



Strategia ukierunkowanej degradacji RNA oraz wybrane przykłady jej wykorzystania w terapii przeciwwirusowej

Mariola Dutkiewicz, Jerzy Ciesiolka

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

Strategy of directed RNA degradation and selected examples of its use in antiviral therapy

Summary

Over the last decade, antisense oligodeoxynucleotides and ribozymes have emerged as valuable biochemical tools and promising therapeutic reagents in medicine. This review describes the basic principles of their use in the strategy of directed RNA degradation. The rules for the rational choice of targeted RNA sequences, the properties of available RNA cleaving tools, as well as the major problems that limit the effectiveness of this new technology, are discussed. Selected examples of the successful use of antisense oligonucleotides and ribozymes as antiviral agents are presented.

Key words:

antisense, ribozyme, RNA degradation, antiviral therapy.

Adres do korespondencji

Jerzy Ciesiolka,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
ciesiolk@ibch.poznan.pl

1. Wprowadzenie

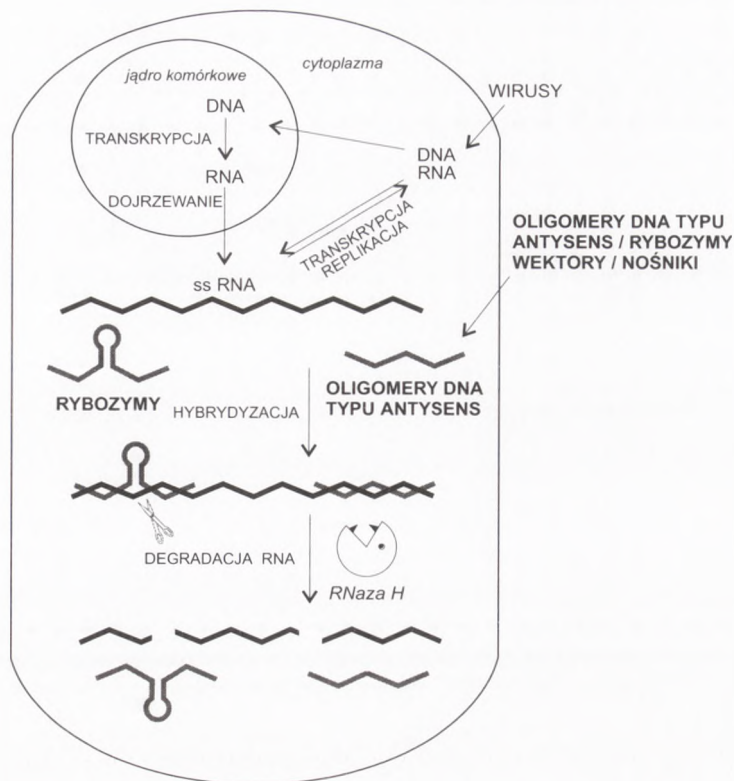
Dwudziesty wiek, dzięki rozwojowi biologii molekularnej i biotechnologii, zaowocował olbrzymim postępowaniem w identyfikacji przyczyn szeregu chorób, opracowaniem szybkich i pewnych metod ich diagnozowania oraz znalezieniem wielu skutecznych metod terapii. Spektakularne osiągnięcie końca wieku, jakim było zsekwencjonowanie ludzkiego genomu, wytyczy zapewne kierunki rozwoju wielu obszarów biologii i medycyny na następ-

ne dziesięciolecia. Istnieje jednakże wiele schorzeń, na które nie ma skutecznej terapii lub jest ona jedynie objawowa. Przyczyną licznych, często nieuleczalnych chorób są zakażenia wirusowe. Zaobserwowano, że powodujące je drobnoustroje posiadają łatwość rozprzestrzeniania się, często wysoką zmienność, poznano również budowę i cykl życiowy wielu z nich. Jednakże tylko dla niewielu wirusów opracowano szczepionki zapobiegające zakażeniom. Brak jest, jak dotąd, w pełni skutecznych metod terapii przeciwwirusowej, choć w wielu laboratoriach prowadzone są intensywne prace nad sposobami eliminacji wirusów z zakażonego organizmu. Jednym ze szczególnie atrakcyjnych, potencjalnie skutecznych sposobów, jest strategia ukierunkowanej degradacji RNA.

Strategia ukierunkowanej degradacji RNA wykorzystuje oligonukleotydy typu antysens oraz rybozomy jako narzędzia molekularne w badaniach ekspresji genów i obiecujące środki terapeutyczne nowej generacji (1-10). Podejście to może być również bardzo przydatne w kolejnym etapie badań genomu człowieka, fazie ustalania funkcji poszczególnych genów. Optymalizacją metod strategii ukierunkowanej degradacji RNA zajmuje się wiele laboratoriów, a postęp w tej dziedzinie stwarza również większe szanse zastosowania opracowanych narzędzi w terapii przeciwwirusowej. Obecnie nie budzi już wątpliwości fakt, że występujące naturalnie w komórkach antysensowe oligonukleotydy i rybozomy uczestniczą w regulacji ekspresji genów. Należy „tylko” opracować skuteczną technologię pozwalającą na wykorzystanie takich procesów, ukierunkowane zgodnie z pożądanym celem. W artykule tym przedstawiamy ogólne zasady strategii ukierunkowanej degradacji RNA i związane z nią metody badawcze służące projektowaniu specyficznych, wydajnych, stabilnych i nietoksycznych narzędzi molekularnych. Przedstawiamy także postęp prac nad możliwością ich wykorzystania w terapii przeciwwirusowej.

2. Cel i założenia strategii ukierunkowanej degradacji RNA

Strategia ukierunkowanej degradacji RNA ma na celu eliminację lub ograniczenie populacji cząsteczek RNA niepożądanych w komórce, poprzez ich degradację indukowaną obecnością wysoce specyficznych narzędzi molekularnych: oligomerów DNA typu antysens i rybozymów (rys. 1). Atakowane mogą być dowolnie wybrane cząsteczki RNA. W przypadku prób eliminacji wirusa z komórki będą to cząsteczki RNA genomowe lub cząsteczki komplementarne powstające podczas replikacji wirusa, a także informacyjne RNA (mRNA), których degradacja zmniejszy liczebność niepożądanych, wirusowych białek lub wręcz zablokuje proces ich translacji. Do komórki wprowadzane są oligomery DNA typu antysens lub rybozomy komplementarne do wybranego regionu atakowanej cząsteczki RNA, które po hybrydyzacji indukują jej specyficzne przecięcie według zaplanowanego mechanizmu działania. Zakłada się, że oligomery DNA typu antysens aktywują komórkową RNazę H, która przecina łańcuch RNA w regionach heterodupleksów. Sposób działania rybozymów



Rys 1. Schemat ideowy zastosowania oligomerów DNA typu antysens oraz rybozymów w strategii ukierunkowanej degradacji RNA w komórce.

jest podobny, a specyficzne cięcie RNA jest konsekwencją ich właściwości nukleolitycznych (rys. 2).

Realizacja przedstawionej, zdawałoby się prostej idei, wymaga rozwiązania szeregu problemów eksperymentalnych. Podstawowe znaczenie ma wybór efektywnej metody wprowadzania oligonukleotydów do komórki (11-13). Stosowane są dwa sposoby: pierwszy polega na wprowadzeniu syntetycznych oligonukleotydów z zewnątrz, bezpośrednio lub przy użyciu nośników, np. lipidów kationowych. Drugi polega na wprowadzeniu do komórki odpowiednio skonstruowanego wektora ekspresyjnego, za pomocą którego oligonukleotydy generowane są wewnątrz komórki. Wprowadzanie do komórki syntetycznych oligonukleotydów wiąże się często z koniecznością zwiększenia ich trwałości w środowisku komórkowym. Za pomocą metod chemicznych otrzymano szereg modyfikowanych oligonukleotydów o zwiększonej trwałości, lecz niektóre pochodne lub ich metabolity są toksyczne. Generowanie oligonukleotydów wewnątrz komórki wymaga konstrukcji wektora, który po wprowadzeniu przez błonę komórkową ulega wydajnej ekspresji w tej części komórki,

malizacji, a wyzwaniem pozostaje nadal problem „kolokalizacji” oligonukleotydów z atakowaną cząsteczką (11-13). Problemy związane z realizacją zakładanej idei oddziaływania oligomerów DNA typu antysens i rybozymów z atakowaną cząsteczką RNA przedstawimy bardziej szczegółowo w następujących rozdziałach.

3. Atakowana cząsteczka RNA

Celem ataku powinny być cząsteczki RNA o podstawowym znaczeniu, których degradacja tak ograniczy funkcje życiowe wirusa, że doprowadzi do jego eliminacji bez udziału lub z udziałem mechanizmów obronnych gospodarza. Wybrane przykłady zastosowania strategii ukierunkowanej degradacji RNA do poszukiwania czynników przeciwwirusowych przedstawione zostały w tabeli 1.

Uważa się, że podstawowym warunkiem racjonalnego wyboru sekwencji rozpoznawanej przez oligomery DNA typu antysens lub rybozymy jest uwzględnienie dostępności do hybrydyzacji atakowanej cząsteczki RNA (1-10). Dostępność ta ograniczona jest cechami jej struktury II- i III-rzędowej oraz oddziaływaniami z innymi makrocząsteczkami. W konsekwencji, na 18 do 20 testowanych oligomerów tylko jeden wykazuje znaczący efekt inhibicji *in vivo* (14). Często stosowany w praktyce wybór regionów atakowanych na zasadzie empirycznej strategii *walk-the-gene*, jak się okazało, był bardzo mało efektywny. Również poszukiwanie regionów dostępnych do hybrydyzacji na podstawie wyników analizy komputerowej prawdopodobnych struktur drugorzędowych RNA jest jak dotychczas mało skuteczne z powodu niedoskonałości istniejących programów i złożoności strukturalnej cząsteczek RNA. Znacznie lepsze rezultaty uzyskuje się uwzględniając wyniki badań struktury II-rzędowej RNA za pomocą eksperymentalnych metod chemicznych lub enzymatycznych. Szczególnie obiecujące są doskonalone w ostatnich kilku latach, metody bezpośredniego oznaczania dostępności RNA do hybrydyzacji z wykorzystaniem bibliotek kombinatorycznych oligonukleotydów (15-19).

Istotny jest również taki wybór sekwencji rozpoznawanej, aby oprócz dostępności była ona charakterystyczna dla atakowanej cząsteczki i nie występowała w innych, komórkowych RNA. Teoretycznie, hipotetyczna sekwencja typu *random* o wielkości haploidalnego genomu człowieka zawiera 3000 kopii każdej 10-nukleotydowej sekwencji, podczas gdy dowolna 17-nukleotydoowa sekwencja występuje tylko raz. Planowanie krótkiej sekwencji stwarza zatem realne niebezpieczeństwo równoczesnego atakowania więcej niż jednej cząsteczki RNA. Zwiększenie jej długości niekoniecznie jednak prowadzić będzie do zwiększenia specyficzności działania oligomeru typu antysens lub rybozymu (lit. 20 oraz dyskusja w następnym rozdziale).

Tabela 1

Wybrane przykłady zastosowania strategii ukierunkowanej degradacji RNA do poszukiwania czynników przeciwwirusowych

Cel ataku	Narzędzie molekularne	Układ testowy	Sposób dostarczenia/wektor ekspresyjny	Efekt działania	Literatura
1	2	3	4	5	6
HIV-1 5'UTR	<i>bammerbead</i>	SW480	plazmid	inh. replikacji: 0-80%	(43)
	<i>bairpin</i>	HeLa	plazmid	inh. replikacji: 75-85%	(44)
	<i>bairpin</i>	HeLa	plazmid, retrowirus	inh. replikacji: 70-95%, inh. replikacji: 60-90%	(45)
	<i>bairpin</i>	CD34+	retrowirus	inh. replikacji: do 90%	(46)
region LTR	<i>bammerbead</i>	HeLa	lipofekcja	inh. translacji: 90%	(47)
	<i>bammerbead</i>	HeLa	lipofekcja	inh. translacji: 87%	(48)
	<i>bairpin</i>	Hut78, CD4+	retrowirus	inh. replikacji	(49)
region U5	<i>bammerbead</i>	HeLa CD4+, CEM	plazmid, retrowirus	inh. replikacji, inh. rozpowszechniania się wirusa	(50)
	<i>bammerbead</i> , <i>bairpin</i>	CEM	plazmid	inh. ekspresji	(51)
region PBS	PS-ODN	MT2	w medium	inh. replikacji	(52)
HIV-1 <i>gag</i>	ODN/RNA -cyrkularne oligomery,	PBMC	w medium	inh. ekspresji: 80%	(53)
	<i>bammerbead</i>	SW480	plazmid	inh. replikacji: 90-95%	(54)
<i>pol</i>	<i>DNA-enzym</i>	COS-1	lipofekcja	inh. ekspresji: >90%	(55)
	<i>bammerbead</i>	HeLa-CD4+	plazmid/ wirion	inh. infekcyjności	(56)
<i>tat</i>	<i>bammerbead</i>	Jurkat	retrowirus	inh. replikacji: 90%	(57)
	<i>bammerbead</i>	Jurkat	retrowirus	inh. replikacji: 0-99,9%	(58)
<i>rev</i>	<i>bammerbead</i>	COS-7, CD4+	retrowirus	inh. ekspresji: 85-95%, odporność na infekcję	(59)
	<i>bammerbead</i>	SW480	mikroiniekcja	inh. replikacji: 50-99%	(60)
<i>env</i>	<i>bammerbead-dimery</i>	HeLa	plazmid	inh. ekspresji: >90%	(61)
	ODN	HeLa	lipofekcja	inh. replikacji	(47)
HIV-1 3'UTR	DNA-enzym	HeLa	lipofekcja	cięcie RNA: >50%	(62)
	DNA-enzym	U87	lipofekcja	inh. replikacji: 77-81%	(63)
HCV 5'UTR/IRES	<i>bammerbead</i>	E86/B2A	retrowirus	inh. uwalniania się wirionów: 90%	(37)
	ODN	lizat	w medium	inh. translacji: 50-98%	(64)
	PS-ODN	lizat	w medium	inh. translacji: 90%	(65)
	ODN, PS-ODN	lizat, MT-2C	w medium	inh. translacji: do 100%, inh. replikacji	(66)

1	2	3	4	5	6
	PS-ODN	lizat, HepG2	w medium, plazmid	inh. translacji: ok. 95%	(67)
	ODN, α -ODN	lizat, ekstrakt z zarodków pszenicy	w medium	inh. translacji: 47-95%	(68)
	PS-ODN, 2'-MeEt ODN	H8Ad17c	lipofekcja	inh. translacji: 50%	(69)
	ODN, PS-ODN, 2'-F-PS-ODN	lizat, H8Ad17c	w medium	inh. translacji: 50%	(70)
	PS-ODN, Me-ODN, Bn-ODN	lizat, HepG2	w medium	inh. translacji: 88-96%	(71)
	PS-ODN	lizat, HepG2	w medium, lipofekcja	inh. translacji: 42-94%	(72)
	PS-ODN	Huh7 SK Hep1	lipofekcja, nośnik glikoproteino-lizynowy	inh. translacji: 99%	(73)
	5-MeC ODN	mysz BALB/c	podskórnice	inh. translacji: 52%	(74)
	PS-ODN, Me-ODN, Bn-ODN,	lizat, HepG2	w medium, lipofekcja	inh. translacji: 86-96%	(75)
	PS-ODN	BALB/3T3 A31-I-1	w medium	inh. translacji	(76)
	<i>hammerhead</i>	lizat, Huh7	w medium, plazmid	inh. translacji: 49-73%	(77)
	<i>hammerhead</i>	CHO, hepatocyty	adenowirus	inh. replikacji, eliminacja wirusa	(78)
	<i>hammerhead</i>	HeLa, OST7	lipofekcja	inh. replikacji: >90%	(79)
HCV core	<i>hammerhead</i>	lizat	w medium	inh. translacji: 70-80%	(80)
HBV RNA progenomowy	<i>hairpin</i>	Huh7	plazmid	inh. replikacji: do 80%	(81)
	<i>hammerhead</i>	ekstrakt komórek, Huh7	w medium, plazmid	cięcie RNA: >90% cięcie RNA: 0-25%	(82)
HBV region X	<i>hammerhead</i>	Huh7	plazmid	inh. ekspresji: ok. 80%	(83)
DHBV RNA pro- genomowy	PS-ODN	kacze hepatocyty, kaczki pekińskie	w medium dożylnie	inh. replikacji: dla dwóch PS-ODN >90%, inh. replikacji: jeden PS-ODN prawie 100%	(84)
HDV RNA geno- mowy, miejsce cięcia katali- tycznego	ODN, PS-ODN	H1delta9	w medium	inh. replikacji i ekspresji: ok. 80%	(85)
LCMV	<i>hammerhead</i>	NIH3T3	plazmid	inh. replikacji: 97%	(86)
BLV rex/tax	<i>hammerhead</i>	BLC	plazmid	inh. replikacji: 61-92%	(87)
HTLV-1 tax	<i>hammerhead</i>	jądra fibroblastów myszy C57BL/6	w medium	efektywne cięcie RNA	(88)
CMV ie2	PS-ODN VITRAVENE™	chorzy na AIDS zakażeni CMV	bezpośrednio, miejscowo	lek	(89)
<i>ie1, ie2</i>	RNA RNazy P-EGS	U373MG	retrowirus	inh. replikacji i ekspresji: >80%	(90)

Objaśnienia: inh., inhibicja; lizat, lizat retikulocytów królika; w medium, w pożywce lub w środowisku reakcji; UTR, region nie ulegający translacji; LTR, długie, powtarzające się sekwencje końcowe; PBS, miejsce rozpoznania startera replikacji;

IRES, wewnętrzny region oddziaływania z rybosomem; *core*, region kodujący białko rdzenia; *ie1*, *ie2*, RNA kodujący białka regulatorowe IE1, IE2; HBV, wirus zapalenia wątroby typu B; DHBV- kaczy wirus zapalenia wątroby typu B; HCV, wirus zapalenia wątroby typu C; HDV, wirus zapalenia wątroby typu D; HIV-1, ludzki wirus niedoboru odporności typu 1; LCMV, wirus limfocytarnego zapalenia opon; BLV, wirus enzoptycznej białaczki bydła; HTLV-1, ludzki wirus białaczki limfocytów T; CMV, wirus cytomegalii.

4. Narzędzia molekularne

4.1. Oligodeoksynukleotydy typu antysens

W 1978 r. po raz pierwszy zastosowano syntetyczne oligodeoksynukleotydy aby zmienić ekspresję genu (21). Zainteresowanie nową technologią wzrastało początkowo powoli. Na znaczne przyspieszenie prac od początku lat dziewięćdziesiątych wpłynęła obserwacja, że zastosowanie oligonukleotydów może ułatwić ich modyfikacja chemiczna, postęp w sekwencjonowaniu genomu ludzkiego dostarczył wielu nowych celów molekularnego ataku, a automatyzacja syntezy, analizy i oczyszczania oligonukleotydów umożliwiła prowadzenie badań na szeroką skalę. Wyniki wcześniejszych badań nie zawsze jednak były satysfakcjonujące. Próby prowadzono bowiem przy założeniu uproszczonego schematu działania oligomerów, bez należytego rozeznania czynników istotnych dla ich wnikania do komórki, trwałości, potencjalnych efektów ubocznych, a w szczególności, zgodności mechanizmu działania z założeniami. Można wyróżnić zasadniczo trzy sposoby, w jaki oligomer hybrydujący do atakowanej cząsteczki RNA może wpływać na jej funkcję: a) oligomer działa na zasadzie blokady sterycznej, uniemożliwiając oddziaływanie RNA z innymi makrocząsteczkami, np. enzymami, czynnikami translacyjnymi, rybosomem, b) oligomer zmienia strukturę II- lub III-rzędową RNA zmieniając jego właściwości funkcjonalne, c) powstały heterodupleks DNA-RNA jest rozpoznawany przez komórkową RNazę H, która degradowuje cząsteczkę RNA w tym regionie. W literaturze opisano przykłady świadczące o możliwym udziale każdego z tych mechanizmów z osobna. Ostatnio przeważa jednak przekonanie o znaczącej roli RNazy H i ukierunkowanej degradacji RNA w większości eksperymentów z oligomerami DNA typu antysens (1).

RNaza H jest enzymem występującym zarówno w komórkach prokariotycznych jak i eukariotycznych (22). Dodatkowo jest ona kodowana przez niektóre wirusy. Enzym rozpoznaje hybrydy DNA-RNA i rozcina RNA w obrębie heterodupleksów lub/i w ich bezpośrednim sąsiedztwie (rys. 2 A). Pomimo że enzym ten jest znany od wielu lat jego wymogi substratowe są dość słabo zbadane. Wiadomo, że RNaza H rozpoznaje i przecina również takie heterodupleksy, w których oligomer DNA zawiera tylko cztery deoksyrybonukleotydy. Sekwencje przyległe mogą zawierać nukleotydy modyfikowane, np. zwiększające trwałość oligomeru w komórce, specyficzność lub siłę oddziaływania z RNA (3,23). W badaniach modelowych wskazuje się ponadto, że enzym przecina RNA w miejscu odległym o przynajmniej 5 par zasad od

końca 3' związanego oligomeru DNA (17,24). Dla bardzo krótkich oligomerów typu antysens oznacza to, że cięcia występują poza heterodupleksem, w przyległym, jednoniciowym regionie RNA.

Długość zaplanowanego oligomeru DNA typu antysens ma istotne znaczenie. Dłuższa sekwencja zapewnia teoretycznie większą specyficzność oddziaływania. Możliwe jest jednak tworzenie się heterodupleksów zawierających jedną lub więcej niekomplementarnych par zasad, heterodupleksów dostatecznie trwałych aby działać według każdego z możliwych mechanizmów typu antysens, a w szczególności, rozpoznawanych i ciętych przez RNazę H. W konsekwencji, zwiększanie długości oligomerów typu antysens będzie miało efekt przeciwny do zamierzonego, prowadząc zamiast do zwiększenia, do zmniejszenia specyficzności ich działania (20).

W celu zwiększenia trwałości oligomerów DNA w środowisku komórkowym, zwiększenia stabilności heterodupleksów DNA-RNA, a także specyficzności ich tworzenia opracowano szereg modyfikacji chemicznych, które wprowadzane są do oligomerów typu antysens (3,23). Najbardziej efektywna okazała się modyfikacja wszystkich lub części grup fosforanowych oligonukleotydów, w której jeden z niewiążących atomów tlenu grupy fosforanowej zastąpiony jest przez siarkę, grupę metylową lub grupę benzylową (odpowiednio oligomery: PS-ODN, Me-ODN i Bn-ODN; rys. 2 F). Modyfikacje te zwiększają odporność oligomerów na działanie komórkowych nukleaz, wydłużając znacznie czas ich półtrwania. Ponadto heterodupleksy z udziałem oligomerów PS-ODN są nadal substratami dla RNazy H. Tak modyfikowane oligomery wykorzystywane są najczęściej w eksperymentach ukierunkowanej degradacji RNA (tab. 1). Dodatkową zaletą oligomerów PS-ODN jest niższa temperatura topnienia heterodupleksów, co sprawia, że są one bardziej specyficzne, wykazując mniejszą tolerancję wobec niecałkowicie sparowanych sekwencji i tym samym można zwiększyć ich długość do 17-20 merów (1,24,25). W przeprowadzonych badaniach nad skutkami ubocznymi PS-ODN wykazano, że w dużych dawkach mogą być one toksyczne, np. poprzez indukcję kaskady cytokin. Równocześnie, obniżeniu ulega ich efektywność, gdyż duże stężenie PS-ODN inhibuje RNazę H. Wykazano także zdolność PS-ODN do niespecyficznego wiązania różnych białek, które może powodować zaburzenia ciśnienia krwi i niespecyficzną inhibicję procesu składania RNA. W celu zminimalizowania tych niepożądanych efektów wprowadza się modyfikacje fosfotiolowe tylko niektórych wiązań oligomeru, co implikuje dalsze jego zalety, m.in. możliwość przyjmowania doustnego oraz obserwowany wzrost aktywacji RNazy H (1,24,25).

4.2. Rybozomy

W strategii ukierunkowanej degradacji RNA wykorzystywane są rybozomy działające w układzie *trans*, które rozpoznają atakowaną cząsteczkę RNA w sposób analogiczny do oligomerów typu antysens tzn. poprzez utworzenie standartowych par

typu Watsona-Cricka (rys. 2 B-E). Wobec tego, przy wyborze atakowanego regionu, który będzie przecinany przez rybozym w zaplanowanym miejscu, obowiązują podobne reguły jak przy planowaniu oligomerów typu antysens. Najważniejsze jest, aby region ten był dostępny do hybrydyzacji. Dodatkowym warunkiem ograniczającym wybór jest określona sekwencja RNA w pobliżu miejsca przewidywanego cięcia, wynikająca z konieczności zachowania centrum katalitycznego rybozomu. Ponadto ważne jest wykazanie, że istotnie rybozym indukuje specyficzne cięcie RNA, a przyczyną obserwowanego efektu nie jest wyłącznie hybrydyzacja jego ramion do atakowanej cząsteczki, czyli działanie na podobnej zasadzie co oligomery DNA typu antysens. Służą do tego odpowiednie próby kontrolne, w których stosowane są warianty rybozymów nieaktywne katalitycznie. Właściwości rybozymów: *hammerhead*, *hairpin*, *delta*, rybozomu RNazy P i rybozomu intronu grupy I zostały dobrze poznane i opisane w pracach przeglądowych (26-33).

W strategii ukierunkowanej degradacji RNA wykorzystywane są najczęściej rybozymy *hammerhead* i *hairpin* (rys. 2B,C oraz tab. 1). Są one stosunkowo niewielkie (oligomery RNA o długości kilkudziesięciu nukleotydów), zostały bardzo dobrze scharakteryzowane (26-29), a ich szczególną zaletą jest możliwość rozpoznawania i degradacji szerokiego spektrum różnorodnych sekwencji docelowych, dzięki dużej tolerancji na zmiany w składzie nukleotydowym ramion hybrydujących. Jednakże, w przypadku rybozymów *hammerhead* do efektywnego cięcia wymagana jest obecność w atakowanej cząsteczce trójnukleotydowej sekwencji NUH (N – dowolny nukleotyd, H-A, C lub U), natomiast dla rybozymów *hairpin* sekwencja: NNRNGUCNNNNNN (R-A lub G, Y-C lub U). Rybozym *hairpin* stwarza zatem większe ograniczenia jeśli chodzi o możliwość wyboru miejsc rozpoznawania atakowanych cząsteczek RNA. Jest on jednak bardziej stabilny i zazwyczaj funkcjonuje lepiej niż rybozym *hammerhead* w warunkach fizjologicznych.

Rybozymy *delta* są jedynymi, jak dotychczas, poznanymi rybozymami, dla których naturalnym środowiskiem działania jest komórka zwierzęca. Charakteryzują się także wysoką aktywnością katalityczną, co sprawia, że są one potencjalnie bardzo interesującymi narzędziami w strategii ukierunkowanej degradacji RNA (30,31). Wykazano, że atakowana cząsteczka RNA może być cięta za dowolnym nukleotydem, lecz sekwencja kolejnych 7 nukleotydów jest bezwzględnie zachowawcza w naturalnych wariantach rybozymów (region I na rys. 2D; na rysunku przedstawiono strukturę II-rzędową rybozomu typu antygenomowego, rybozym typu genomowego ma podobną strukturę). W tym regionie rybozymów *delta* można wprowadzać jedynie ograniczone modyfikacje zmieniające specyficzność rybozymów względem atakowanej cząsteczki RNA. Prowadzą one jednak często do utraty aktywności katalitycznej wariantów. W konsekwencji, generowanie rybozymów *delta* rozpoznających i przecinających określone sekwencje RNA wiąże się z koniecznością testowania aktywności katalitycznej każdego nowego wariantu. Ogranicza to obecnie możliwości ich praktycznego wykorzystania.

Idea wykorzystania w strategii ukierunkowanej degradacji RNA RNazy P, odpowiedzialnej za dojrzewanie końców 5' cząsteczek pre-tRNA zaproponowana została

na początku lat dziewięćdziesiątych (34). Wykorzystanie enzymu do degradacji wybranej cząsteczki RNA zapewnia wprowadzony do komórki, częściowo komplementarny, krótki oligomer RNA tzw. EGS (*external guide sequence*) (rys. 2E). Enzym izolowany z komórek prokariotycznych i enzym obecny w komórkach ludzkich charakteryzują się różnymi wymaganiami substratowymi: w konsekwencji, oligomery EGS dla enzymu z *E. coli* mogą być krótkie i cięcie zachodzi bardzo efektywnie, dla enzymów z komórek ludzkich są one znacznie dłuższe i uzyskanie efektywnie działających EGS jest trudniejsze (32). Zastosowano jednakże z powodzeniem rybozym RNazy P z *E. coli* połączony kowalencyjnie z odpowiednią sekwencją EGS, wprowadzony do komórek eukariotycznych za pomocą wektora plazmidowego (35). Niedawno opublikowane wyniki prac nad lepszym zdefiniowaniem wymogów substratowych RNazy P z komórek ludzkich i konstrukcją efektywnie działających EGS (36) stwarzają nadzieję na wykorzystanie w strategii ukierunkowanej degradacji RNA również tego endogennego enzymu.

Przydatność w strategii ukierunkowanej degradacji RNA rybozomu intronu grupy I jest problematyczna z uwagi na jego długość (około 400 nukleotydów), skomplikowaną strukturę oraz brak wymaganej specyficzności w wiązaniu substratu (33). Znacznie większe nadzieje wiąże się z wykorzystaniem jego właściwości jako ligazy w terapii genowej, polegającej na ukierunkowanym naprawianiu niefunkcjonalnych cząsteczek RNA (37-39).

Szczególne znaczenie dla praktycznego zastosowania rybozymów, podobnie jak oligomerów DNA typu antysens, ma zwiększenie ich trwałości w środowisku komórkowym. Rybozomy jako cząsteczki RNA są znacznie bardziej podatne na niepożądaną degradację enzymatyczną i chemiczną. W celu jej przeciwdziałania modyfikuje się łańcuch fosfocukrowy, głównie w obrębie ramion hybrydujących rybozymów, m.in. poprzez zamianę niektórych rybo- na deoksyrybonukleotydy, wprowadzenie podstawników w pozycję 2' reszt rybozy lub wykorzystanie analogów reszt fosforanowych (opisanych wcześniej dla oligomerów DNA typu antysens; rys. 2F). W obrębie centrum katalitycznego rybozymów modyfikowane są również części zasadowe nukleotydów. Każda taka zmiana testowana jest pod kątem zachowania aktywności katalitycznej cząsteczek. W ten sposób opracowano szereg wariantów rybozymów *hammerhead* i *hairpin* potencjalnie przydatnych w strategii ukierunkowanej degradacji RNA (40-42).

5. Wnioski końcowe

Wyniki pierwszych eksperymentów praktycznego wykorzystania oligomerów DNA typu antysens, nie zawsze zgodne z oczekiwaniami badaczy, wywołały początkowo nieuzasadniony pesymizm w stosunku do możliwości nowej technologii. Wkrótce jednak zrozumiano, że droga do sukcesu prowadzi przez dogłębne poznanie wszystkich aspektów działania oligonukleotydów. W 1998 r., pierwszy oligomer DNA typu

antysens wprowadzony został do stosowania jako lek przeciw wirusowi cytomegalii, Vitravene™. Przynajmniej kilkanaście dalszych oligomerów jest na różnych etapach badań klinicznych.

Prace nad praktycznym wykorzystaniem rybozymów są mniej zaawansowane, choć badania niektórych z nich są również w fazie testów klinicznych. Wykazano, że rybozymy inhibują replikację wirusów kilkakrotnie bardziej efektywnie niż oligomery DNA typu antysens stąd prowadzone są dalsze prace nad ich przystosowaniem do działania w komórce. Równolegle poszukiwane są nowe narzędzia użyteczne w strategii ukierunkowanej degradacji RNA. Jedno z nich, DNA-enzym, posiada równocześnie zalety oligomeru DNA typu antysens i zdolność przecinania RNA, podobnie jak rybozym, ale pozbawiony jest wielu jego wad. Niezbędny jest również dalszy postęp na drodze dostarczania oligonukleotydów do miejsca ich docelowego ataku w określonych komórkach organizmu.

Praca finansowana z grantu KBN nr 6 P04B 017 20.

Literatura

1. Crooke S. T., (1998), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 8, 115-122.
2. Bramlage B., Luzi E., Eckstein F., (1998), *Trends Biotechnol.*, 16, 434-438.
3. Cook P. D., (1999), *Nucleosides Nucleotides*, 18, 1141-1162.
4. Rossi J. J., (1999), *Chem. Biol.*, 6, R33-R37.
5. Thurston D. E., (1999), *British Journal of Cancer*, 80 (Supplement 1), 65-85.
6. Macpherson J. L., Ely J. A., Sun L-Q., Symonds G. P., (1999), *Frontiers in Bioscience*, 4, 497-505.
7. Szklarczyk A. W., Kaczmarek L., (1999), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 9, 105-116.
8. Sun L. Q., Cairns M. J., Saravolak E. G., Baker A., Gerlach W. L., (2000), *Pharmacol. Rev.*, 52, 325-347.
9. Szymański M., Barciszewski J., (1995), *Postępy Biologii Komórki*, 22, (Suplement 6), 13-25.
10. Koziołkiewicz M., (1998), *Postępy Biochem.*, 44, 125-135.
11. Juliano R. L., Alahari S., Yoo H., Kole R., Cho M., (1999), *Pharmaceutical Res.*, 16, 494-502.
12. Sochanik A., Szala S., (1996), *Acta Biochim. Pol.*, 43(2), 293-300.
13. Sochanik A., Szala S., (2000), *Postępy Biochem.*, 46(3), 219-226.
14. Monia B. P., Johnston J. F., Geiger T., Muller M., Fabbro D., (1996), *Nature Med.*, 2, 668-675.
15. Ho S. P., Britton D. H., Stone B. A., Behrens D. L., Leffet L. M., Hobbs F. W., Miller J. A., Trainor G. L., (1996), *Nucleic Acids Res.*, 24, 1901-1907.
16. Birikh K. R., Berlin Y. A., Soreq H., Eckstein F., (1997), *RNA*, 3, 429-437.
17. Wrzesiński J., Łęgiewicz M., Ciesiolka J., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 28, 1785-1793.
18. Pan W-H., Devlin H. F., Kelley C., Isom H. C., Clawson G. A., (2001), *RNA*, 7, 610-621.
19. Allawi H. T., Dong F., Ip H. S., Neri B. P., Lyamichev V. I., (2001), *RNA*, 7, 314-327.
20. Branch A. D., (1998), *TIBS*, 23, 45-50.
21. Stephenson M., Zamecnik P., (1978), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 285-288.
22. Hostomsky Z., Hostomska Z., Matthews D. A., (1994), *Nucleases*, Eds. Linn S. M., Lloyd R. S., Roberts R. J., 2nd ed., 341-376, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
23. Cook P. D., (1998), *Ann. Rep. Med. Chem.*, 33, 313-320.
24. Lima W. F., Crooke S., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 27513-27516.
25. Agrawal S., Kandimall E. R., (2000), *Mol. Med. Today*, 60, 72-81.
26. Vaish N. K., Kore A. R., Eckstein F., (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 5237-5242.

27. Goodchild J., (2000), *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2, 272-281.
28. Seyhan A. A., Amaral J., Burke J. M., (1998), *Nucleic Acids Res.*, 26, 3494-3504.
29. Fedor M. J., (2000), *J. Mol. Biol.*, 297, 269-291.
30. Been M. D., Wickham G. S., (1997), *Eur. J. Biochem.*, 247, 741-753.
31. Ciesiolka J., Wrzesinski J., Łęgiewicz M., Smólska B., Dutkiewicz M., (2001), *Acta Biochim. Pol.*, 48, 409-418.
32. Altman S., Kirsebom L., (1999), *The RNA World*, 351-379, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press.
33. Tanner N.K., (1999), *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 257-275.
34. Forster A. C., Altman S., (1990), *Science*, 249, 783-786.
35. Frank D., Harris M., Pace N. R., (1994), *Biochemistry*, 33, 10800-10808.
36. Werner M., Rosa E., Nordstrom J. L., (1998), *RNA*, 4, 847-855.
37. Sullenger B., Cech T., (1993), *Science*, 262, 1566-1569.
38. Phylactou L. A., Kilpatrick M. W., Wood M. J. A., (1998), *Hum. Mol. Genet.*, 7, 1649-1653.
39. Weatherall D. J., (1998), *Current Biology*, 8, R696-R698.
40. Amarzguioui M., Prydz H., (1998), *CMLS*, 54, 1175-1202.
41. Hampel A., (1998), *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 58, 1-39.
42. Usman N., Blatt L. M., (2000), *J. Clin. Invest.*, 106, 1197-1202.
43. Tabler M., Homann M., Tzortzakaki S., Sczakiel G., (1994), *Nucleic Acids Res.*, 22, 3958-3965.
44. Ojwang J. O., Hampel A., Looney D. J., Wong-Staal F., Rapaport J., (1992), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89, 10802-10806.
45. Yu M., Ojwang J., Yamada O., Hampel A., Rapaport J., Looney D., Wong-Staal F., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 6340-6344.
46. Yu M., Leavitt M. C., Maruyama M., Yamada O., Young D., Ho A. D., Wong-Staal F., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 699-704.
47. Düzgünes N., Pretzer E., Simões S., Slepishkin V., Konopka K., Flasher D., Pedroso de Lima M. C., (1999), *Mol. Membr. Biol.*, 16, 111-118.
48. Bramlage B., Luzi E., Eckstein F., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 21, 4059-4067.
49. Klebba C., Ottmann O. G., Scherr M., Pape M., Engels J. W., Grez M., Hoelzer D., Klein S. A., (2000), *Gene Therapy*, 7, 408-416.
50. Michienzi A., Cagnon L., Bahner I., Rossi J. J., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 16, 8955-8960.
51. Koizumi M., Ozawa Y., Yagi R., Nishigaki T., Kaneko M., Oka S., Kimura S., Iwamoto A., Komatsu Y., Ohtsuka E., (1998), *Nucleosides Nucleotides*, 17, 207-218.
52. Dirani-Diab R., Sarih-Cottin L., Delord B., Dumon B., Moreau S., Toulme J. J., Fleury H., Litvak S., (1997), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 41, 2141-2148.
53. Park W.-S., Miyano-Kurosaki N., Abe T., Takai K., Yamamoto N., Takaku H., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 270, 953-960.
54. Homann M., Tzortzakaki S., Ritter K., Sczakiel G., Tabler M., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 2809-2814.
55. Sriram B., Banerjee A. C., (2000), *Biochem. J.*, 352, 667-673.
56. Giordano V., Jin D.-Y., Rekosh D., Jeang K.-T., (2000), *Virology*, 267, 174-184.
57. Lo K. M., Biasolo M. A., Dehni G., Palu G., Haseltine W. A., (1992), *Virology*, 190, 176-183.
58. Crisell P., Thompson S., James W., (1993), *Nucleic Acids Res.*, 21, 5251-5255.
59. Jackson W. H., Moscoso H., Nechtman J. F., Galileo D. S., Garver F. A., Lanclos K. D., (1998), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 245, 81-84.
60. Hormes R., Homann M., Oelze I., Marschall P., Tabler M., Eckstein F., Sczakiel G., (1997), *Nucleic Acids Res.*, 25, 769-775.
61. Kuwabara T., Warashina M., Nakayama A., Ohkawa J., Ohkawa J., Taira K., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 1886-1891.
62. Dash B. C., Harikrishnan T. A., Goila R., Shahi S., Unwalla H., Husain S., Banerjee A. C., (1998), *FEBS Lett.*, 431, 395-399.
63. Zhang X., Xu Y., Ling H., Hattori T., (1999), *FEBS Lett.*, 458, 151-156.

64. Wakita T., Wands J. R., (1994), *J. Biol. Chem.*, 269, 14205-14210.
65. Seki M., Honda Y., (1995), *J. Biochem.*, 118, 1199-1204.
66. Mizutani T., Kato N., Hirota M., Sugiyama K., Murakami A., Shimotohno K., (1995), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 212, 906-911.
67. Alt M., Renz R., Hofschneider P. H., Paumgartner G., Caselmann W. H., (1995), *Hepatology*, 22, 707-717.
68. Vidalin O., Major M. E., Rayner B., Imbach J. L., Trepo C., Inchauspe G., (1996), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 40, 2337-2344.
69. Hanecak R., Brown-Driver V., Fox M. C., Azad R. F., Furusako S., Nozaki C., Ford C., Sasmor H., Anderson K. P., (1996), *J. Virol.*, 70, 5203-5212.
70. Lima W. F., Brown-Driver V., Fox M. C., Hanecak R., Bruice T. W., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 626-638.
71. Eisenhardt S., Samstag W., Jahn-Hofman K., Engels J. W., Renz R., Hofschneider P. H., Caselmann W. H., Alt M., (1997), *Nucleosides Nucleotides*, 16, 1669-1672.
72. Alt M., Renz R., Hofschneider P. H., Caselmann W. H., (1997), *Arch. Virol.*, 142, 589-599.
73. Wu C. H., Wu G. Y., (1998), *Gastroenterology*, 114, 1304-1312.
74. Zhang H., Hanecak R., Brown-Driver V., Azad R., Conklin B., Fox M. C., Anderson K. I., (1999), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 43, 347-353.
75. Alt M., Eisenhardt S., Serve M., Renz R., Engels J. W., Caselmann W. H., (1999), *Eur. J. Clin. Invest.*, 29, 868-876.
76. Tsuchihara K., Hijikata M., Fukuda K., Kuroki T., Yamamoto N., Shimotohno K., (1999), *Virology*, 258, 100-107.
77. Sakamoto N., Wu C. H., Wu G. Y., (1996), *J. Clin. Invest.*, 12, 2720-2728.
78. Lieber A., He Ch-Y, Polyak S. J., Gretch D. R., Barr D., Kay M. A., (1996), *J. Virol.*, 12, 8782-8791.
79. Macejak D. G., Jensen K. L., Jamison S. F., Domenico K., Roberts E. C., Chaudhary N., von Carlowitz I., Bellon L., Tong M. J., Conrad A., Pavco P. A., Blatt L. M., (2000), *Hepatology*, 31, 769-776.
80. Ohkawa K., Yuki N., Kanazawa Y., Ueda K., Mita E., Sasaki Y., Kasahara A., Hayashi N., (1997), *J. Hepatol.*, 27, 78-84.
81. zu Putlitz J., Yu Q., Burke J. M., Wands J. R., (1999), *J. Virol.*, 73, 7, 5381-5387.
82. Beck J., Nassal M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 23, 4954-4962.
83. Passman M., Weinberg M., Kew M., Arbuthnot P., (2000), *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 268, 728-733.
84. Offensperger W-B., Offensperger S., Walter E., Teubner K., Igloi G., Blum H. E., Gerok W., (1993), *EMBO J.*, 12, 1257-1262.
85. Li H., Mao Q., Li Q., (1999), *Chung Hua Kan Tsang Ping Tsa Chih.*, 7, 1, 13-4.
86. Xing Z., Whitton J. L., (1993), *J. Virol.*, 67, 1840-1847.
87. Cantor G. H., McElwain T. F., Birkebak T. A., Palmer G. H., (1993), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 10932-10936.
88. Heidenreich O., Kang S-H., Brown D. A., Xu X., Swiderski P., Rossi J. J., Eckstein F., Nerenberg M., (1995), *Nucleic Acids Res.*, 12, 2223-2228.
89. Azad R. F., Driver V., Tanaka K., Crooke R. M., Anderson K. P., (1993), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 37, 1945-1954.
90. Trang P., Lee M., Nepomuceno E., Kim J., Zhu H., Liu F., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 5812-5817.