mHtt), o zwielokrotnionej sekwencji poliglutaminowej od N-końca, co powoduje istotne zmiany konformacyjne tego białka, skutkujące powstaniem zaburzeń wielu procesów neurologicznych na poziomie molekularnym. Zwiększenie ilości kodonów poliglutaminowych w wyniku poślizgu polimerazy w replikacji DNA jest odpowiedzialne za występowanie kilku innych chorób neurodegeneracyjnych, a ekspansja (wydłużanie) sekwencji repetetywnych podczas kolejnych rund replikacyjnych powoduje,

że powyższe choroby ulegają nasileniu z wiekiem, a z pokolenia na pokolenie stają się coraz cięższe. Yen i wsp. po raz pierwszy wykazali, że jest możliwa skuteczna degradacja zmutowanej wersji mRNA białka huntingtyny, stosując specyficzny DNAzym, który był zdolny do degradacji zmutowanego mRNA huntingtyny w sposób selektywny i zależny od sekwencji [106]. Degradacja ta prowadzi do znaczącego zmniejszenia ekspresji zmutowanego białka huntingtyny w komórkach ssaków [56]. Na modelach komórkowych i zwierzęcych wykazano znaczne ograniczenie poziomu zmutowanej huntingtyny, a to powoduje zmniejszenie nasilenia choroby, co z kolei sugeruje możliwość odwrócenia zmian patologicznych choroby HD [107].

Cząsteczki katalitycznego RNA i DNA próbuje się również zastosować w terapii choroby Alzheimer (AD). Choroba Alzheimer jest neurodegeneracyjnym zaburzeniem, polegającym na odkładaniu się płytek starczych w neuronach OUN. Płytki te składają się z agregatów peptydu Ap-amyloidu (Ap), peptyd ten jest wytwarzany poprzez sekwencyjne rozszczepienie amyloidowego białka prekursorowego (APP) przez b-sekretazę [107]. Poziom b-amyloidu, który jest głównym składnikiem toksycznych blaszek amyloidowych, zależy bezpośrednio od hydrolitycznej aktywności b-sekretazy. Nawrot i wsp. zaprojektowali odpowiedni rybozym RNA w celu kontrolowania ekspresji b-sekretazy. Wyniki badań wykazały, że rybozym ten był zdolny do znacznego hamowania ekspresji genu b-sekretazy na poziomie zarówno mRNA, jak i białka huntingtyny [108]. Obniżenie poziomu ekspresji b-sekretazy przekładało się na ograniczenie rozszczepiania białka prekursorowego APP, co wpływało z kolei na obniżenie poziomu toksycznego peptydu, b-amyloidu w płytkach starczych. Badania te wskazują, że rybozomy mogą być skutecznym narzędziem do hamowania powstawania płytek b-amyloidowych i skutecznej terapii choroby Alzheimer [108].

Choroba Parkinsona (PD) jest kolejnym zaburzeniem neurodegeneracyjnym, które charakteryzuje

Jednym z najtrudniejszych etapów aplikacji rybozymów i deoksyrybozymów w terapii jest ich dostarczanie do określonych subpopulacji komórek wewnątrz organizmu pacjenta. Dostarczanie rybozymów jest kwestią złożoną, gdyż docelowe cząsteczki RNA, na które działają rybozomy lub DNAzomy, mogą być zlokalizowane w różnych przedziałach komórkowych, takich jak: jądra, jąderka lub cytoplazma. Obecnie istnieją dwie dostępne metody dystrybucji terapeutycznych cząsteczek, tj. metoda egzogenna i endogenna. Mechanizm egzogennej dostarczania rybozymów polega na bezpośrednim dostarczaniu modyfikowanych chemicznie rybozymów do komórek docelowych, podczas gdy endogenne dostarczanie tych cząsteczek polega na transfekcji komórek docelowych wektorem ekspresyjnym z wbudowanym genem terapeutycznym kodującym określony rybozym, którego ekspresja przebiega już w obrębie komórki docelowej. W celu zwiększenia efektywności przenoszenia próbuje się wykorzystywać inne metody fizyczne w dostarczaniu terapeutycznych rybozymów, takie jak: elektroporacja oraz mikroiniekcje.

się selektywną apoptozą neuronów dopaminergicznych w istocie czarnej (*substantia nigra*) oraz zaburzeniami cytoplazmatycznymi związanymi z tworzeniem agregatów α -synukleiny [64]. Badania wykazały, że nadekspresja α -synukleiny powoduje powstanie toksycznych efektów w neuronach dopaminergicznych [109]. Natomiast obniżenie poziomu α -synukleiny jest skuteczną metodą hamowania postępującej patologii choroby PD. Hayashita-Kinoh i wsp. wykorzystali wektor wirusowy AAV (wektor adenowirusowy) do dostarczania genu terapeutycznego kodującego rybozym o aktywności wobec α -synukleiny, aby przetestować jego działanie w degeneracji neuronów dopaminergicznych na modelu zwierzęcym choroby Parkinsona, w których obserwuje się wysoki poziom 1-metylo-4-fenylpirydyniu (MPP⁺) [109]. MPP⁺ jest neurotoksycznym związkiem obecnym w neuronach dopaminergicznych na skutek wzmożonej ekspresji α -synukleiny [108]. Wektor wirusowy AAV z genem terapeutycznym o sekwencji rybozymu hamującego ekspresję α -synukleiny w hodowlach komórek HEK 293 oraz hamował ekspresję tego białka podczas bezpośredniej iniekcji wektora z genem terapeutycznym do istoty czarnej na modelu zwierzęcym choroby Parkinsona. Badania wykazały, że wektor ekspresyjny z genem rybozymu chroni neurony zawierające gen hydroksylazy tyrozynowej (TH) w istocie czarnej przed apoptozą w porównaniu do nietransfekowanych neuronów (w próbie kontrolnej) lub którym wstrzyknięto kontrolny wektor bez terapeutycznego genu. Wyniki te wskazują, że zastosowanie wektora wirusowego AAV przenoszącego gen rybozymu hamującego działanie α -synukleiny wpływa na przeżycie neuronów zawierających gen TH w *substantia nigra* na modelu zwierzęcym choroby. Ponadto wyniki te sugerują, że obniżenie regulacji α -synukleiny może być potencjalnie odpowiednią metodą w terapii genowej choroby Parkinsona [109].

8.2. Wykorzystanie rybozymów i DNAzymów w chorobach mięśni

Rybozymy i DNAzymy próbuje się wykorzystywać w terapii chorób mięśni gładkich i szkieletowych. Do tych zaburzeń można zaliczyć: typ miotonicznej dystrofii mięśni I, zaburzenia nerwowo-mięśniowe czy zwężanie odgałęzień tętnic wieńcowych w nadciśnieniu. Mięśnie gładkie komórek nacyniowych u organizmów dorosłych są wysoce wyspecjalizowane, a ich główną funkcją jest skurcz i regulacja średnicy naczyń krwionośnych, regulacja ciśnienia krwi i dystrybucja przepływu krwi. Nieprawidłowe sygnały środowiskowe mogą prowadzić do niekorzystnego fenotypu, który przyczynia się do rozwoju i/lub postępu choroby naczyń [110]. Podjęto wiele prób nad zastosowaniem rybozymów

i DNAzymów w terapii chorób układu krwionośnego. Angiotensyna typu II (Ang II) odgrywa ważną rolę w rozwoju nadciśnienia i miażdżycy naczyń krwionośnych przez indukowanie wzrostu komórek mięśni gładkich i syntezę aldosteronu [111]. Aktywację 12-lipooksygenazy (12-LO) w leukocytach zaproponowano jako ważny mechanizm działania AngII w indukowaniu przerostu komórek mięśni gładkich naczyń. To odkrycie skłoniło do zaprojektowania rybozymu RNA typu *hammerhead* skierowanego przeciw sekwencji trinukleotydowej GUC, zlokalizowanej na 12-LO mRNA. Rybozym transfekowany do aorty komórek mięśni gładkich naczyń krwionośnych powoduje znaczne zmniejszenie poziomu endogennego typu 12-LO mRNA i poziomu białka [112].

W próbie hamowania proliferacji komórek mięśni gładkich naczyń Jarvis i wsp. badali działanie wielu rybozymów, których aktywność skierowana była wobec transkryptów mRNA c-Myb. Rybozymy o strukturze *hammerhead* były zdolne do rozszczepiania transkryptu c-myb mRNA, co w rezultacie hamowało proliferację komórek mięśni gładkich [113, 114]. Odkrycie to wskazuje, że rybozymy o strukturze *hammerhead* mają zdolność hamowania rozrostu komórek mięśni gładkich, który następuje u wielu chorych po angioplastyce naczyń wieńcowych. W innej próbie, w celu zapobiegania nawrotowi zwężenia tętnic wieńcowych Grassi i wsp. wykorzystali rybozymy o strukturze *hammerhead*, jako specyficzne narzędzie do hamowania aktywatorów proliferacji komórkowej [115]. Zaprojektowano dwa specyficzne rybosomy *hammerhead* hamujące ekspresję mRNA cykliny E i E2F1, które są silnymi aktywatorami proliferacji komórek mięśni gładkich i umożliwiają przejście fazowe komórek z fazy G1 do fazy S [116]. Po transfekcji tych rybozymów do komórek mięśni gładkich naczyń wieńcowych nastąpiła znaczna redukcja poziomów mRNA i białek cyklin E oraz E2F1. Co więcej, nastąpiło zahamowanie rozrostu komórek mięśni gładkich w naczyniach wieńcowych i zapobieganie zamknięciu światła naczyń szczególnie intensywnie, kiedy oba rybozymy podawano razem [117].

Rybozymy i DNAzymy próbuje się również wykorzystywać jako narzędzie terapeutyczne do zwalczania wad w chorobach nerwowo-mięśniowych. Przykładem takich wad może być dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1), która jest nerwowo-mięśniową chorobą degeneracyjną, charakteryzującą się obecnością dużej liczby powtórzeń sekwencji CTG położonych w części 3' UTR genu DMPK. Zmutowane transkrypty mRNA genu DMPK zawierające ekspansję sekwencji CUG, gromadzą się w jądrze komórek, tworząc ogniska RNA, które ulegają interakcji z jądrowymi białkami wiążącymi RNA, zapobiegając transportowi RNA z jądra komórki

[118, 119]. Fakt, że większość patomechanizmów choroby obejmuje ogniska zmutowanego RNA i ich interakcje z różnymi białkami wiążącymi, skłonił naukowców do konstrukcji konkretnych rybozymów w celu zniszczenia zmutowanych cząsteczek RNA. Langlois i wsp. zaprojektowali rybozym, który był aktywny wobec miejsca docelowego w UTR 3' mRNA DMPK o sekwencji CUG. Zastosowanie tego rybozymu typu *hammerhead* znacznie zmniejszyło liczbę zmutowanych cząsteczek mRNA-DMPK w jądrach ludzkich mioblastów DM1. Redukcja jądrowego ogniska zmutowanych cząsteczek mRNA DMPK powodowała hamowanie rozwoju choroby [120–127].

Mięśniowy receptor acetylocholinowy (AChR) obecny na złączach nerwowo-mięśniowych odgrywa główną rolę w transmisji sygnałów z nerwów do mięśni. Odkryto szereg charakterystycznych mutacji w obrębie podjednostek genu AChR, które wpływają na funkcje receptora i mogą powodować hamowanie transmisji sygnałów przez kanał związany z receptorem AChR, powodując powstanie wrodzonego zespołu miastenicznego [128]. Abdelgany et al. zaprojektowali rybozym o strukturze *hammerhead*, którego aktywność była skierowana wobec zmutowanych transkryptów mRNA, a których zmutowane produkty białkowe są odpowiedzialne za tworzenie kanałów receptorowych o nieprawidłowej aktywności, wpływających na powstanie wrodzonego zespołu miastenicznego [129]. Zaprojektowane rybozimy były zdolne rozróżnić sekwencję transkryptów mRNA typu dzikiego i zmutowanego, które różnią się tylko jedną substytucją nukleotydu [128]. Zastosowane DNazymy powoduje allelo-specyficzne rozszczepianie transkryptów mRNA, gdzie powstała mutacja w mRNA tworzy przypuszczalne miejsce cięcia dla wiążącego się DNazymu. Allele specyficzne rozszczepienie wykazano w warunkach fizjologicznych, co daje nadzieję na skuteczną terapię tego typu zaburzenia [129].

8.3. Wykorzystanie rybozymów i DNazymów w terapii przeciwwirusowej

Celem działania rybozymów i DNazymów w terapii przeciwwirusowej jest ukierunkowane hamowanie aktywności wirusowych cząsteczek RNA, co objawia się obniżaniem ekspresji genów wirusowych oraz hamowaniem replikacji wirusów wewnątrz komórek gospodarza. Oczywiście efektywne działanie i skuteczna terapia przeciwwirusowa zależy od wielu czynników, które wpływają na właściwe hamowanie ekspresji wirusowych cząsteczek RNA. W chwili obecnej rozwój techniki rybozymów pozwala na ich właściwe planowanie, w którym bierze się pod uwagę dostępność cząsteczki atakowanej do hybrydyzacji komplementarnych sekwencji

oligonukleotydowych. Ważną cechą genomu wirusowego, do którego przyłącza się rybozym, jest duża konserwatywność sekwencji docelowej. Należy wybrać taki region, do którego przyłącza się rybozym w cząsteczce wirusowego RNA, o małej zmienności w sekwencji, gdyż zmiana nawet jednego rybonukleotydu może decydować o wydajności procesu hamowania ekspresji wirusowego RNA [130]. Kolejnym ważnym czynnikiem, który decyduje o wydajności procesu, jest sposób dostarczenia rybozymów do komórek docelowych. Rybozimy, jak wcześniej wskazano, mogą być dostarczane w formie odpowiednio zaprojektowanych wektorów ekspresyjnych, które wewnątrzkomórkowo ulegają transkrypcji lub mogą być wprowadzone bezpośrednio do komórki. W połowie lat 90. wykorzystano wektory retrowirusowe do przenoszenia i dostarczania rybozymów anty-HIV. Komórkami docelowymi wektorów wirusowych z genami rybozymów były wyizolowane od zainfekowanych pacjentów z wirusem HIV-1 limfocyty lub komórki prekursorowe układu krwiotwórczego, które po transdukcji wektorem z rybozymem terapeutycznym ponownie zostały wprowadzane do organizmu pacjenta. Wstępne wyniki wskazują, że modyfikowane genetycznie komórki za pomocą rybozymu posiadają przejściowo zwiększoną przeżywalność w porównaniu z komórkami transdukowanymi wektorem kontrolnym [100]. W innych badaniach wektor retrowirusowy zawierający rybozym *hammerhead* skierowano przeciw regulacyjnym sekwencjom tat genomu wirusa HIV-1 [130]. Limfocyty CD4⁺ pobrane od niezainfekowanych pacjentów zostały poddane transformacji wektorami wirusowymi kodującymi gen odpowiedniego rybozymu. Po namnożeniu w hodowli *ex vivo* transdukowane limfocyty przetoczono do krwiobiegu pacjentów zainfekowanych wirusem HIV. Po wprowadzeniu transdukowanych komórek limfocytów i komórek progenitorowych do krwiobiegu pacjentów, obecność genu terapeutycznego rybozymu i jego transkryptu wykrywa się przez około 2 lat. Michienzi i wsp. wykorzystali w badaniach rybozimy anty HIV-tat i antyHIV-rev [131]. Wektory z powyższymi genami terapeutycznymi były transferowane do prekursorowych hematopoetycznych komórek T. Oporność genetyczna zmodyfikowanych komórek CD34⁺ utrzymywała się około roku. Wyniki te pokazują, że wydajna transdukcja pluripotencjalnych krwiotwórczych komórek macierzystych posiada działanie ochronne wobec infekcji HIV.

W wielu badaniach próbuje się wykorzystać stabilizowane rybozimy w terapii nowotworów wątroby, które wywoływane są wirusowym zapaleniem wątroby typu C (HCV). Zagrożenie, jakie niesie za sobą coraz większe rozprzestrzenianie się wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) jest bodźcem do

Dobrze zdefiniowane mechanizmy komórkowe dotyczące proliferacji komórek i zmian związanych z rozwojem nowotworów na poziomie molekularnym pomogły naukowcom zidentyfikować nowe cele molekularne dla rybozymów i DNAzymów o właściwościach przeciwnowotworowych. Niektóre cele, które przyciągają uwagę nad zastosowaniem rybozymów i DNAzymów w tego typu terapii stanowią geny, których produkty białkowe biorą udział w kaskadach transdukcji sygnałów oraz geny, których ekspresja wpływa na czynniki wzrostu i ich odpowiednie receptory oraz geny indukcji lub progresji nowotworów (np. inaczej onkogenów), czy geny istotne w nowotworzeniu i angiogenezie oraz geny istotne w terapii nowotworów, jak: geny oporności wielolekowej MDR-1 (*multidrug resistance*). Obecnie trwają badania kliniczne nad potencjalnym wykorzystaniem chemicznie modyfikowanych rybozymów i DNAzymów w terapii nowotworów. Większość prowadzonych badań charakteryzuje się dużą skutecznością w fazie przedklinicznej. Niestety badania kliniczne dotyczące rybozymów często nie dają tak dobrych rezultatów jak badania z wykorzystaniem linii komórkowych czy zwierząt doświadczalnych.

coraz intensywniejszych poszukiwań nowych terapeutyków, szczególnie w obliczu braku skutecznej szczepionki. Obecnie stosowane metody leczenia oparte na interferonie i rybawirynie przynoszą zadowalające rezultaty jedynie w 40–60% przypadków infekcji wirusowej. Znaczenie uniwersalnego leku utrudnia duża zmienność genetyczna wirusa HCV i jego możliwości adaptacyjne. W poszukiwaniu terapeutyków nowej generacji skierowanych przeciw wirusowi HCV w ostatnich latach zwrócono uwagę na narzędzia molekularne oparte na kwasach nukleinowych, takie jak: oligomery typu antysens, rybozomy i DNAzomy, a także interferencyjne RNA. Częsteczki te atakują wirusowy genom RNA, wiążąc się do niego bezpośrednio w miejscu przewidzianym regułami parowania zasad Watsona–Cricka. Strategie antywirusowe tego typu charakteryzuje wiele zalet. Po pierwsze, konstruowanie potencjalnych terapeutyków o wysokiej specyficzności oparte jest na znajomości sekwencji nukleotydowej danego wirusa i nie wymaga wcześniejszego poznania funkcji atakowanych genów. Po drugie, inhibicja syntezy nawet jednego ważnego białka wirusowego może zaburzać cykl życiowy wirusa. Ponadto narzędzia molekularne można zaplanować, tak, aby atakując geny wirusowe nie zaburzały genów komórki gospodarza, minimalizując bądź eliminując w ten sposób efekty uboczne terapii [132]. Mimo że każdy rodzaj wirusa można leczyć za pomocą rybozymów przez rozszczepienie istotnego dla wirusów genomu RNA, to szczególnie wirusy z genomem RNA nadają się jako cel terapeutyczny dla tej klasy związków. Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) zawiera w genie nic plus RNA, która nadaje się do tego typu terapii. Przewlekłe zakażenie tym wirusem mogą prowadzić do marskości wątroby, niewydolności wątroby i raka wątrobowo-komórkowego. W celu terapii HCV opracowano rybozym (*Heptazym*), którego aktywność skierowana jest wobec miejsca docelowego w wirusowym regionie od końca 5', który nie podlega translacji, a który jest wysoce konserwatywny.

Heptazym ten hamuje replikację wirusa chimery wirusa HCV/polio, która jest lepiej przystosowana niż natywna forma HCV do namnażania w hodowlach komórkowych [102, 132]. Te zachęcające wyniki doprowadziły do wszczęcia prób klinicznych fazy II z heptazymem osobno i w skojarzeniu z interferonem w terapii przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C. Wstępne wyniki wykazały 10% zmniejszenie poziomów RNA HCV w surowicy pacjentów potraktowanych rybozymem. Wyniki badań toksykologicznych doprowadziły do podjęcia decyzji o przystąpieniu do badań klinicznych nad heptazymem [133].

W przypadku rybozymów skierowanych przeciwko wirusowi HCV konstruuje się cząsteczki rybozymów, których aktywność skierowana jest wobec regionów niekodujących wirusowego RNA. Najczęściej wykorzystywane w tego typu terapii są rybozomy typu *hammerhead*, jednak pomimo ich dużej efektywności w testach prowadzonych w warunkach *in vivo*, żaden z nich nie został wykorzystany jako lek w terapii przeciwko wirusowi HCV. W badaniach przeprowadzonych na oligonukleotydach, jako potencjalne czynniki terapeutyczne skierowane przeciw wirusowi na modelu mysim wykazano natomiast, że aby osiągnąć terapeutyczne stężenie rybozymu, wymagane do efektywnej inhibicji translacji zależnej od elementu IRES wirusa HCV w układzie komórkowym, trzeba było wprowadzić do wątroby jego wielokrotny nadmiar [133]. Jednak wysokie stężenie rybozymu zwiększa prawdopodobieństwo niespecyficznego oddziaływania z białkami i innymi elementami komórkowymi, powodując zaburzenia w jej prawidłowym funkcjonowaniu. Podczas projektowania rybozymów wprowadzane są również zmiany w globalnej architekturze tych cząsteczek. Technika selekcji *in vitro* pozwala na otrzymanie tzw. rybozymów allosterycznych. Rybozomy tego typu posiadają dodatkowe domeny strukturalne, które oddziałując z odpowiednim efektem, np. niskocząsteczkowym związkiem chemicznym lub białkiem, umożliwiają w sposób kontrolowany przełączanie rybozymu z formy nieaktywnej w aktywną [25, 26]. Ciekawym przykładem takiej regulacji jest rybozym HDV typu SOFA (*Specific On/Off Adaptor*), posiadający dodatkowe elementy: sekwencję blokującą oraz biosensor, dzięki którym rybozym jest aktywny jedynie w obecności efektora, którym jest docelowa cząsteczka RNA. Przy braku efektora sekwencja blokująca oddziałuje z regionem rozpoznawania substratu, tworząc odcinek dwuniciowy, co powoduje, że rybozym przyjmuje formę nieaktywną. Biosensorem jest 15-nukleotydowy fragment sekwencji rybozymu komplementarny do sekwencji cząsteczki docelowej. Obecność docelowego RNA powoduje rearanżację struktury rybozymu, który

przechodzi w formę aktywną, zdolną do przecięcia cząsteczki docelowej [130].

Innym przykładem katalitycznych kwasów nukleinowych wykorzystanych w terapii przeciwwirusowej są deoksyrizozymy (DNAzomy) [131]. Ich zwiększona stabilność w środowisku komórkowym w porównaniu do rybozymów, wysoka aktywność oraz szybkość i tania synteza sprawiły, że DNAzomy budzą duże zainteresowanie badaczy. Do tej pory ukazało się tylko kilka publikacji przedstawiających próbę wykorzystania DNAzomów w ukierunkowanej hydrolizie RNA wirusa HCV. DNAzym Dz858-4-OMe, zawierający dodatkowe grupy 2'-O-metylu w obrębie ramion wiążących substrat, powodował w komórkach wątrobowych 63% redukcję ilości RNA wirusa HCV i obniżenie ekspresji poziomu białka płaszcza wirusa o 87%. Udało się otrzymać DNAzomy, które efektywnie blokowały translację zależną od elementu IRES HCV w układzie *in vitro*, jak również w systemie komórkowym (37). Podjęto także próby zaprojektowania DNAzomów przeciwko 3'-terminalnemu regionowi wirusa HCV. Jednakże spośród siedmiu zbadanych DNAzomów tylko jeden wykazywał aktywność katalityczną prowadzącą do obniżenia o około 20% poziomu RNA w warunkach *in vitro*. Zwiększanie ilości DNAzomu nawet do 2000-krotnego nadmiaru nie wpłynęło na efektywność cięcia cząsteczki docelowej [133]. Wreszcie, DNAzomy zostały wykorzystane w terapii japońskiego wirusa zapalenia mózgu (JEV). Wirus ten należy do flawiwirusów zawierających jednoniciowy genom RNA, o regionach niekodujących z końcami 5' i 3'. Niekodujące sekwencje flawiwirusowe to regiony wysoce konserwatywne, które są ważne dla replikacji wirusa [134]. W badaniach wykazano, że cząsteczki DNAzomów są zdolne do ukierunkowanej degradacji wirusowego, genomowego RNA, powodując hamowanie replikacji wirusa na modelach zwierzęcych. Wewnątrzmozgowe podawanie DNAzomu zakażonym myszom prowadzi do hamowania replikacji wirusa o około 99%, powodując przedłużenie żywotności lub całkowite wyleczenie zainfekowanych zwierząt [134]. Wszystkie badania kliniczne wykazały, że rybozomy i DNAzomy były dobrze tolerowane i że ich zastosowanie u ludzi jest bezpieczne. Liczne badania wskazują, że rybozomy i DNAzomy skutecznie hamują ekspresję wielu genomów wirusowych i mogą być stosowane w leczeniu wielu chorób spowodowanych przez ekspresję szkodliwych genów wirusowych.

8.4. Rybozomy i deoksyrizozymy w terapii nowotworów

Niedawno zdefiniowane mechanizmy komórkowe dotyczące proliferacji komórek i zmian związanych z rozwojem nowotworów na poziomie

molekularnym pomogły naukowcom zidentyfikować nowe cele molekularne dla rybozymów i DNAzomów o właściwościach przeciwnowotworowych. Niektóre cele, które przyciągają uwagę nad zastosowaniem rybozymów w tego typu terapii stanowią geny, których produkty białkowe biorą udział w kaskadach transdukcji sygnałów oraz geny, których ekspresja wpływa na czynniki wzrostu i ich odpowiednie receptory oraz geny indukcji lub progresji nowotworów (np. inaczej onkogenów), czy geny istotne w nowotworzeniu i angiogenezie oraz geny istotne w terapii nowotworów, jak geny oporności wielolekowej MDR-1 (*multidrug resistance*). Obecnie trwają badania kliniczne nad potencjalnym wykorzystaniem chemicznie modyfikowanych rybozymów w terapii nowotworów. Większość prowadzonych badań charakteryzuje się dużą skutecznością w fazie przedklinicznej. Niestety badania kliniczne dotyczące rybozymów często nie dają tak dobrych rezultatów, jak badania z wykorzystaniem linii komórkowych czy zwierząt doświadczalnych, a żaden z testowanych terapeutów nie przeszedł do tej pory pozytywnych testów klinicznych, jedynie badania nad deoksyrizozymami przyniosły już pewne wymierne efekty terapeutyczne [135].

8.4.1. Rybozomy w terapii nowotworów

Rozwój nowotworów jest skutkiem szeregu zaburzeń genetycznych, które mogą być celem terapii dla rybozymów. Ze względu na złożony i wielokierunkowy proces kancerogenezy rybozomy są wykorzystywane do blokowania wielu dróg ekspresyjnych, których blokowanie hamuje procesy nowotworzenia. Rybozomy typu *hammerhead* są skuteczne w ograniczaniu ekspresji mRNA onkogenów, takich jak *ras*, *bcr-abl* w hodowlach komórkowych w wyniku transformacji komórek za pomocą wektorów wirusowych transportujących geny rybozomów [135]. Przed wprowadzeniem technologii rybozymów do terapii przeciwnowotworowej przeprowadzano również ich szczegółowe badania na modelach zwierzęcych. Wszystkie rybozomy działają poprzez hamowanie ekspresji genów według mechanizmów antysensownych. W celu wprowadzenia technologii rybozymów do terapii badano szereg mechanizmów dostarczania rybozymów do konkretnych tkanek i guzów nowotworowych za pomocą odpowiednich wektorów ekspresyjnych. Nowotwory są szybko rosnącymi tkankami z wysokim popytem na tlen i składniki odżywcze, a powstawanie nowych naczyń krwionośnych podczas angiogenezy jest niezbędnym procesem stymulującym rozrost guza i tworzenie przerzutów. Dobrym przykładem działania rybozymów na tym etapie jest Angiozym, hamujący ekspresję receptora o aktywności kinazy tyrozynowej Flt-1, który

rozpoznaje czynnik wzrostu śródbłonna naczyń krwionośnych (VEGFR) [135]. Uzasadnieniem terapeutycznego działania tego rybozymu jest blokowanie angiogenezy, a zatem ograniczenie dopływu krwi do guza nowotworowego. Synteza rybozymu anty-VEGF obniża ekspresję receptora VEGF w komórkach transfekowanych i blokuje proliferację naczyń krwionośnych na modelu angiogenezy. Właściwości farmakokinetyczne tego rybozymu badano na myszach. Badania farmakokinetyczne wykazały, że rybozym ten jest eliminowany w ciągu 30 minut od podania dootrzewnowego lub podskórnego, angiozym ten może być wykrywany w surowicy przez ponad 2 godziny i gromadzony na poziomie terapeutycznym w nerkach i mięśniach szkieletowych do 24 godzin od czasu wstrzyknięcia podskórnego. Sprawdzenie bezpieczeństwa, tolerancji i farmakokinetyki angiozymu odbyło się na etapie I fazy badań klinicznych [136]. W badaniach wykazano, że rybozym ten utrzymuje się w osoczu pacjentów w ciągu kilku godzin po podaniu pojedynczej dawki [87]. Rybozym powyższy był dobrze tolerowany i został następnie przebadany w II fazie badań klinicznych u pacjentów z rakiem piersi, a także w połączeniu z chemioterapią u pacjentów z przerzutem raka jelita grubego. Angiozym w II fazie badań klinicznych testowany był u pacjentów z nowotworem sutka i okrężnicy. U 25% osób z późnymi formami nowotworów po półrocznym podawaniu rybozymu zaobserwowano zahamowanie wzrostu nowotworu. Obecnie próbuje się stosować angiozym łącznie z chemioterapią.

Kolejnym badanym rybozymem testowanym przez firmę MedizyneTM Pharmaceuticals był rybozym HERZYM®. Jego działanie polega na degradacji mRNA ludzkiego receptora o aktywności kinazy tyrozynowej (HER-2), rozpoznającego czynnik wzrostu naskórka (EGFR). Nadekspresja HER-2 obserwowana jest w nowotworach piersi, jajnika, płuc, krwi i prostaty [136]. Rybozym ten w fazie I badań klinicznych był dobrze tolerowany, bez istotnych ogólnoustrojowych działań niepożądanych. Wszystkie badania kliniczne wykazały, że rybozym ten jest dobrze tolerowany i jego zastosowanie jest bezpieczne u ludzi. Badania wskazują, że rybozymy skutecznie hamują ekspresję i mogą być stosowane w leczeniu chorób spowodowanych przez ekspresję szkodliwych genów oraz mogą skutecznie zapobiegać wzrostowi guzów nowotworowych. Następny rybozym to MAXIZYME®, który jest wprowadzany do komórek nowotworowych za pomocą wektorów retrowirusowych pod kontrolą promotora tRNA-Val. Rybozym ten zawiera tzw. ramię sensorowe, które po rozpoznaniu sekwencji miejsca splicingu mRNA genów *bcr*, prowadzi do degradacji onkogennej mRNA. Rybozym ten może być wykorzystywany do naprawy szpiku kostnego pobranego

od pacjentów z przewlekłą białaczką szpikową, który następnie ponownie wszczepia się pacjentom [133]. Preparat MAXIZYME® próbuje się również wykorzystać do degradacji mRNA zmutowanej formy genu p53. Mutacja w kodonie 249 tego genu (AGG na AGT) występuje u około 50% ludzi chorych na raka wątroby [137].

Ważnym zastosowaniem rybozymów są próby ich wykorzystania do hamowania aktywności telomerazy. W komórkach nowotworowych obserwowana jest bardzo wysoka ekspresja tego enzymu. Rybozym przecinający sekwencję mRNA telomerazy sprawdzono na organizmach doświadczalnych, którymi były myszy chore na czerniaka. U zwierząt, którym za pomocą kationowych liposomów wprowadzono rybozym mRNA-telomerazy, ekspresja telomerazy w komórkach nowotworowych zmniejszyła się o ok. 75%, co spowodowało znaczne zmniejszenie liczby przerzutów w stosunku do grupy kontrolnej [135]. W przypadku niektórych chemioterapeutyków występuje wysoka efektywność w leczeniu nowotworów na zwierzętach, ale znacznie mniejsza efektywność u ludzi. Przykładem mogą być leki z grupy chloroetylonitrozomocznika (CENU). Oporność na te leki spowodowana jest obecnością czynników chroniących ludzkie komórki nowotworowe przed cytotoksycznymi efektami alkilacji DNA, np. O-6-metyloguaninowa metylotransferaza DNA- MGMT. Ekspresja MGMT występuje w przypadku 80% ludzkich nowotworów. Zahamowanie ekspresji tego enzymu uwrażliwia ludzkie komórki nowotworowe na CENU. W sekwencji mRNA MGMT zlokalizowano trzy potencjalne miejsca cięcia dla rybozymów – tj. nukleotydy 161, 178 i 212. Aktywność rybozymów degradujących mRNA MGMT wykazano w komórkach linii HeLa. Z komórek tej linii uzyskano klonny ze stabilną ekspresją rybozymów i wrażliwością na CENU [134].

Glejak należą do najczęściej występujących złośliwych guzów w OUN i mimo chemioterapii wielu pacjentów umiera w ciągu pierwszego roku choroby. Z tego względu próbuje się w terapii tych nowotworów wykorzystać rybozymy i DNAzy do ukierunkowanej strategii RNA. W komórkach zmienionych nowotworowo (w glejakach) następuje wzrost wydzielania czynnika wzrostu plejotrofiny (PTN). Grzelinski i wsp. wykazali na dwóch liniach komórkowych czerniaka, U87 i T98G, że stabilny rybozym może powodować wyraźne zmniejszenie transkrypcji PTN mRNA i ekspresji białka PTN [135]. Dalsze badania wykazały, że redukcja transkrypcji PTN mRNA i poziomu białka PTN powoduje zmniejszenie migracji i tworzenia kolonii w obu liniach komórkowych glejaka [136]. W przypadku zastosowania tej samej strategii na modelu myszy wzrost guza i angiogeneza były znacznie

zmniejszone, a w surowicy poziomy PTN uległy znacznemu spadkowi [136]. Innym przykładem może być rybozym typu *hairpin* zaprojektowany, aby „przecinać” sekwencje mRNA receptora czynnika wzrostu naskórka (EGFR), w którego genie występuje delecja 801 pary zasad. (tzw. EGFRvIII) [136]. Taka zmutowana forma receptora występuje w ponad 50% glejaka wielopostaciowego. Testowano trzy wersje rybozymu, do dalszych badań wybrano jedną, oznaczoną symbolem sCYMV1. Rybozym ten ograniczał proliferację komórek glejaka (linii U87MG-ΔEGFR) o 69%. W badaniach nad glejakiem do syntezy katalitycznego RNA użyto tzw. kasety ekspresyjnej U1 [137]. Zapewnia ona wyższą stabilność rybozymu oraz jego dostarczenie do jądra komórkowego. U myszy, którym do komórek nowotworowych wprowadzono kasetę U1 z sekwencją rybozymu nastąpiło zahamowanie wzrostu komórek nowotworowych. Zaobserwowano także zmniejszoną angiogenezę (tworzenie nowych naczyń krwionośnych) oraz odblokowanie niektórych szlaków apoptozy (programowanej śmierci komórki). Podobne pozytywne wyniki uzyskano w przypadku nowotworu piersi (linia komórkowa MDA MB 231 oraz myszy) i nowotworu prostaty (linie PC3-NL4) [137].

8.4.2. Deoksyrybozymy w terapii nowotworów

Równolegle do badań nad wykorzystaniem rybozymów w terapii nowotworów prowadzone są badania nad wykorzystaniem deoksyrybozymów. Tak jak w przypadku rybozymów, próbuje się wykorzystać strategię mającą na celu hamowanie rozwoju nowotworów na skutek przeciwdziałania angiogenezie. Nieunaczyniony nowotwór nie jest zaopatrywany w składniki odżywcze, przez co obumiera. Stąd ważnymi celami terapeutycznych deoksyrybozymów są m.in. transkrypty (mRNA) kodujące receptory dla czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGFR1 i VEGFR2), które odgrywają ważną rolę w angiogenezie i w powstawaniu naczyń krwionośnych w zmienionej tkance nowotworowej. W badaniach na kulturach komórkowych, a następnie na modelach zwierzęcych udowodniono, że odpowiednie cząsteczki katalitycznego DNA mają zdolność hamowania procesów powstawania nowych naczyń krwionośnych [138]. W przypadku przewlekłej białaczki szpikowej (CML), spowodowanej wadliwą translokacją genów, prowadzącą do powstania chromosomu typu Filadelfia, za pomocą deoksyrybozymów próbuje się hamować ekspresję genu fuzyjnego *bcr-abl*. Produktem genu *bcr-abl* są dwa patogenne mRNA (b2a2 i b3a2). Wewnątrzkomórkową aktywność deoksyrybozymów badano na specjalnej linii komórkowej HeLa. Do badań użyto konstrukt

zawierający gen *bcr-abl* i gen reporterowy kodujący lucyferazę (jest to marker genetyczny – lucyferaza katalizuje reakcję utleniania lucyferyny, podczas której emitowane jest światło). Aktywność deoksyrybozymów wykazano również w układach in vivo, badając ekspresję endogennego genu *bcr-abl* w komórkach pobranych od pacjentów z chrońniczną białaczką szpikową (BV173, K562 i CD34+). W celu zwiększenia odporności na degradację nukleolityczną do cząsteczek deoksyrybozymów wprowadzono odpowiednie modyfikacje [139]. Zastosowano modyfikację 2'-OMe dla końcowych nukleozydów oraz zmieniono skrajne wiązania fosforanowe oligonukleotydu na wiązania tiofosforanowe (PS). Modyfikowane deoksyrybozymy 2'-OMe wykazywały wysoką specyficzność w inaktywacji ekspresji genu *bcr-abl* oraz wywoływały apoptozę (śmierć komórek według zapisanego w nich programu) komórek BV173. Deoksyrybozymy hamowały ekspresję zarówno genu *bcr-abl*, jak i normalnego *abl*. W niektórych komórkach nowotworowych obserwowana jest nadekspresja (zwiększona produkcja) izoformy α kinazy białkowej C (PKCα). Wykazano, że modyfikowany deoksyrybozym skutecznie, w ok. 80%, hamuje syntezę PKCα w komórkach T98G (komórki ludzkiego nowotworu mózgu) i proliferację nowotworowych komórek T47D DMS 273, THX i T98G. Wykazano także wewnątrzkomórkową aktywność deoksyrybozymów skierowanych na mRNA białka c-myc, co powoduje hamowanie proliferacji szczurzych komórek mięśni gładkich (SMC) [140].

Pomimo pozytywnych wyników osiąganych w badaniach nad terapią nowotworów przez deoksyrybozymy z wykorzystaniem kultur komórkowych i modeli zwierzęcych, przez długi okres brak było danych na temat działania tych cząsteczek w organizmie ludzkim. Przełomem okazał się lek „Dz 13”, który jest pierwszym deoksyrybozymem dopuszczonym do badań klinicznych, który przeszedł pozytywnie badania na ludziach. Katalityczny DNAzym 13 został zaprojektowany do leczenia czerniaka (*basal cell carcinoma*, BCC), będącego najczęstszym złośliwym nowotworem skóry. W jego komórkach ulega ekspresji czynnik transkrypcyjny c-Jun, który w zdrowych komórkach skóry występuje w dużo mniejszych ilościach. Stąd wybór tego genu, a konkretnie kodującej go cząsteczki mRNA, na cel dla działania deoksyrybozymu 13. Deoksyrybozym (Dz13) skierowany wobec sekwencji mRNA czynnika

Rybozymy i DNA-zyzy
próbuje się wykorzystać
w terapii przeciwwirusowej,
a celem zastosowania tych
wiązków w tego typu terapii
jest blokowanie replikacji
wirusowych RNA, zwłaszcza
retrowirusów, takich jak:
HIV-1, wirusa zapalenia
wątroby typu C i wirusa
zapalenia wątroby typu B.
Genomy tych wirusów
zawierają RNA, a rybozymy
i DNAzyzy wykazują
zdolność bezpośredniego
hamowania replikacji
wirusowego RNA na skutek
specyficznej hydrolizy.

transkrypcyjnego c-Jun okazał się skuteczny w hamowaniu rozwoju czerniaka u myszy. W powstawaniu nowych naczyń krwionośnych bierze udział białko c-Jun. U myszy chorych na czerniaka, którym podawano deoksyrybozym skierowany przeciwko sekwencji mRNA c-Jun zaobserwowano zahamowanie wzrostu nowotworu w ponad 60% przypadków. Efekt ten związany był ze znacznym zmniejszeniem się liczby naczyń krwionośnych „zasilających” komórki nowotworowe [140]. W badaniach klinicznych wstrzykiwano pacjentom cząsteczkę deoksyrybozymu 13 w różnych dawkach (10–100 µg), a następnie sprawdzano efekt po 7–28 dniach od iniekcji. W badaniach skupiono się na pomiarze bezpieczeństwa i tolerancji pacjentów na ten lek. Nie zaobserwowano znaczących efektów ubocznych ani rozprzestrzeniania się cząsteczki deoksyrybozymu 13 do zdrowych komórek. Wyniki badań pierwszej fazy, poprzedzone badaniami toksykologicznymi na zwierzętach, potwierdziły brak toksycznego wpływu deoksyrybozymu na organizm człowieka. Ponadto u pacjentów zaobserwowano znaczne zahamowanie ekspresji białka c-Jun oraz zahamowanie wzrostu nowotworu. Ze względu na pozytywne wyniki pierwszej fazy badań klinicznych z użyciem cząsteczki Dz13, wkrótce powinien rozpocząć się kolejny etap testowania cząsteczki na ludziach (tabela 2).

8.5. Inne zastosowanie rybozymów i DNAzymów

Rybozomy mogą być stosowane w badaniach molekularnych związanych z funkcją, regulacją i ekspresją genów. Zapewniają one unikalne narzędzie do zrozumienia funkcji genów, ponieważ pozwalają na ocenę komórkowej odpowiedzi na ekspresję odpowiedniego genu docelowego [141].

Są one również wyjątkowe, ponieważ mogą posłużyć do inaktywacji specyficznej ekspresji danego genu, a tym samym mogą być stosowane do identyfikacji funkcji białek lub roli danych genów w funkcjonalnej kaskadzie metabolicznej. W porównaniu do innych metod terapeutycznych typu interferencja siRNA czy użycie techniki antysens przy wykorzystaniu zwierząt transgenicznych, rybozomy oferują łatwość projektowania i ich użytkowania [142]. Zastosowanie konwencjonalnej technologii rybozymu pozwoliło na uzyskanie ważnych informacji dotyczących opracowania odpowiednich celów w terapii nowotworów, zapaleniu stawów, infekcji wirusowych i innych chorób. Istnieją również dane, że będzie można wykorzystać niektóre rybozomy do zwiększenia wrażliwości na środki indukujące apoptozę [143].

W przypadku DNAzymów spektrum ich zastosowania jest bardzo szerokie, począwszy od biologii molekularnej, nanotechnologii i medycyny. W laboratorium DNAzomy stanowią przede wszystkim alternatywę dla enzymów białkowych, w szczególności, kiedy niemożliwa jest kataliza z użyciem enzymu proteinowego. Przykładem może być ligacja dwóch fragmentów RNA zawierających modyfikacje w postaci wolnych rodników (znaczników spinowych), niezbędnych do badań strukturalnych z zastosowaniem spektroskopii EPR (spektroskopia elektronowego rezonansu paramagnetycznego). Połączenie tych cząsteczek przy pomocy ligazy faga T4 wymaga użycia DTT (ditiotritolu), który redukuje znaczniki spinowe, powodując ich dezaktywację. Problem ten z powodzeniem można rozwiązać, zastępując enzym białkowy DNAzymem. Ponadto przewagą enzymów DNA nad białkowymi jest ich cena (są nieporównywalnie tańsze od enzymów proteinowych) oraz fakt, że nie ulegają nieodwracalnej denaturacji. Po skończonej reakcji

Tabela 2. Strategie wykorzystania rybozymów i DNAzymów w terapii

Rybozym/DNAzym	Choroba	Gen docelowy
Rybozym <i>hammerhead</i>	restenoza mięśni gładkich naczyń krwionośnych	lipooksygenaza typu 12 leukocytów
Rybozym <i>hammerhead</i>	restenoza mięśni gładkich naczyń krwionośnych	protoonkogen <i>c-myc</i>
Rybozym <i>hammerhead</i>	restenoza mięśni gładkich naczyń krwionośnych	cyklina E i cyklina E2F1
Rybozym <i>hammerhead</i>	dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1)	zmutowany gen DMPK
Grupa I intron rybozymu	dystrofia miotoniczna typu 1 (DM1)	zmutowany gen DMPK
Rybozym <i>hammerhead</i>	zespół miasteniczny	receptor acetylocholino (AChR)
DNAzym	zespół miasteniczny	receptor acetylocholino (AChR)
DNAzym	choroba Huntingtona	gen Huntingtyny (HTT)
Rybozym <i>hammerhead</i>	choroby Alzheimera	b-sekretaza
Rybozym <i>hammerhead</i>	choroby Alzheimera	dihydroliipoamido succinyltransferaza (DLST)
Rybozym <i>hammerhead</i>	choroba Parkinsona	a-synukleina
Rybozym <i>hammerhead</i>	glejaki	plejotrofina (PTN)
Rybozym <i>hammerhead</i>	zapalenie mózgu	RNA wirusa (WEP) zapalenia mózgu

można te cząsteczki wyizolować i użyć ponownie [144]. Intensywne badania prowadzone są obecnie w kierunku optymalizacji działania deoksyrybozymów w żywych komórkach, zarówno bakteryjnych, jak i eukariotycznych. DNAzy mają potencjał do powiększenia grupy narzędzi służących do modyfikacji lub degradacji konkretnego DNA lub RNA związanego, np. z niepożądanymi genami. Wiadomo również, że katalityczne DNA mogą być użyte do wizualizacji bakteryjnego RNA (16S rRNA), z limitem detekcji na poziomie 12,5 ng. Co więcej, można w ten sposób odróżnić bakterie chorobotwórcze od spokrewnionych bakterii niepatogennych. Wspomniana sonda zbudowana jest z dwóch deoksyrybozymów, z czego jeden wykazuje aktywność peroksydazy. Po rozpoznaniu odpowiedniej sekwencji bakteryjnego RNA aktywność oksydacyjna zostaje uruchomiona, w wyniku czego następuje utlenienie bezbarwnej reporterowej cząsteczki organicznej do formy, w której wykazuje ona barwę niebieskozieloną. Jeżeli próbki roztworu naniesione zostaną na płytkę TLC, zmiany stężenia bakteryjnego RNA mogą zostać rozpoznane nawet gołym okiem [145].

9. Podsumowanie

Rybozomy i DNAzy należą do fascynującej klasy makrocząsteczek biologicznych, których badania wskazują na możliwość ich szerokiego zastosowania w nadchodzącej przyszłości jako nową klasę terapeutycznych cząsteczek. Ich naturalne właściwości i mechanizmy aktywności komórkowej są intensywnie badane, a specyficzne działania w oparciu o daną sekwencję czynią te cząsteczki elastycznymi środkami służącymi do eliminowania lub naprawy ekspresji genów patologicznych w wielu typach komórek, takich jak neurony czy komórki mięśniowe. Aby jednak wprowadzić tego typu terapię do powszechnego użytku, potrzebne są badania w kierunku opracowania bezpiecznego i skutecznego dostarczania tych cząsteczek do komórek docelowych. W tym celu próbuje się wykorzystać wektory wirusowe i niewirusowe jako sposoby dostarczania rybozymów do określonych tkanek i komórek wewnątrz organizmu. Wśród tych metod wydaje się, że strategię opartą na wektorach wirusowych są najbardziej obiecującymi i skutecznymi metodami dostarczania rybozymów do komórek docelowych. Istnieje nadzieja, że dzięki rozwojowi tych sposobów dostarczania rybozymów będzie można opracować ukierunkowane precyzyjne systemy ekspresyjne, które będą wykorzystywane jako środki biofarmaceutyczne w terapii. W chwili obecnej próbuje się zastosować te cząsteczki do hamowania infekcji wirusowych, procesów nowotworzenia. Katalityczne

kwasy nukleinowe próbuje się również wykorzystać w terapii chorób, takich jak: płaszczyca Huntingтона i choroba Alzheimera. Lista możliwych zastosowań rybozymów i deoksyrybozymów jest długa. Powstaje jednak pytanie, czy strategię rybozymu i DNAzymów będą mogły skutecznie konkurować z niedawno opracowaną technologią interferencji RNA (RNAi). Technologia interferencji RNA wykorzystuje wewnątrzkomórkowy mechanizm hamowania ekspresji genów i charakteryzuje się niezwykle wysoką wydajnością tego procesu. Jednak wiele badań wskazuje, że stosowanie małego interferującego RNA (siRNA) może powodować niepożądane skutki uboczne, związane z indukowaniem odpowiedzi interferonowej oraz hamowaniem aktywności mikro RNA. Zatem jest bardzo ważne, aby wyjaśnić, czy małe interferujące RNA mogą być stosowane jako środki terapeutyczne przy akceptowalnym ryzyku wystąpienia działań niepożądanych. Strategię rybozymów i cząsteczek antysens można traktować jako uzupełniające się podejścia w celu hamowania ekspresji niepożądanych genów. Wydaje się również, że połączenie technologii siRNA i rybozymów może być obiecującym kierunkiem leczenia infekcji wirusowych, takich jak HIV-1, które charakteryzuje się pojawianiem częstych mutacji w czasie długotrwałego leczenia. Sugeruje się, że włączenie sekwencji rybozymów i siRNA hamujących ekspresję wielu składników wirusa w obrębie jednego wektora może być skutecznym narzędziem w terapii przeciwwirusowej HIV-1. Rybozomy i DNAzy posiadają duży potencjał blokowania ekspresji zmutowanych genów, których ekspresja powoduje powstanie wielu chorób genetycznych. Z tego względu wykorzystanie katalitycznych cząsteczek RNA i DNA może być cennym narzędziem terapeutycznym do hamowania mechanizmów powstawania różnorodnych chorób genetycznych, wirusowych i nowotworowych.

Otrzymano: 2018.03.16 · Zaakceptowano: 2018.04.10

Piśmiennictwo

1. Kawasaki H., Wadhwa R., Taira K.: "World of small RNAs: from ribozymes to siRNA and miRNA." *Differentiation*, 2004, 72: 58–64.
2. Tanner N.K.: Ribozymes: the characteristics and properties of catalytic RNAs. *FEMS Microbiol. Rev.* 1999, 23: 257–275.
3. Mueller D., Stahl U., Meyer V.: Application of hammerhead ribozymes in filamentous fungi. *J. Microbiol. Meth.* 2006, 65: 585–595.
4. Gaughan D.J., Whitehead A.S.: Function and biological applications of catalytic nucleic acids. *Biochim. Biophys. Acta.* 1999, 1445: 1–20.
5. Rossi J.J.: Ribozymes to the rescue: repairing genetically defective mRNAs. *Trends Genet.* 2000, 14: 295–298.
6. Nawrot B.: Selekcja kwasów nukleinowych, *Wiadomości Chemiczne*. 2000, 54: 616–636.
7. Nawrot B.: Katalityczne DNA- deoksyrybozomy. *Postępy Biochemii*. 2002, 48: 20–34.
8. Adamawa K., Pikula S.: Hipotetyczna rola autokatalitycznych właściwości kwasów nukleinowych w procesie biogenezy. *Kosmos Problemy Nauk Biologicznych*. 2004, 53 (2): 123–131.

9. Tanaka K., Yamada T., Ohyagi Y.: Suppression of transthyretin expression by ribozymes: a possible therapy for familial amyloidotic polyneuropathy. *J. Neurol. Sci.* 2001, 183: 79–84.
10. Lilley D.M.: Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005, 15: 313–323.
11. Kijima H., Ishida H., Ohkawa T.: Therapeutic applications of ribozymes. *Pharmacol. Ther.* 2005, 68: 247–267.
12. Lewin A.S., Hauswirth W.W.: Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 2004, 7: 221–228.
13. Bramlage B., Luzi E., Eckstein F.: Designing ribozymes for the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol.* 2003, 16: 434–438.
14. Phylactou L.A., Kilpatrick M.W.: Ribozymes as therapeutic tools for genetic disease. *Hum. Mol. Genet.* 1998, 7: 1649–1653.
15. Welch P.J., Barber J.R., Wong-Staal F.: Expression of ribozymes in gene transfer systems to modulate target RNA. *Pharmacophore.* 2012, 3: 164–178.
16. Jason T.L., Koropatnick J., Berg R.W.: Toxicology of antisense therapeutics. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2004, 201: 66–83.
17. Merdan T., Kopecek J., Kissel T.: Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, 54: 715–758.
18. Konopka K., Rossi J.J., Swiderski P.: Delivery of an anti-HIV-1 ribozyme into HIV-infected cells via cationic liposomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001, 1372: 55–68.
19. Khan A.U.: Ribozyme: a clinical tool. *Clin. Chim. Acta.* 2006, 367: 20–27.
20. Hajdziona M., Molski A.: Enzymologia pojedynczych cząstek RNA: wykorzystanie techniki FRET w badaniach związania się i dynamiki konformacyjnej rybozymów. *Wiadomości Chemiczne.* 2010, 64 (3–4): 173–193.
21. Silverman S.K.: Catalytic DNA (deoxyribozymes) for synthetic applications – current abilities and future prospects, *Chem. Commun.* 2008, 13: 123–134.
22. Pan G., Clawson G.A.: Catalytic DNazymes: derivations and functions, *Expert Opin. Biol. Ther.* 2008, 20: 23–39.
23. Chinnappen D., Sen D.: A deoxyribozyme that harnesses light to repair thymine dimers in DNA. *PNAS.* 2004, 12: 23–39.
24. Chandrasekar C., Silverman S.K.: Catalytic DNA with phosphatase activity. *PNAS.* 2013, 34: 45–55.
25. Szala St. *Terapia genowa.* Wydawnictwo Naukowe PWN, 2003, Warszawa.
26. Barańska M., Skrętowicz J.: Perspektywy terapii genowej. *Wiadomości Lekarskie* 2007, 60 (7–8): 305–311.
27. Patil S.D., Rhodes D.G., Burgess D.J.: DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review, *The AAPS Journal.* 2005, 7: 61–77.
28. Navani N.K., Li Y.: Nucleic acid aptamers and enzymes as sensors. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006, 10: 272–281.
29. Fiammengo R., Jaschke A.: Nucleic acid enzymes. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005, 16: 614–621.
30. Bhindi R., Fahmy R.G.: DNA enzymes, siRNA, and the emerging wave of small-molecule nucleic acid-based gene silencing strategies. *Am. J. Pathol.* 2007, 171: 1079–1088.
31. Tinoco I.: RNA enzymes: putting together a large ribozyme. *Curr. Biol.* 2000, 6: 1374–1376.
32. Boado R.J.: Brain-derived peptides regulate the steady state levels and increase stability of the blood-brain barrier GLUT1 glucose transporter mRNA. *Neurosci. Lett.* 2000, 197: 179–182.
33. Sriram B., Thakral D., Panda S.K.: Targeted cleavage of hepatitis E virus 3'–end RNA mediated by hammerhead ribozymes inhibits viral RNA replication. *Virology.* 2003, 312: 350–358.
34. Mulhbach J., St-Pierre P., Lafontaine D.A.: Therapeutic applications of ribozymes and riboswitches, *Curr. Opin. Pharmacol.* 2010, 10: 551–556.
35. Biondi E., Branciamore S., Fusi L.: Catalytic activity of hammerhead ribozymes in a clay mineral environment: implications for the RNA world. *Gene.* 2007, 389: 10–18.
36. Steece-Collier K., Maries E.: Etiology of Parkinson's disease: Genetics and environment revisited. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99: 13972–13974.
37. Maries E., Dass B., Collier T.J.: The role of alpha-synuclein in Parkinson's disease: Insights from animal models. *Nat. Rev. Neurosci.* 2003, 4: 727–738.
38. Hayashita-Kinoh H., Yamada M., Yokota T.: Down-regulation of alpha-synuclein expression can rescue dopaminergic cells from cell death in the substantia nigra of Parkinson's disease rat model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006, 341: 1088–1095.
39. Onuki R., Bando Y., Suyama E.: An RNA-dependent protein kinase is involved in tunicamycin-induced apoptosis and Alzheimer's disease. *EMBO J.* 2004, 23: 959–968.
40. Spillantini M.G., Schmidt M.L., Lee V.M.: Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature.* 1997, 388: 839–840.
41. Selkoe D.J.: Alzheimer's disease. In the beginning. *Nature.* 2004, 354: 432–433.
42. Michienzi A., Castanotto D.: RNA decoy, and siRNA approaches to inhibition of HIV in a gene therapy setting. *Clin. Appl. Immunol.* 2008, 3: 223–233.
43. Christiansen J.K., Lobedanz S.: LNA nucleotides improve cleavage efficiency of singular and binary hammerhead ribozymes. *Bioorg. Med. Chem.* 2007, 15: 6135–6143.
44. Flaherty K.M., McKay D.B.: The development of hammerhead variants that cleave target RNA molecules in trans. *Nature.* 1995, 239: 456–466.
45. Conaty J., Hendry P., Lockett T.: The hammerhead ribozyme. *Nucleic Acids Res.* 2001, 27(11): 2400–2407.
46. Heidenreich O., Benseler F.: High activity and stability of hammerhead ribozymes containing 2'-modified pyrimidine nucleosides and phosphorothioates. *J. Biol.* 2003, 269: 2131–2136.
47. Schubert S., Kurreck J.: Ribozyme and deoxyribozyme – strategies for medical applications. *Curr. Drug Targets.* 2004, 5: 667–681.
48. Ferré-D'Amaré A. R.: The hairpin ribozyme. *Biopolymers.* 2004, 73(1): 71–78.
49. DeYoung M.B., Siwkowski A.M., Lian Y.: Hairpin motives, isolated from different satellite viruses. *Biochemistry.* 1995, 34(48): 15785–15791.
50. Scott W.G.: Ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2007, 17: 280–286.
51. Dunn W., Liu F.: Bacterial and eukaryotic RNase P. *Methods Mol. Biol.* 2004, 252: 425–436.
52. Trang P., Kim K., Liu F.: RNase P ribozymes for therapeutic purposes. *Cell Microbiol.* 2004, 6(6): 499–508.
53. Phylactou L.A.: Ribozyme and peptide nucleic acid-based gene therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, 44: 97–108.
54. Fiskaa T., Birgisdottir A.B.: RNA reprogramming and repair based on trans-splicing group I ribozymes. *New Biotechnol.* 2010, 27: 194–203.
55. Kohler U., Ayre B.G., Goodman H.M.: Trans-splicing ribozymes for targeted gene delivery, *Mol. Biol.* 2004, 285: 1935–1950.
56. Puerta-Fernandez E., Romero-Lopez C.: Ribozymes: recent advances in the development of RNA tools, *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 27: 75–97.
57. Schlatterer J.C., Greenbrae N.L.: Specificity of Mg²⁺ binding at the group II intron branch site, *Biophys. Chem.* 2008, 136: 96–100.
58. Ferré-D'Amaré A.R.: Use of a coenzyme by the glmS ribozyme-riboswitch suggests primordial expansion of RNA chemistry by small molecules. *Phil. Trans. R. Soc.* 2011, 366: 2942–2948.
59. Santoro S.W., Joyce G.F.: DNazymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997, 94(9): 4262–4266.
60. Zaborowska Z., Furst J.P., Erdmann V.A.: The most active DNazymes. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(43): 40617–40622.
61. Santoro S.W., Joyce G.F.: The kinetic properties of 10–23 DNazymes. *Biochemistry.* 1998, 37(38): 13330–13342.
62. Joyce G.F.: DNzyme as an antiviral agent either directly targeting HIV-1 RNA. *Methods Enzymol.* 2001, 341: 503–517.
63. Kurreck J., Bieber B., Jähnel R.: DNazymes in nature. *J. Biol. Chem.* 2002, 277(9): 7099–7107.
64. Abera G., Berhanu G., Tekewe A.: Ribozymes: Nucleic acid enzymes with potential pharmaceutical application. *Pharmacophore.* 2012, 3: 164–178.
65. Kurreck J.: Deoxyribozyme – Strategies for Medical Applications. *Eur. J. Biochem.* 2003, 270(8): 1628–1644.
66. Parry T.J., Bouhana K.S., Blanchard K.S.: Ribozyme pharmacokinetic screening for predicting pharmacodynamic dosing regimens. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2004, 2: 113–118.
67. Hao Z.M., Luo J.Y.: Design of a ribozyme targeting human telomerase reverse transcriptase and cloning of its gene. *World J. Gastroenterol.* 2003, 9: 104–107.
68. Ishikawa J., Furuta H.: Generation and development of RNA Ligase ribozymes with modular architecture through "design and selection. *Molecules.* 2015, 15: 5851–5865.
69. Soukup G.A., Breaker R.R.: Allosteric nucleic acid catalysts. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2003, 10: 318–325.
70. Vaish N.K., Kossen K.: Monitoring protein modification with allosteric ribozymes. *Methods.* 2004, 32: 428–436.
71. Eckstein F.: DNzyme directed against the oncogenic Her2. *Anti-sense Nucleic Acids Drug Dev.* 2002, 10(2): 117–121.
72. Wang L., Prakash R.K., Stein C.A.: DNzyme, Antisense Nucleic Acid Drug. 2003, 13(3): 169–189.
73. Crooke S. T.: The half-life of an unmodified DNzyme in human serum. *Annu. Rev. Med.* 2004, 55: 61–95.
74. Geary A.S., Watanabe T.A., Truong L.: DNzyme containing 2'-O-methyl RNA modifications. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 2001, 296(3): 890–897.
75. Hughes M.D., Hussain M., Nawaz Q.: Endogenous delivery of ribozymes. *Drug Discov.* 2001, 6(6): 303–315.

76. Seksek O., Bolard J.: Exogenous delivery, presynthesized ribozymes. *Mol. Biol.* 2004, 252: 545–568.
77. Lewin A.S., Hauswirth W.W.: Ribozyme gene therapy: applications for molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 2001, 7: 221–228.
78. Wraight C.J., White P.J.: The antisense nucleotides in cutaneous therapy. *Pharmacol. Ther.* 2004, 90: 89–104.
79. Jose A.M.: Ribozyme therapy: RNA enzymes to the rescue. *Yale J. Biol. Med.* 2003, 75: 215–219.
80. Merdana T., Kopecek J., Kissel T.: Prospects for cationic polymers in gene and oligonucleotide therapy against cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 54: 715–758.
81. Suzuki R., Namai E., Oda Y.: Cancer gene therapy by IL-12 gene delivery using liposomal bubbles and tumoral ultrasound exposure. *J. Controlled Release.* 2009, 142: 245–250.
82. Jackson J.K., Liang L.S., Hunter W.L.: The encapsulation of ribozymes in biodegradable polymeric matrices. *Int. J. Pharm.* 2004, 243: 43–55.
83. Hughes M.D., Hussain M.: The cellular delivery of antisense oligonucleotides and ribozymes. *Drug Discov.* 2002, 6: 303–315.
84. Akhtara S., Hughes M.D.: The delivery of antisense therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002, 44: 3–21.
85. Michienzi A., Rossi J.J.: The targeted delivery of ribozymes. *Meth. Enzymol.* 2001, 341: 581–596.
86. Santiago F.S., Lowe H.C.: Macromolecular systems for exogenous delivery. *Nature Med.* 1999, 5(12): 1264–1269.
87. Hudson A.J., Normand N., Ackroyd J.: Dendrimers, and biodegradable polymer matrices like polylactides and lactic acid/glycolic acid copolymers. *Int. J. Pharm.* 1999, 182(1): 49–58.
88. Sullenger B.A., Gilboa E.: Adenoviral vectors to deliver ribozyme genes. *Nature.* 2002, 418(6894): 252–258.
89. Bramlage B., Luzzi E., Eckstein F.: Designing ribozymes for the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol.* 2003, 16: 434–438.
90. Hauswirth W.W., Lewin A.S.: Ribozyme uses in retinal gene therapy. *Prog. Retin. Eye Res.* 2003, 19: 689–710.
91. Haider M., Hatefi A.: Recombinant polymers for cancer gene therapy. *J. Controlled Release.* 2005, 109: 108–119.
92. Wu T., Zhou D.: Viral delivery for gene therapy against cell movement in cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2011, 63: 671–677.
93. Serikawa T., Kikuchi A., Sugaya S.: In vitro and in vivo evaluation of novel cationic liposomes utilized for cancer gene therapy. *J. Controlled Release.* 2006, 113: 255–260.
94. Dass C.R., Choong P.F.: Selective gene delivery for cancer therapy using cationic liposomes: in vivo proof of applicability. *J. Controlled Release.* 2006, 113: 155–163.
95. Lee N.S., Bertrand E., Rossi J.J.: Ribozymes can either be transcribed from polymerase II or polymerase III promoters. *RNA.* 1999, 5(9): 1200–1209.
96. Chirmule N.: Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* 2002, 6: 1574–1583.
97. Hernandez Y.J.: Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J. Virol.* 2003, 73: 8549–8558.
98. Good P.D.: Expression of small, therapeutic RNAs in human cell nuclei. *Gene Ther.* 2003, 4: 45–54.
99. Koseki S.: Factors governing the activity in vivo of ribozymes transcribed by RNA polymerase III. *J. Virol.* 2005, 73: 1868–1877.
100. Lewin A.S.: Ribozyme rescue of photoreceptor cells in a transgenic rat model of autosomal dominant retinitis pigmentosa. *Nat. Med.* 2008, 4: 967–971.
101. Bowden E.T., Riegel A.T.: Tetracycline repressor from *E. coli*. *Meth. Mol. Biol.* 2004, 252: 179–194.
102. Rossi F.M., Blau H.M.: Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2008, 9: 451–456.
103. Saravolac E.G., Baker A., Gerlach W.L.: Catalytic nucleic acids: From lab to applications. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52: 325–347.
104. Scanlon K.J.: Anti-genes: siRNA, ribozymes and antisense. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004, 5: 415–420.
105. Kazula A.: Terapia genowa choroby Huntingtona. *Farmacja Polska.* 2015, 71, 8: 234–255.
106. Kremer B., Goldberg P., Andrew S.E.: A worldwide study of the Huntington's disease mutation. *N. Engl. J. Med.* 1994, 330: 1401–1406.
107. Yen L., Strittmatter S.M., Kalb R.G.: Sequence-specific cleavage of Huntingtin mRNA by catalytic DNA. *Ann. Neurol.* 1999, 46: 366–373.
108. Wang Y.L., Liu W., Wada E.: Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci. Res.* 2005, 53: 241–249.
109. DiFiglia M., Sena-Esteves M., Chase K.: Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007, 104: 17204–17209.
110. Mifune M., Sasamura H., Shimizu-Hirota R.: Angiotensin II type 2 receptors stimulate collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2000, 36: 845–850.
111. Nadler J.L., Natarajan R., Stern N.: Specific action of the lipoxygenase pathway in mediating angiotensin II-induced aldosterone synthesis in isolated adrenal glomerulosa cells. *J. Clin. Invest.* 1987, 80: 1763–1769.
112. Gu J.L., Veerapanane D., Rossi J., Natarajan R.: Ribozyme-mediated inhibition of expression of leukocyte-type 12-lipoxygenase in porcine aortic vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 1995, 77: 14–20.
113. Sasson S., Eckel J.: Disparate effects of 12-lipoxygenase and 12-hydroxyeicosatetraenoic acid in vascular endothelial and smooth muscle cells and in cardiomyocytes. *Arch. Physiol. Biochem.* 2006, 112: 119–129.
114. Forrester J.S., Fishbein M., Helfant R.: A paradigm for restenosis based on cell biology: Clues for the development of new preventive therapies. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1991, 17: 758–769.
115. Jarvis T.C., Alby L.J., Beaudry A.A.: Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by ribozymes that cleave c-myc mRNA. *RNA.* 1996, 2: 419–428.
116. Dyson N.: The regulation of E2F by pRB-family proteins. *Genes Dev.* 1998, 12: 2245–2262.
117. Ohtsubo M., Theodoras A.M.: Human cyclin E, a nuclear protein essential for the G1-to-S phase transition. *Mol. Cell Biol.* 1995, 15: 2612–2624.
118. Grassi G., Schneider A., Engel S.: Hammerhead ribozymes targeted against cyclin E and E2F1 cooperate to down-regulate coronary smooth muscle cell proliferation. *J. Gene Med.* 2005, 7: 1223–1234.
119. Mahadevan M., Tsilfidis C., Sabourin L.: Myotonic dystrophy mutation: An unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science.* 1992, 255: 1253–1255.
120. Brook J.D., McCurrach M.E., Harley H.G.: Molecular basis of myotonic dystrophy: Expansion of a trinucleotide (CTG) repeat at the 3' end of a transcript encoding a protein kinase family member. *Molecules* 2010, 15: 54–70.
121. Mankodi A., Urbinati C.R., Yuan Q.P.: Muscleblind localizes to nuclear foci of aberrant RNA in myotonic dystrophy types 1 and 2. *Hum. Mol. Genet.* 2001, 10: 2165–2170.
122. Timchenko N.A., Cai Z.J., Welm A.L.: RNA CUG repeats sequester CUGBP1 and alter protein levels and activity of CUGBP1. *J. Biol. Chem.* 2001, 276: 7820–7826.
123. Langlois M.A., Lee N.S., Rossi J.J.: Hammerhead ribozyme-mediated destruction of nuclear foci in myotonic dystrophy myoblasts. *Mol. Ther.* 2003, 7: 670–680.
124. Phylactou L.A., Darrah C., Wood M.J.: Ribozyme-mediated trans-splicing of a trinucleotide repeat. *Nat. Genet.* 1998, 18: 378–381.
125. Rogers C.S., Vanoye C.G., Sullenger B.A.: Functional repair of a mutant chloride channel using a trans-splicing ribozyme. *J. Clin. Invest.* 2002, 110: 1783–1789.
126. Croxson R., Newland C., Beeson D.: Mutations in different functional domains of the human muscle acetylcholine receptor alpha subunit in patients with the slow-channel congenital myasthenic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 1997, 6: 767–774.
127. Marques M.J., Mendes Z.T., Minatel E.: Acetylcholine receptors and nerve terminal distribution at the neuromuscular junction of long-term regenerated muscle fibers. *J. Neurocytol.* 2005, 34: 387–396.
128. Abdelgany A., Ealing J., Wood M.: Selective cleavage of AChR cRNAs harbouring mutations underlying the slow channel myasthenic syndrome by hammerhead ribozymes. *J. RNAi Gene Silencing.* 2005, 1: 26–31.
129. Abdelgany A., Ealing J., Wood M., Beeson D.: Selective DNzyme-mediated cleavage of AChR mutant transcripts by targeting the mutation site or through mismatches in the binding arm. *J. RNAi Gene Silencing.* 2005, 1: 32–37.
130. Appaiahgari M.B., Vrati S.: DNzyme-mediated inhibition of Japanese encephalitis virus replication in mouse brain. *Mol. Ther.* 2007, 15: 1593–1599.
131. Antoszczyk S., Nawrot B.: Rybozomy w medycynie. *Biotechnologia.* 2003, 61: 140–152.
132. Kong X.J., Song J.H., Lin J.S.: Maxizyme-mediated specific inhibition on mutant-type p53 in vitro. *World Journal of Gastroenterology.* 2003, 9: 1571–1575.
133. Nosrati M., Li S., Bagheri S., Ginzinger D.: Antitumor activity of systemically delivered ribozymes targeting murine telomerase RNA. *Clinical Cancer Research.* 2004, 10: 4983–4990.
134. Talini G.: Natural and unnatural ribozymes: back to the primordial RNA world. *Res. Microbiol.* 2009, 160: 457–465.
135. Zhang Q., Ohannesian D.W., Erickson L.C.: Hammerhead ribozyme-mediated sensitization of human tumor cells after treatment

- with 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004, 309: 506–514.
136. Tritz R., Habita C., Robbins J. M., Gomez G. G.: Catalytic nucleic acid enzymes for the study and development of therapies in the central nervous system. *Gene Therapy and Molecular Biology*. 2005, 9: 89–106.
 137. Jiang W. G., Grimshaw D., Martin T. A.: Reduction of stromal fibroblast-induced mammary tumor growth, by retroviral ribozyme transgenes to hepatocyte growth factor and its receptor, c-MET. *Clinical Cancer Research*. 2003, 9: 4274–4281.
 138. Kim S. J., Johnson M., Koterba K.: Reduced c-met expression by an Adenovirus expressing a c-met ribozyme inhibits tumorigenic growth and lymph node metastases of PC3-LN4 prostate tumor cells in an orthotopic nude mouse model. *Clinical Cancer Research*. 2003, 13: 234–244.
 139. Zhang G., Dass C. R., Sumithran E.: Effect of deoxyribozymes targeting c-Jun on solid tumor growth and angiogenesis in rodents. *Journal of the National Cancer Institute*. 2004, 96: 683–696.
 140. Zhang L., Gasper W. J.: Angiogenic inhibition mediated by a DNAzyme. That targets vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Research*. 2006, 62: 5463–5469.
 141. Perlman H., Krasinski K.: Adenovirusencoded hammerhead ribozyme to Bcl-2 inhibits neointimal hyperplasia and induces vascular smooth muscle cell apoptosis,” *Cardiovasc. Res*. 2005, 45: 570–578.
 142. Tedeschi L., Lande C.: Hammerhead ribozymes in therapeutic target discovery and validation,” *Drug Discov*. 2009, 14: 776–783.
 143. Chatterton J.E.; Hu X.: Ribozymes in gene identification, target validation and drug discovery,” *Drug Discov*. 2004, 3: 10–17.
 144. Gerasimova Y.: Deoxyribozyme cascade for visual detection of bacterial RNA. *ChemBioChem*. 2013, 10: 25–33.
 145. Gu H.: Small, highly active DNAs that hydrolyze DNA. *PNAS*. 2013, 22: 24–34.