

Molekula RNA kao lijek

Vodoljšak, Aleksandrina

Undergraduate thesis / Završni rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:531424>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-09**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
Kemijски odsjek

Aleksandrina Vodolšak

Studentica 3. godine Preddiplomskog sveučilišnog studija KEMIJA

Molekula RNA kao lijek

Završni rad

Rad je izrađen u Zavodu za biokemiju

Mentor rada: Doc.dr.sc. Jasmina Rokov Plavec

Zagreb, 2021.

Datum predaje prve verzije Završnog rada: 30. lipnja 2021.

Datum ocjenjivanja Završnog rada i polaganja Završnog ispita: 24. rujna 2021.

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasmina Rokov Plavec

Potpis:

Sadržaj

§ SAŽETAK.....	VII
§ 1. UVOD.....	1
1.1. Molekula RNA.....	1
1.1.1. Struktura RNA.....	1
1.1.2. Vrste RNA.....	3
1.1.3. Transkripcija i translacija	4
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME	11
2.1. RNA interferencija.....	11
2.2. Antisense oligonukleotidi	13
2.3. mRNA cjepiva	19
2.4. Zaključak.....	26
§ 3. LITERATURNI IZVORI.....	28

§ Sažetak

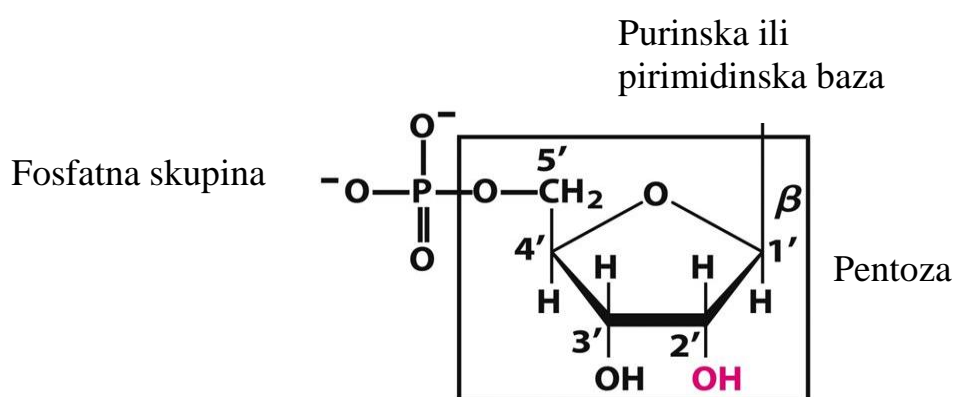
Ribonukleinska kiselina (RNA) važna je biološka makromolekula sastavljena od šećera riboze, dušične baze i fosfatne skupine. Najvažnije vrste RNA molekula su: glasnička RNA (mRNA), transfer-RNA (tRNA), ribosomska RNA (rRNA) te male RNA (snRNA i miRNA) koje sudjeluju u procesu sinteze proteina. Cilj rada je upoznati se s novim i učinkovitim terapijskim tehnologijama temeljenima na RNA koji se koriste u liječenju raznih bolesti. Duchenne mišićna distrofija, spinalna mišićna atrofija, homozigotna obiteljska hiperkolesterolemija samo su neke od bolesti za koje se koristi terapijska tehnologija temeljena na RNA. Terapija pomoću molekula RNA uključuje korištenje *antisense* oligonukleotida koji mogu djelovati na translaciju, razgradnju mRNA ili prekrajanje primarnog transkripta. Osim toga, i molekula mRNA može djelovati terapijski, te su opisana mRNA cjepiva, nova klasa cjepiva važna u borbi protiv pandemije koronavirusa SARS-CoV-2.

§ 1. UVOD

1.1. Molekula RNA

1.1.1. Struktura RNA

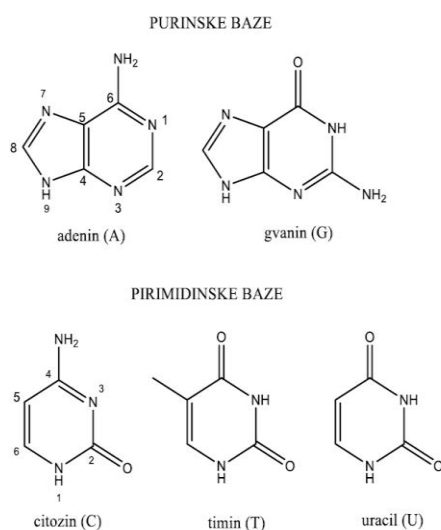
Ribonukleinska kiselina (RNA) polimer je pirimidinskih i purinskih ribonukleotida koji su međusobno povezani 3',5'-fosfodieterskom vezom. Nukleotid je osnovna građevna jedinica nukleinskih kiselina sastavljena od šećera pentoze, dušične baze i fosfatne skupine (slika 1.) preko koje su ti nukleotidi povezani fosfodieterskim vezama u dugačke linearne lance nukleinskih kiselina.



Slika 1. Struktura nukleotida – preuzeto i prilagođeno prema²

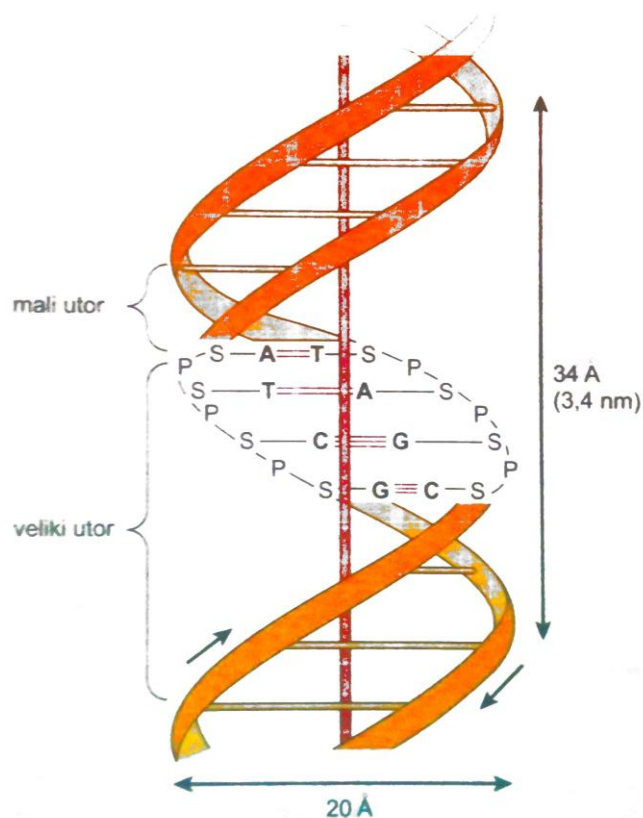
Glavna razlika u kovalentnoj strukturi između RNA i DNA je što u RNA riboza na 2'-ugljikovom atomu posjeduje hidroksilnu skupinu, dok deoksiriboza u DNA ima vodikov atom. Molekule RNA mnogo su manje stabilne u alkalnim uvjetima od DNA jer 2'-hidroksilna skupina RNA (koje nema u DNA) djeluje kao nukleofil tijekom hidrolize 3',5'-fosfodieterske veze.¹ Nukleinske kiseline imaju određenu polarnost, odnosno određeni smjer, dogovorno od 5'- prema 3'-kraju.

Šećer u ribonukleozidima kao i u deoksiribonukleozidima vezan je za dušičnu bazu β -N-glikozidnom vezom. Dušične baze mogu biti purinskog ili pirimidinskog tipa. Purinske baze su adenin i gvanin, dok su pirimidinske baze citozin, uracil i timin (prikazano na slici 2.). RNA sadrži adenin, gvanin i citozin, ne posjeduje timin kao DNA već umjesto timina sadržava uracil.



Slika 2. Strukture purinskih i pirimidinskih baza - preuzeto i prilagođeno prema²

Watson i Crick 1953. godine predložili su model u kojem se dva polinukleotidna lanca DNA obavijaju oko zajedničke osi stvarajući dvostruku zavojnicu kao što je prikazano na slici 3., pri čemu je ta zavojnica desna. Polinukleotidni lanci su međusobno antiparalelni. Na vanjskoj strani zavojnice smještena je fosfodieterska okosnica, a parovi baza smješteni su unutar zavojnice te baze stvaraju Watson-Crickove parove tako da se uvijek sparuje gvanin i citozin, odnosno adenin i timin. Ti parovi baza su okomiti na os zavojnice i razmaknuti su međusobno za 3,4 Å. Jedan okret sastoji se od 10 parova baza, tj. duljina jednog punog zavoja je 34 Å. Oba lanca te dvolančane zavojnice drže se zajedno s pomoću vodikovih veza između purinskih i pirimidinskih baza, kao i van der Waalsovih i hidrofobnih privlačenja između susjednih parova baza.¹ Za razliku od DNA koja je dvolančana zavojnica, molekula RNA može biti jednolančana.



Slika 3. Prikaz dvostruke zavojnice DNA - preuzeto iz ¹

1.1.2. Vrste RNA

Razlikujemo tri osnovne vrste molekule RNA: glasnička RNA (engl. *messenger RNA*, *mRNA*), transfer-RNA (engl. *transport RNA*, *tRNA*) i ribosomska RNA (engl. *ribosomal RNA*, *rRNA*). Glasnička RNA djeluje kao genetička informacija između DNA i ribosoma gdje dolazi do biosinteze proteina. Ona nastaje prilikom transkripcije gdje enzim RNA-polimeraza pretvara gen u primarni transkript mRNA. Transfer-RNA donose aktivirane aminokiseline na ribosom i prepoznaju kodone u mRNA tj. sudjeluju u prevođenju nukleotidne sekvence u slijed aminokiselina. Transfer-RNA ima ulogu adaptera. Hipoteza adaptera kaže da se aminokiseline ne vežu direktno na svoj triplet već da postoji neka molekula adaptera, neka nukleinska kiselina koja može prepoznati kodon. Molekule tRNA su jednolančane molekule RNA, dužine oko 73-95 nukleotida pri čemu njihova sekundarna struktura ima oblik djeteline. One koje sadrže 90 i više nukleotida imaju i varijabilnu ruku. U sekundarnoj strukturi tRNA razlikujemo akceptorsku peteljku, 3'-OH skupinu na koju se veže aminokiselina te DHU i T ψ C ruku koje služe definiranju specifičnih tRNA. Treća vrsta RNA je ribosomska RNA, rRNA. Ribosomska

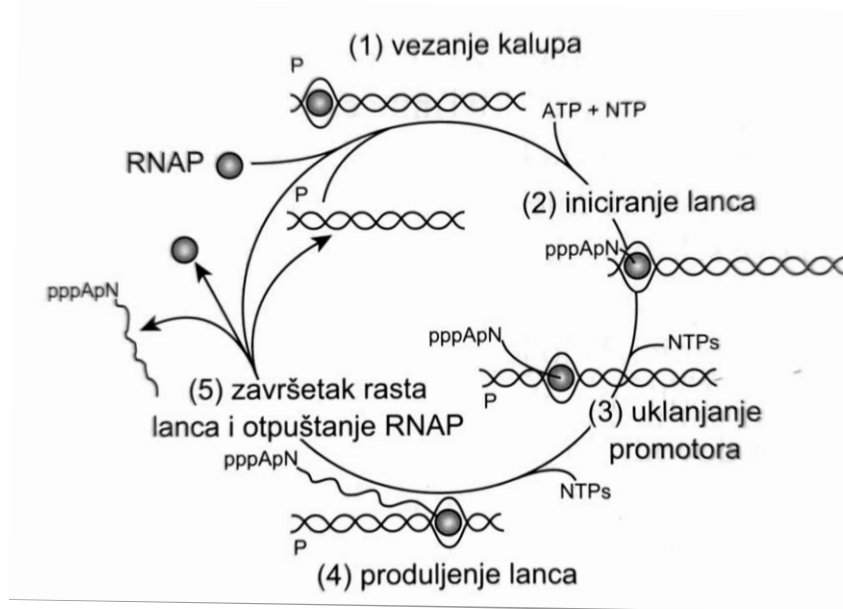
RNA je sastavni dio ribosoma, staničnih struktura na kojima se zbiva biosinteza proteina te sačinjava 2/3 njihove mase. U stanici je najzastupljenija rRNA, a najmanje je zastupljena mRNA. Osim tri osnovne vrste RNA, eukarioti sadrže i druge vrste RNA, kao što su male jezgrene RNA (snRNA) i mikro RNA (miRNA). Te dvije vrste malih RNA uključene su u doradu RNA i regulaciju ekspresije gena, no nisu direktno uključene u sintezu proteina. Mikro RNA su uglavnom dužine 21-25 nukleotida i stvaraju se nukleolitičkom doradom produkata različitih gena/ transkripcijskih jedinica, a sudjeluju u regulaciji translacije.¹ Male jezgrene RNA (snRNA) su nekodirajuće molekule RNA veličine oko 150 nukleotida koje imaju značajnu ulogu u prekrajanju pre-mRNA.

1.1.3. Transkripcija i translacija

Prema centralnoj dogmi molekularne biologije DNA je nositeljica nasljedne informacije. Nasljedna informacija se dalje prepisuje u RNA, a iz RNA se ta nasljedna informacija translira u proteine. Osim prepisivanja nasljednih informacija DNA u RNA, proces transkripcije obuhvaća sintezu RNA i njezinu doradu.³ Prilikom transkripcije prepisuje se jedan lanac DNA, a enzimi koji transkribiraju DNA se nazivaju DNA-ovisne RNA-polimeraze. Polinukleotidi RNA i DNA sintetiziraju se na sličan način. RNA-polimeraza vrši nukleofilni napad 3'-hidroksilne skupine rastućeg lanca na α -atom fosfora na 5'-kraju nadolazećeg ribonukleozid-trifosfata te pri tome nastaje lanac RNA produžen za jedan nukleotid. RNA-polimeraza tijekom polimerizacije privremeno razdvaja lanac kalup i kodirajući lanac DNA, odmata oko 17 parova baza te prilikom transkripcije u aktivnom mjestu RNA-polimeraze nastaje hibrid RNA-DNA koji sadrži oko 8 parova baza.

Proces transkripcije odvija se u tri faze: inicijacija, elongacija te terminacija transkripcije (prikazano na slici 4.). Inicijacija transkripcije započinje vezanjem RNA-polimeraze na promotorsko mjesto na kalupnome lancu. Za prepoznavanje promotora odgovorna je σ -podjedinica. RNA-polimeraza veže se na svoj promotor u obliku holoenzima koji se sastoji od srži enzima i σ -podjedinice. Nakon što je RNA-polimeraza pomoću svoje σ -podjedinice prepoznala promotor nastaje takozvani zatvoreni kompleks. Savijanjem dvolančane DNA i razmatanjem transkripcijskog mjehura, lanac kalup se smješta u aktivno mjesto i nastaje takozvani otvoreni kompleks gdje su lanci DNA razdvojeni te započinje sa sintezom RNA. Pri prelasku iz inicijacijske u elongacijsku fazu, RNA-polimeraza otpušta svoju σ -podjedinicu jer

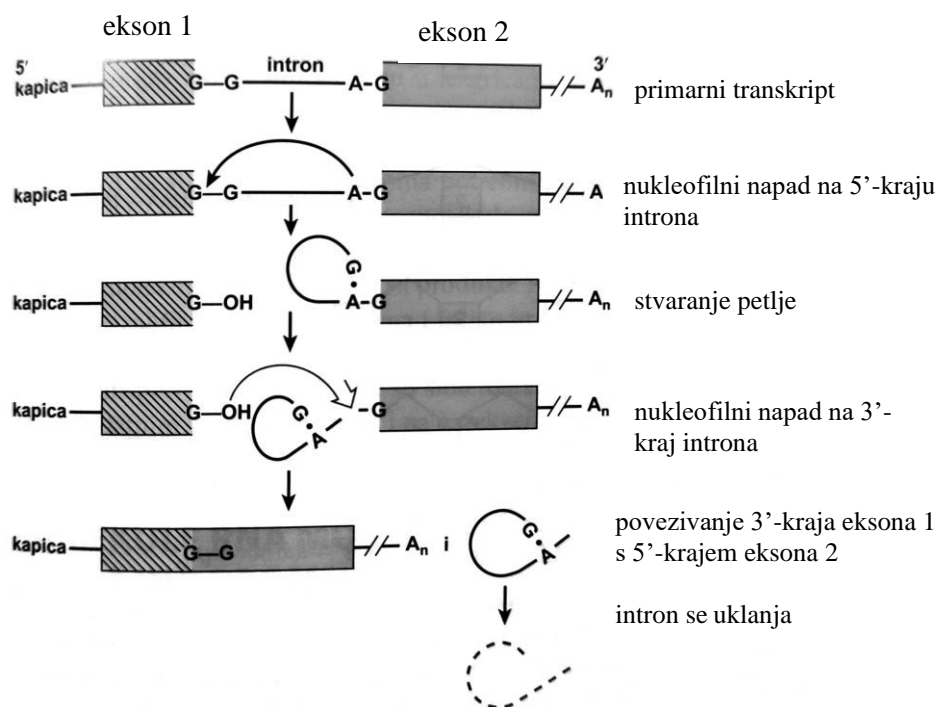
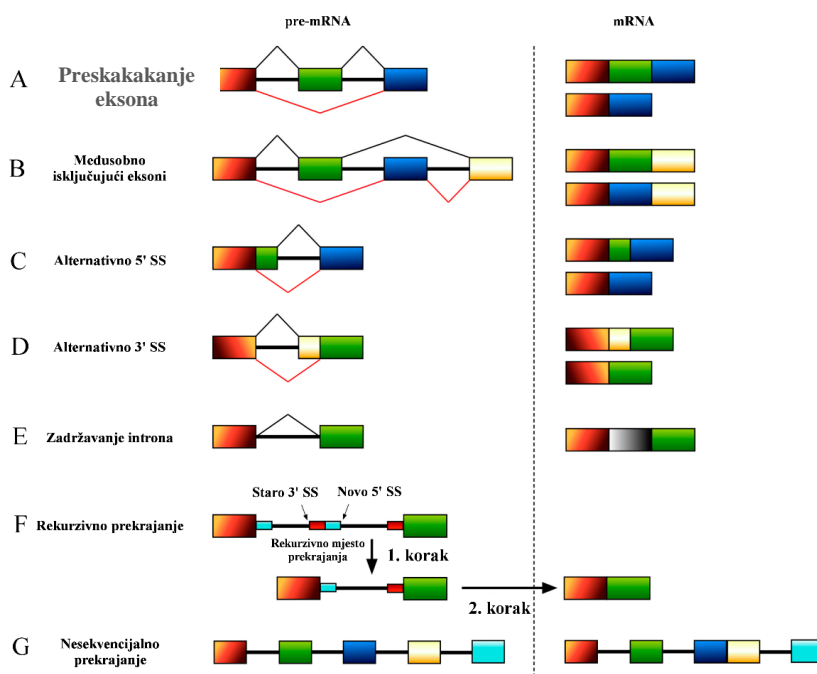
je za elongaciju dovoljna srž enzima. Razlikujemo dva mehanizma terminacije transkripcije: ρ -ovisan i ρ -neovisan. Kod ρ -neovisnog mehanizma dolazi do stvaranja ukosnice bogate G-C parovima u molekuli novonastale RNA, nakon koje slijedi dio bogat uridinom, dok kod ρ -ovisnog mehanizma terminacija transkripcije se odvija uz pomoć ρ -faktora, proteina koji posjeduje helikaznu aktivnost.



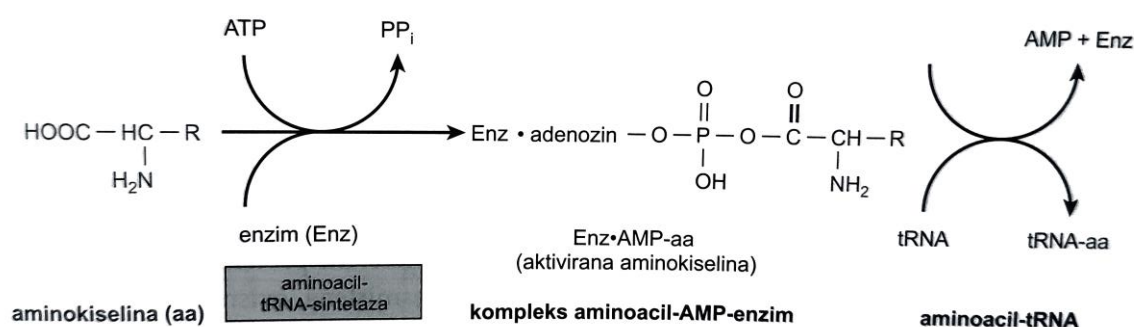
Slika 4. Transkripcija - preuzeto iz ¹

Transkripcija kod eukariota znatno je složenija od transkripcije kod prokariota. Kod eukariota su transkripcija i translacija prostorno odijeljene. Transkripcija se odvija u zasebnom staničnom odjeljku, staničnoj jezgri, dok se translacija odvija u citoplazmi. U eukariota razlikujemo tri različite vrste RNA-polimeraze: RNA-polimerazu I koja prepisuje gene za ribosomske RNA, RNA-polimerazu II koja transkribira sve gene za proteine, tj. stvara primarne transkripte za mRNA te RNA-polimerazu III koja sintetizira male molekule tRNA i 5S rRNA. Za razliku od prokariota, eukariotske RNA-polimeraze same po sebi ne mogu razlikovati promotorske sekvence od drugih regija DNA, pa stoga drugi proteini, znani i kao opći transkripcijski faktori (engl. *general transcription factors*, *GTF*), olakšavaju specifično vezivanje ovih enzima na promotor i stvaranje predinicijacijskog kompleksa (PIC).¹ Nakon sinteze, dolazi do prekrajanja mRNA (engl. *splicing*) pod kojim podrazumijevamo izrezivanje dijelova primarnog transkripta mRNA (introni) i povezivanje preostalih dijelova primarnog transkripta (eksoni). Na taj način nastaje zrela mRNA koja se sastoji samo od eksona. U procesu prekrajanja mRNA sudjeluju male nuklearne RNA snRNA (engl. *small nuclear RNA*) koje sačinjavaju male

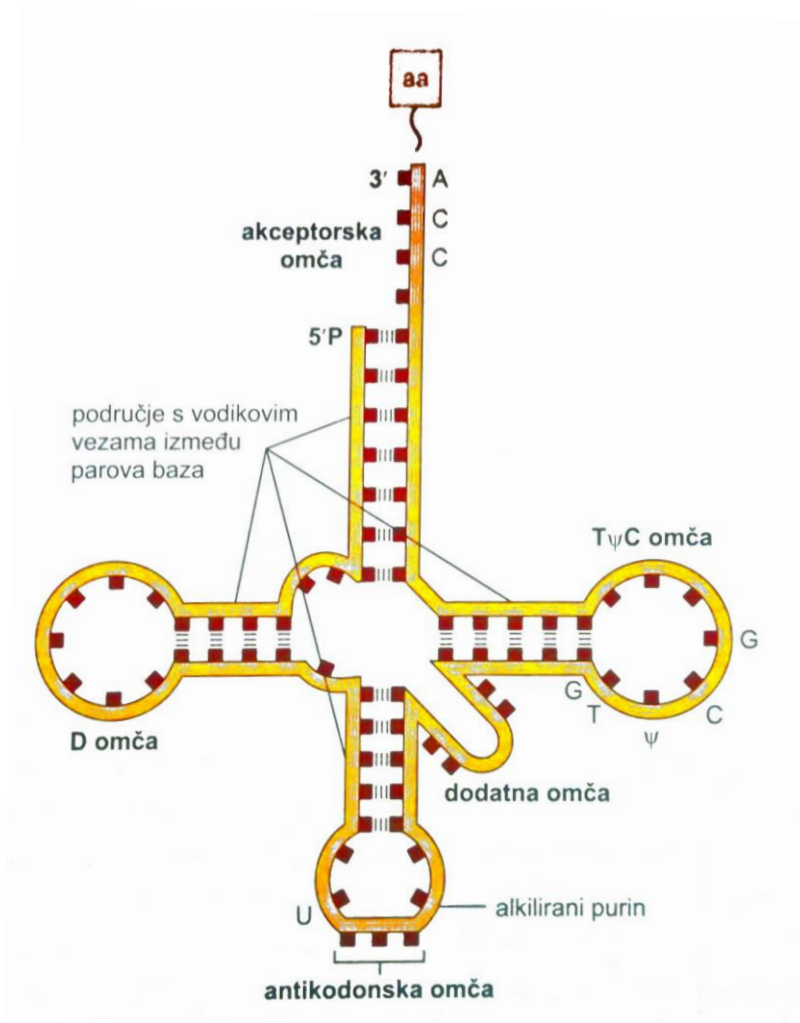
ribonukleoproteinske čestice, snRNP-ove (engl. *small nuclear ribonucleoprotein particles*). Izrezivanje introna (prikazano na slici 5.) se odvija kroz dvije reakcije esterifikacije, pri čemu se ne mijenja ukupni broj fosfodieterskih veza. Izrezivanje započinje tako što adenin sa 2'-OH skupinom nukleofilno napada 5'-kraj introna te pritom dolazi do oslobađanja 3'-OH skupine uzvodnog eksona i on sada može nukleofilno napasti 3'-kraj introna. Nastaje linearna, skraćena molekula RNA, a intron izlazi u strukturi omče koja je povezana 5'-2'-fosfodieterskom vezom. Prekrajnje omogućuje kompleks za prekrajnje (eng. *spliceosom*). *Spliceosom* je veliki ribonukleoproteinski kompleks koji se sastoji od 5 molekula malih jezgrinih RNA (engl. *small nuclear RNA, snRNA*) koje sačinjavaju tzv. snurp-ove, male ribonukleoproteinske čestice (engl. *small nuclear ribonucleoprotein particles, snRNP*). snRNA imaju aktivnu ulogu u izrezivanju introna jer prepoznaju mjesto grananja, 5'- i 3'-mjesto prekrajnja te kataliziraju reakciju prekrajnja. Alternativnim prekrajnjem nastaju različiti proteini iz istoga gena što omogućava veću raznolikost na razini proteinskih sekvenci. Postoji više različitih načina alternativnog prekrajnja kako je prikazano na slici 6. Alternativno prekrajnje RNA povećava broj mogućih genskih produkata eukariotskih genoma. Koristeći alternativno prekrajnje, omogućuje se sinteza različitih izoformi proteina koji se mogu razlikovati s obzirom na sastav, stabilnost, fiziološke i kemijske karakteristike, funkciju i lokaciju unutar stanice.⁴ Postoje i samoizrezujući introni, RNA koje autokatalitički kataliziraju svoje cijepanje. Za samoizrezujuće introne (engl. *self-splicing introns*) grupe I je karakteristično da koriste nukleotid kao kofaktor za prekrajnje, dok kod samoizrezujućih introna grupe II, introni izlaze u obliku omče.

Slika 5. Izrezivanje introna – preuzeto iz ¹Slika 6. Različiti načini alternativnog prekrivanja (SS-mjesto prekrivanja (engl. splice site)) - preuzeto iz ⁵

Biosinteza proteina (translacija) složeniji je proces od transkripcije, pri čemu se nukleotidni sljedovi koji su zapisani pomoću 4 nukleotida prevode u aminokiselinske sljedove koji sadrže 20 aminokiselina. Pritom se uspostavlja okvir čitanja, odnosno neprekidajuća sekvenca mRNA koja je podijeljena u skupine od tri nukleotida (kodon) koji kodiraju pojedine aminokiseline.³ Ključni sudionici u procesu translacije su glasničke RNA (mRNA) koja sudjeluje u prijenosu genetičke informacije između RNA i ribosoma, transfer-RNA koja ima ulogu adaptera te ribosom koji prepoznaje signale za inicijaciju translacije. Budući da aminokiseline ne mogu direktno vezati triplet, postoji molekula adaptera, tRNA koja prepoznaje pojedini kodon, a na nju je vezana aminokiselina koja odgovara tom kodonu. Enzimi koji vežu pripadajuću aminokiselinu na transfer-RNA nazivaju se aminoacil-tRNA-sintetaze koje kataliziraju reakciju aminoaciliranja tRNA u dva koraka (slika 7.). Prvi korak je aktivacija aminokiseline pomoću ATP u aminoacil-adenilat. Specifični aminoacil-AMP-enzimski kompleks potom prepoznaje specifičnu tRNA na koju vezuje aminoacilnu skupinu na 3'-hidroksi-adenozilni završetak¹ (slika 8.).



Slika 7. Reakcija aminoaciliranja tRNA – preuzeto iz ¹



Slika 8. Aminoacil-tRNA - preuzeto iz ¹

Translacija započinje na ribosomu, velikom nukleoproteinskom kompleksu koji se sastoji od ribosomske RNA i proteina. Bakterijski ribosom (70S) sastoji se od dvije podjedinice, velike podjedinice 50S i male podjedinice 30S, dok je kod eukariotskih ribosoma (80S) velika podjedinica 60S, a mala 40S. U velikoj podjedinici ribosoma je smješteno katalitičko mjesto koje katalizira nastajanje peptidnih veza, a ribosom osigurava i točnost translacije. Tri vezna mjesta u koja se transfer-RNA može vezati su A (mjesto ulaska aminoacilirane tRNA u ribosom), P (vezana peptidil-tRNA) i E (mjesto izlaska). Ribosomi transliraju mRNA od 5'-prema 3'-kraju što znači da ribosomi u bakterijskim stanicama mogu translirati mRNA i prije nego je ta mRNA do kraja sintetizirana. Shine-Dalgarnova sekvenca, regija u mRNA, omogućava prepoznavanje AUG kodona kao start kodona. Translacija se slično kao i

transkripcija sastoji od tri faze, inicijacije, elongacije i terminacije. Inicijacija translacije započinje sklapanjem velike i male podjedinice ribosoma s mRNA i inicijatorskom tRNA. Mala podjedinica ribosoma je u početku u kompleksu s inicijacijskim faktorima 1 i 3 te se na takav kompleks veže mRNA. Inicijatorsku tRNA ($tRNA_f^{Met}$) prepoznaje inicijacijski faktor 2 u kompleksu s GTP-om, otpuštaju se inicijacijski faktori 1 i 3, dolazi do hidrolize GTP-a i nastaje inicijacijski kompleks velike i male podjedinice. Proces elongacije možemo podijeliti na tri procesa: dekodiranje, sintezu peptidne veze te translokaciju. Na kraju inicijacije imamo tRNA vezanu u P mjesto. Zatim dolazi do vezanja aminoacil-tRNA u kompleksu s elongacijskim faktorom EFTu u A mjesto. α -amino skupina na novoj aminoacil-tRNA na mjestu A provodi nukleofilni napad na esterificiranu karboksilnu skupinu peptidilne tRNA koja zauzima mjesto P (peptidilno ili polipeptidno mjesto).¹ Nakon stvaranja peptidne veze, elongacijski faktor EF-G u kompleksu s GTP-om potiče translokaciju, pomak mRNA za jedan kodon. Kada tRNA disocira iz E mjesta, dolazi do vezanja nove aminoacil-tRNA u A mjesto te se cijeli ciklus može ponoviti ovisno o broju kodona koji treba očitati. Kada u A mjesto dođe STOP kodon, dolazi do terminacije transkripcije. STOP kodone prepoznaju faktori otpuštanja (RF-1, RF-2) koji se vežu u A mjesto ribosoma i potiču peptidil-transferazni centar na hidrolizu esterske veze u P-mjestu pri čemu dolazi do otpuštanja polipeptida. Na kraju još mora doći do razdvajanja ribosoma interakcijom RF-3 te RRF koji se veže u prazno A-mjesto ribosoma i uz pomoć EF-G istiskuje aminoaciliranu-tRNA iz P mjesta. mRNA se tada otpušta s ribosoma koji se razdvaja na svoje sastavnice 40S i 60S podjedinice i još se jedan ciklus translacije mRNA može ponoviti.¹ Translacija kod eukariota slična je kao kod bakterija, samo je kompliciranija inicijacija translacije.

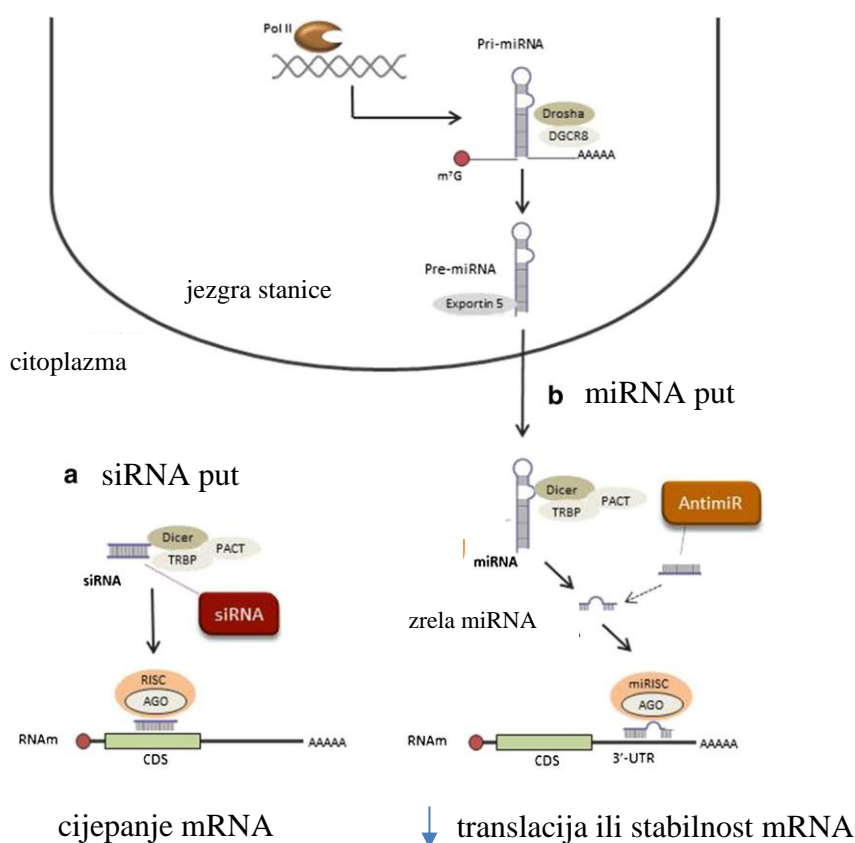
§ 2. PRIKAZ ODABRANE TEME

2.1. RNA interferencija

RNA interferencija (engl. *RNA interference*, *RNAi*) je proces razgradnje ciljane mRNA nakon interakcije s mikro RNA (miRNA) pri čemu dolazi do utišavanja ekspresije gena. RNAi mehanizam prvi put je uočen u obliku (*Caenorhabditis elegans*) u kojem je miRNA uspješno utišala ekspresiju gena. U jezgri preteče miRNA (pri-mRNA) nastaju prilikom transkripcije koju obavlja RNA-polimeraza II. Kako bi postale funkcionalne miRNA, te pri-mRNA obrađuje endonukleaza Drosha te ih zatim iz jezgre u citoplazmu prenosi eksportin-5 te se tamo dalje obrađuje pomoću endonukleaze Dicer. Tako obrađena dvolančana miRNA sada stvara kompleks miRISC nastao povezivanjem s utišavajućim kompleksom induciranim s RNA (engl. *RNA-induced silencing complex – RISC*). Unutar kompleksa dolazi do odmotavanja dvolančane miRNA, prolazni lanac se odbacuje, a lanac vodič (engl. *guide RNA*) veže ciljnu mRNA djelomičnim sparivanjem komplementarnih baza. Na kraju dolazi do utišavanja ciljnog gena degradacijom, cijepanjem ili translacijskom represijom ciljne mRNA molekule.⁶ miRNA uključene su u brojne stanične procese te imaju važnu ulogu u brojnim bolestima, poput raka, virusnih infekcija i genetskih bolesti. Procjenjuje se da miRNA kao klasa reguliraju 60% ekspresije gena u ljudskom genomu za kontrolu diferencijacije, razvoja i fiziologije.⁷

siRNA (male interferirajuće RNA) duljine 21-22 nukleotida su kratke dvolančane RNA molekule koje također sudjeluju u mehanizmu utišavanja gena. Nakon procesiranja ribonukleazom Dicer, siRNA stupa u interakciju s RISC kompleksom te ga aktivira. Sudbina ciljne mRNA djelomično ovisi o proteinu Argonaut (AGO2), a dijelom o maloj interferirajućoj RNA u kompleksu s RISC. Male interferirajuće RNA usmjeravaju RISC koji sadržava AGO2 do komplementarne mRNA pri čemu dolazi do endonukleolitičkog cijepanja mRNA. siRNA u kompleksu s RISC se oslobađa te može dalje sudjelovati u razgradnji druge mete. Budući da utišavanje gena ovisi o broju molekula siRNA uvedenih u stanicu te da broj dupleksa po stanici opada kako se stanice dijele, utišavanje ciljanih gena sintetskom siRNA obično je ograničeno na dva tjedna ili čak samo na 3-7 dana ako se stanice brzo dijele⁸. Dobro dizajnirane male interferirajuće RNA mogu postići i do 90% utišavanja predviđene mete. Sadržaj gvanin-citozina (GC) u siRNA duplesku može poslužiti kao parametar koji bi mogao korelirati s

funkcionalnošću siRNA. Previsok sadržaj gvanin-citozina u dupleksu, može usporiti njegovo razmatanje. RNA sekvence bogate gvaninom mogu formirati Hoogsteenove uparene kvartete načinjene od G-ostataka, takozvane tetrade (engl. *tetrads*) koje mogu uzrokovati poteškoće prilikom sinteze i pročišćavanja RNA. S druge strane prenizak sadržaj GC-parova može smanjiti učinkovitost prepoznavanja i hibridizacije ciljne mRNA. Da bi siRNA terapija bila uspješna, siRNA molekula mora biti pravilno orijentirana i ugrađena u AGO protein RISC kompleksa kako bi se tzv. prolazni lanac mogao pocijepati te otpustiti, a lanac vodič komplementarno vezati s ciljnom mRNA molekulom.⁶ Do cijepanja lanca vodiča može doći ako je nepravilno orijentirana siRNA pri čemu se prolazni lanac veže s AGO proteinom. Pritom može doći do neželjenih posljedica jer se prolazni lanac može spariti s drugom molekulom RNA. Problemi siRNA riješeni su uvođenjem kemijskih modifikacija. U lancu vodiču, fosforotiodatne internukleotidne veze na 3'-kraju i 2'-O-metil nukleotidne supstitucije u jednom ili dva unutarnja nukleotida, poboljšavaju otpornost siRNA na nukleaze.⁹ Mehanizam RNA interfencije putem siRNA i miRNA prikazan je na slici 9.



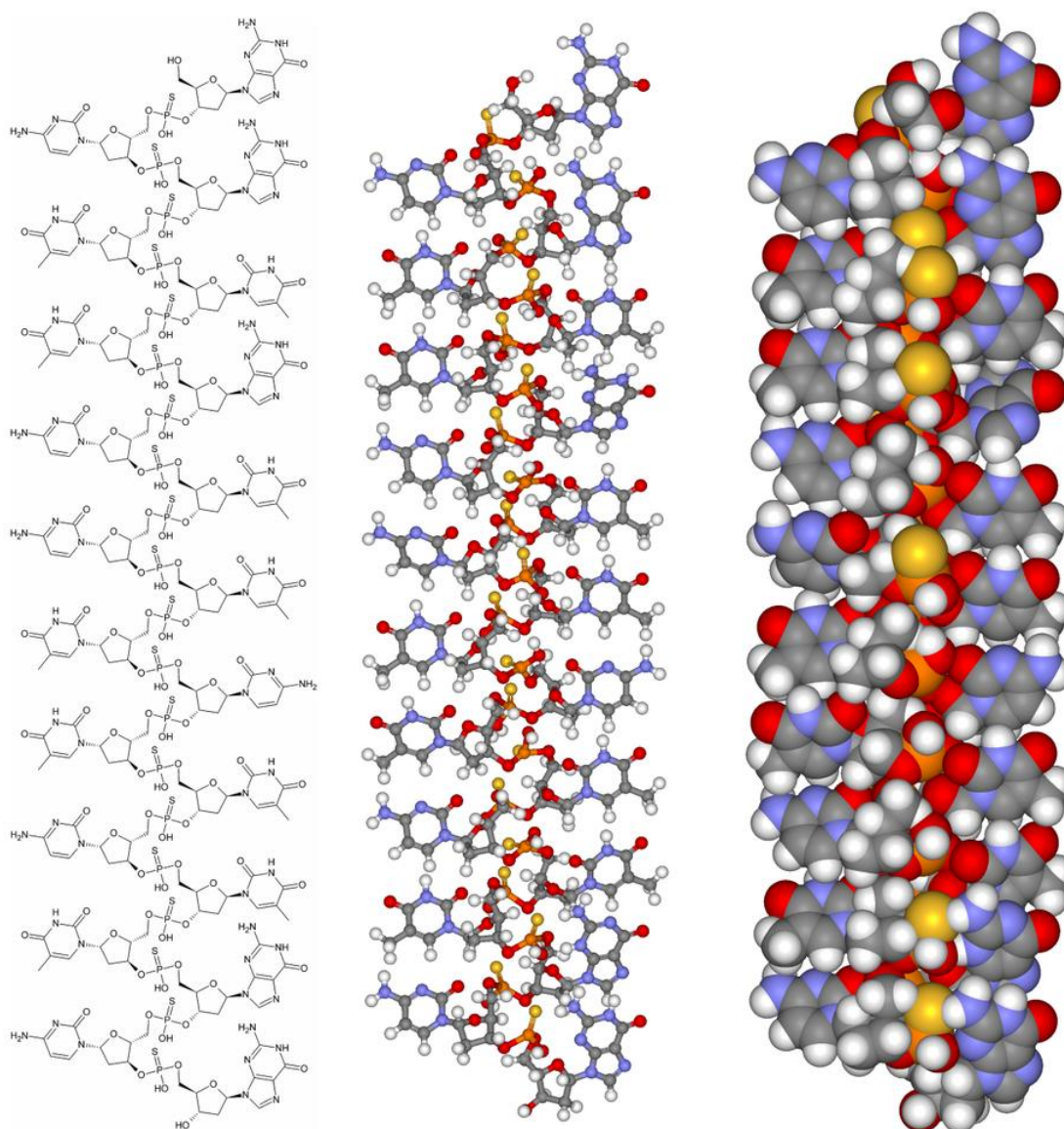
Slika 9. Mehanizam RNAi: (a) putem siRNA, (b) putem miRNA; AntimiR- *antisense* sekvence koje inhibiraju specifične miRNA - preuzeto i prilagođeno prema ¹⁰

Virus hepatitisa C (HCV) je jednolančani RNA virus iz obitelji Flaviviridae. HCV genom sadrži jedan dugačak, otvoren okvir čitanja okružen 5'- i 3'-netranslatiranim regijama (engl. *untranslated region, UTR*) koji su važni za translaciju i replikaciju virusne RNA.¹¹ 5'-regija, koja se nalazi uzvodno od otvorenog okvira čitanja sadrži 4 visoko strukturirane domene koje tvore unutarnje mjesto ulaska ribosoma (engl. *internal ribosomal entry site, IRES*), dok je 3'-regija uključena u regulaciju translacije. Za liječenje infekcije hepatitisa C koristi se Miravirsen. Miravirsen je *antisense* oligodeoksinukleotid (antimiR) koji se sastoji od 15 nukleotida čija sekvenca se selektivno veže na ljudsku mikro-RNA miR-122. Ljudska miRNA miR-122 omogućuje vezanje proteina Argonaut na 5'-UTR regiju virusne RNA, te se na taj način virusna RNA štiti od uobičajeno prisutnih staničnih nukleaza.¹² Vezanjem na miR-122, Miravirsen uklanja ovu zaštitu koja štiti virusnu RNA od razgradnje nukleazama što dovodi do razgradnje virusne genomske RNA, čime se onemogućuje daljnje širenje virusa. Kroz dvije faze kliničkih ispitivanja utvrđena je sigurnost lijeka Miravirsen. Većina lijekova temeljenih na RNAi su siRNA, jedino Miravirsen cilja sekvencu miRNA.

2.2. *Antisense* oligonukleotidi

Antisense oligonukleotid (engl. *antisense oligonucleotide, ASO*) je kratki nekodirajući oligonukleotid koji je komplementaran ciljnoj mRNA. Tri najčešće korištena ASO mehanizma djeluju putem RNaze H, siRNA te prekranjanja¹³. Najviše istraživani su *antisense* lijekovi koji djeluju preko RNaze H. ASO se vežu za ciljnu sekvencu RNA unutar stanice te dovode do utišavanja ekspresije gena indukcijom aktivnosti RNaze H, ribonukleaze koja cijepa kompleks ASO-mRNA. Zamecnik i Stephenson 1978. pronašli su da sintetski ASO koji je bio komplementaran ciljnoj sekvenci virusa Rousovog sarkoma inhibira replikaciju virusa i translaciju proteina *in vitro*⁹. U svrhu smanjenja razgradnje sintetskog ASO staničnim nukleazama uveli su kemijske modifikacije 3'- i 5'-krajeva ASO oligonukleotida poboljšavajući time njegovu aktivnost. Prvi FDA odobren lijek (1998.) bio je Formivirsen kao lijek za retinitis izazvan citomegalovirusom (engl. *cytomegalovirus, CMV*) kod pacijenata s AIDS-om. Formivirsen je *antisense* 21-člani oligonukleotid s fosforotioatnim vezama (slika 10.) koji inhibira replikaciju humanog citomegalovirusa. Komplementaran je virusnoj mRNA koja nastaje transkripcijom dijela virusnog genoma IE2 (engl. *immediate-early region 2, IE2*) koji

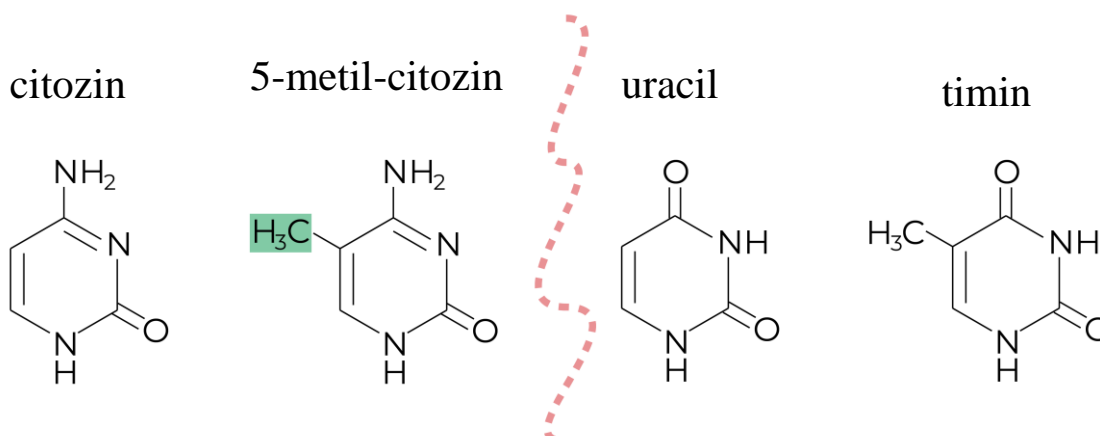
kodira proteine bitne za replikaciju virusa. Vežanje formivirsena na ciljnu virusnu mRNA dovodi do inhibicije biosinteze proteina IE2 pri čemu se ometa replikacija citomegalovirusa.



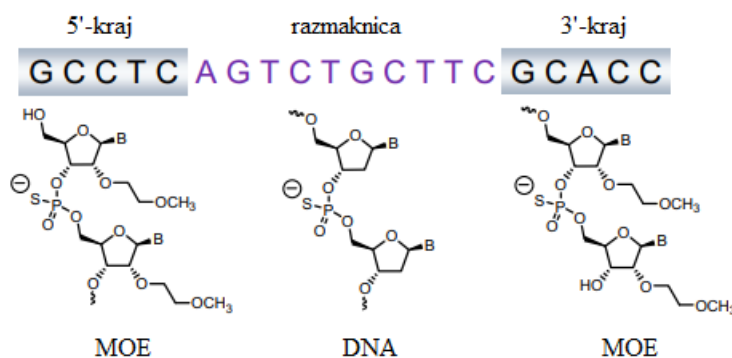
Slika 10. Struktura Formivirsena – preuzeto iz ¹⁴

Idućoj generaciji *antisense* lijekova pripada lijek Mipomersen, trgovačkog naziva Kynamro, koji je odobren 2013. godine. Mipomersen se koristi za liječenje homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije, genetičkog poremećaja metabolizma lipida uzrokovanog mutacijom gena za receptor lipoproteina male gustoće (engl. *low density lipoprotein, LDL*) što dovodi do povišenih vrijednosti LDL u krvi¹⁵. Mehanizam djelovanja započinje vezanjem na glasnčku RNA koji kodira apolipoprotein B-100 (ApoB-100), glavnu komponentu LDL-a i lipoproteina

vrlo male gustoće (engl. *very low density lipoprotein, VLDL*). Posljedično, dolazi do razgradnje RNA enzimom ribonukleaza H. Struktura Mipomersena sastoji se od 20 nukleotida sa slijedom 5'-GCCUC AGTCTGCTTC GCACC-3'. Citozin(C) i uracil(U) baze su modificirane na 5'-kraju metilnom skupinom (slika 11.) te je kod prvih i zadnjih 5 nukleotida hidroksilna skupina supstituirana metoksietilom na 2'-ugljikovom atomu riboze (2'-O-metoksietil-RNA, MOE RNA) kao što je prikazano na slici 12.



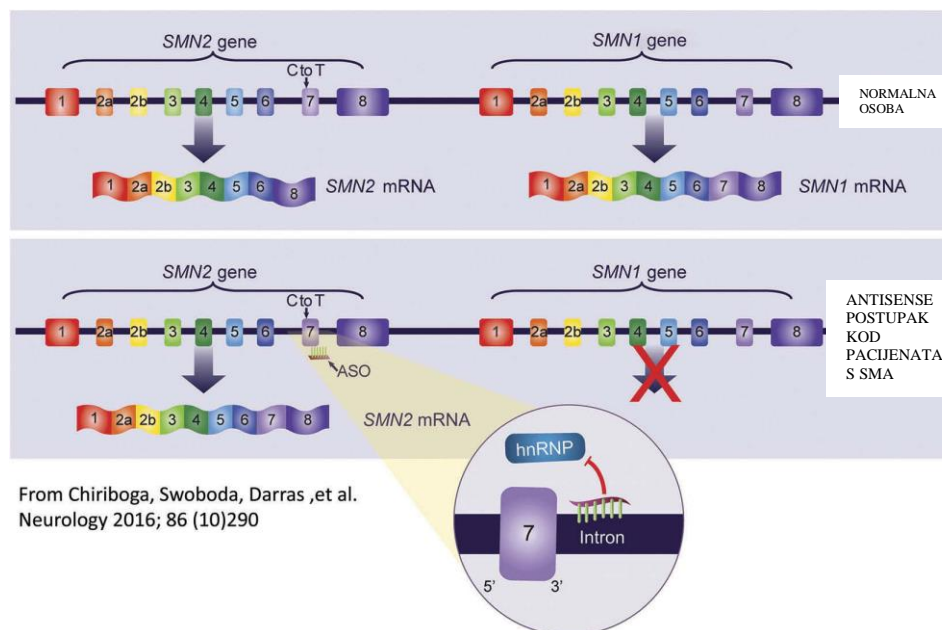
Slika 11. Metilacija citozina i uracila – preuzeto i prilagođeno prema¹⁶



Slika 12. Struktura Mipomersena – preuzeto iz³

Antisense oligonukleotidi primjenjuju se u istraživanju neurodegenerativnih poremećaja poput Alzheimerove bolesti, Parkinsonove i Huntingtonove bolesti, spinalne mišićne atrofije te multiple skleroze (MS). Spinalna mišićna atrofija (SMA) je genetski neuromuskularni poremećaj karakteriziran gubitkom spinalnih motornih neurona koji dovode do slabosti mišića¹⁷. Ova bolest nastaje uslijed nedovoljne količine proteina SMN (engl. *survival motor*

neuron 1) koji je bitan za normalnu funkciju motornih neurona. Kod ljudi postoje dva gena koji kodiraju protein SMN: gen *SMN1* koji se nalazi na telomeri kromosoma 5q, te gen *SMN2* koji se nalazi na centromeri. Broj kopija gena *SMN2* varira od 0 do 8. Sljedovi gena *SMN1* i *SMN2* su gotovo identični, a glavna razlika je u tome što gen *SMN2* sadrži zamjenu C → T koja dovodi do alternativnog prekrajanja eksona 7, te većina *SMN2* transkripata ne sadrži ekson 7 što dovodi do nastanka nefunkcionalnog SMN proteina.¹⁸ Stoga većina proteina SMN nastaje ekspresijom gena *SMN1*. Spinalna mišićna atrofija nastaje zbog homozigotne delecije ili mutacije gena *SMN1* pri čemu je gen *SMN1* nefunkcionalan pa jedino *SMN2* gen eksprimira SMN protein kojeg nema dovoljno zbog gore navedenog alternativnog prekrajanja.¹⁸ Neadekvatna razina proteina SMN u SMA dovodi do degeneracije motornih neurona te osjetnih neurona. Broj kopija gena *SMN2* glavni je modifikator bolesti SMA budući da veći broj kopija gena *SMN2* rezultira proizvodnjom većih količina funkcionalnog proteina SMN. Najčešći oblik bolesti javlja se kod novorođenčadi, SMA tipa 1, no postoje još četiri tipa ovisno o dobi početka bolesti. Spinraza (Nusinersen) prva je terapija registrirana kao lijek za spinalnu mišićnu atrofiju. Nusinersen je *antisense* oligonukleotid koji je komplementaran intronskom utišivaču prekrajanja N1 (engl. *intronic splicing silencer N1, ISS-N1*) u *SMN2* pre-mRNA. Slijed ISS-N1 nalazi se na intronu nizvodno od eksona 7 i omogućuje izrezivanje eksona 7 iz primarnog transkripta *SMN2* uz pomoć heterogenog nuklearnog ribonukleoproteina (engl. *heterogenous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP*). Nusinersen se veže na ISS-N1 na *SMN2* pre-mRNA pri čemu istiskuje hnRNP što omogućava retenciju eksona 7 i proizvodnju većih količina funkcionalnog SMN proteina.¹⁸ Lijek se primjenjuje izravno u središnji živčani sustav pomoću injekcije. Djelovanje Nusinersena prikazano je na slici 13.

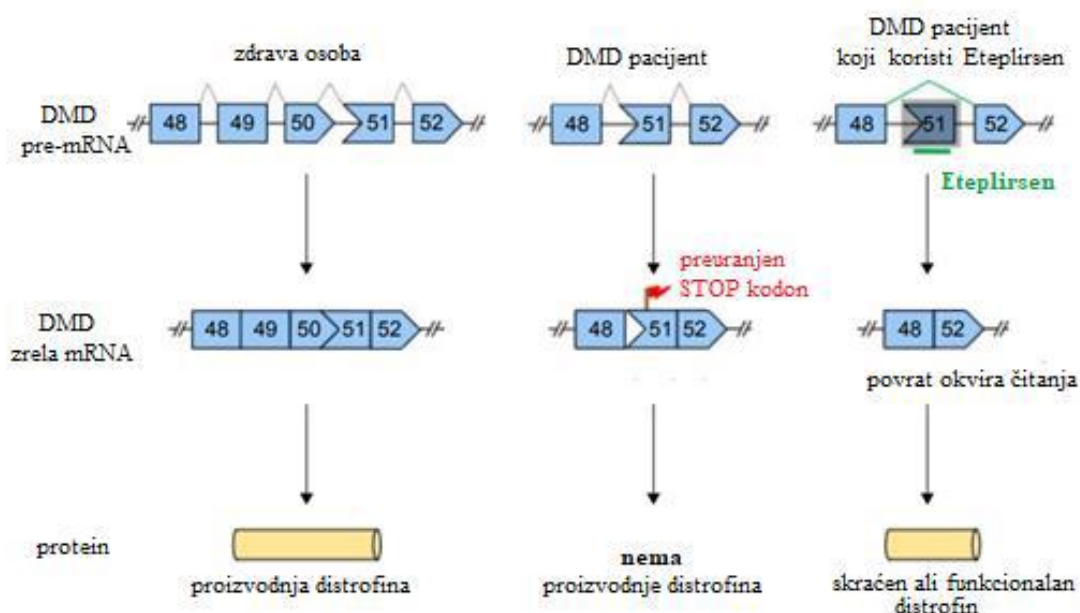


Slika 13. Mehanizam djelovanja *antisense* oligonukleotida Nusinersen u liječenju spinalne mišićne atrofije - preuzeto i prilagođeno prema ¹⁷

Nusinersen je primjer *antisense* oligonukleotida koji djeluje na proces prekrajanja. Osmišljeni su i drugi *antisense* oligonukleotidi koji moduliraju prekrajanje pre-mRNA. Neki od tih oligonukleotida blokiraju RNA sljedove bitne za spajanje eksona te sprečavaju interakciju faktora prekrajanja kao što su proteini koji vežu RNA, snRNA te ostali dijelovi spliceosoma.

Duchenne mišićna distrofija (DMD) ozbiljan je genetski poremećaj koji nastaje zbog mutacije gena koji se nalazi na Xp21 kromosomu te je češći kod muške populacije. Bolest uzrokuje gubitak mišića koji vodi do gubitka pokretljivosti u dobi od 10-12 godina te smrti početkom 20-tih godina kao posljedica zatajenja respiratornog i kardiovaskularnog sustava. Kod DMD-a dolazi do gubitka ekspresije gena za protein distrofin koji je ključan za održavanje mišićnih stanica. Gen za distrofin je najduži gen u ljudskom genomu te sadrži 2,4 milijuna parova baza sa 79 eksona, koji čine zrelu mRNA duljine 14 tisuća parova baza.³ Uslijed odsutnosti distrofina mišićna vlakna se raspadaju brzinom koja nadmašuje mehanizme regeneracije mišića⁹. Kod blažeg oblika bolesti, Beckerove mišićne distrofije (BMD), delecije uglavnom čuvaju okvir čitanja dopuštajući tako proizvodnju djelomično funkcionalnog distrofina. Američka agencija za hranu i lijekove, FDA (engl. *Food and Drug Administration*) je odobrila terapiju injekcijom Eteplirsena. To je *antisense* oligonukleotidna terapija koji cilja

samo određene mutacije te se može koristiti za liječenje 14% slučajeva DMD-a. Kod nekih pacijenata s DMD-om zbog delecije eksona 49 i 50 dolazi do pomaka okvira čitanja te u eksonu 51 nastaje preuranjeni STOP kodon (slika 14.). Stanični mehanizmi prepoznaju preuranjeni STOP kodon u mRNA te je razgrađuju zbog čega ne dolazi do proizvodnje distrofina. Eteplirsen se veže na ekson 51 što dovodi do alternativnog izrezivanja eksona 51 iz primarnog transkripta mRNA (slika 14.). Kod pacijenata tako nastaje zrela mRNA bez eksona 49, 50 i 51, ali s ispravnim okvirom čitanja što omogućuje uspješnu translaciju skraćenog, ali funkcionalnog distrofina. Povećavanjem količine funkcionalnog proteina distrofina cilj je usporiti ili spriječiti napredovanje DMD-a. Ako bi se Eteplirsen dao zdravoj osobi to bi rezultiralo proizvodnjom distrofinске mRNA (bez eksona 51) koja ne bi kodirala funkcionalni distrofin.



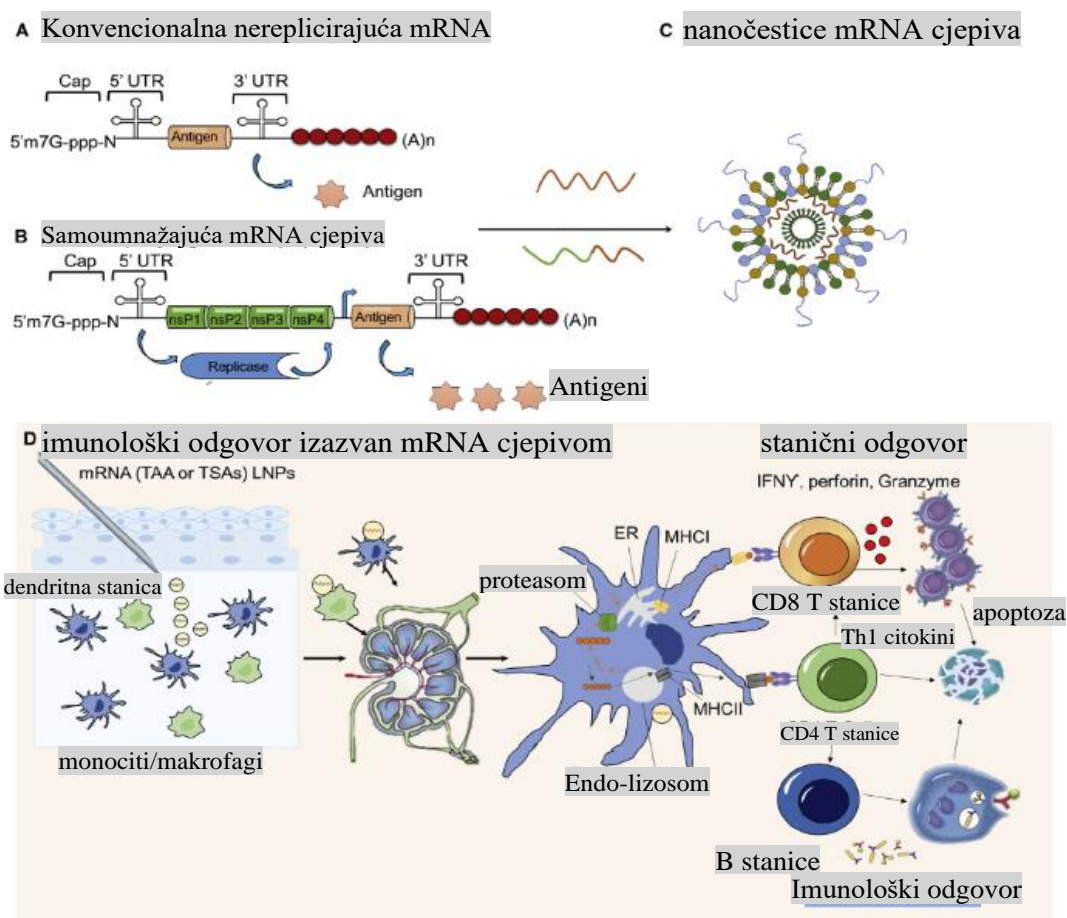
Slika 14. Mehanizam djelovanja Eteplirsena-preuzeto iz ³

Razvojem *antisense* oligonukleotida, razvijeni su i oligonukleotidi koji ne induciraju cijepanje mRNA posredovano RNAzom H već djeluju steričkim blokiranjem ciljne RNA. Svojstveno ovom mehanizmu djelovanja je aktivnost ASO u citoplazmi gdje dolazi do translacije. Većina oligonukleotida koji sterički blokiraju translaciju vežu se na komplementarnu mRNA u blizini START kodona.

2.3. mRNA cjepiva

I molekula mRNA koja kodira protein može se koristiti kao terapeutik. Primjer su mRNA cjepiva. Cjepiva na bazi mRNA podskupina su cjepiva koja se temelje na nukleinskim kiselinama¹⁹ (engl. *nucleic acid vaccines*). Početak razvoja mRNA cjepiva započinje 1990-ih kada su Wolf i kolege demonstrirali injekciju plazmidne DNA (pDNA) ili mRNA što je rezultiralo proizvodnjom bjelančevina u miocitima. Ekspresija antigena prilikom cijepjenja s mRNA je privremena, čime se sprječava iscrpljenost T stanica koja se može dogoditi dugotrajnim izlaganjem antigenu.¹⁹ Učinkovitost mRNA će vjerojatno biti veća u odnosu na plazmidnu DNA, budući da RNA funkcionira u citoplazmi i nije potrebno da uđe u jezgru ciljnih stanica. Probst i suradnici su pokazali da nakon injekcije miševa s golom mRNA koja kodira β -galaktozidazu, stanice koje preuzimaju golu mRNA su mišićne stanice, fibroblasti ili keratinociti. Potom 1992. godine, Jirikowski i suradnici utvrdili su da je unos mRNA, koje kodiraju oksitocin i vazopresin, u miševе koji boluju od dijabetesa insipidusa (dijabetes insipidus nastaje kao posljedica smanjenog stvaranja antidiuretskog hormona vazopresina), kod miševa privremeno poništilo ovaj dijabetes¹⁹ par sati nakon injekcije.

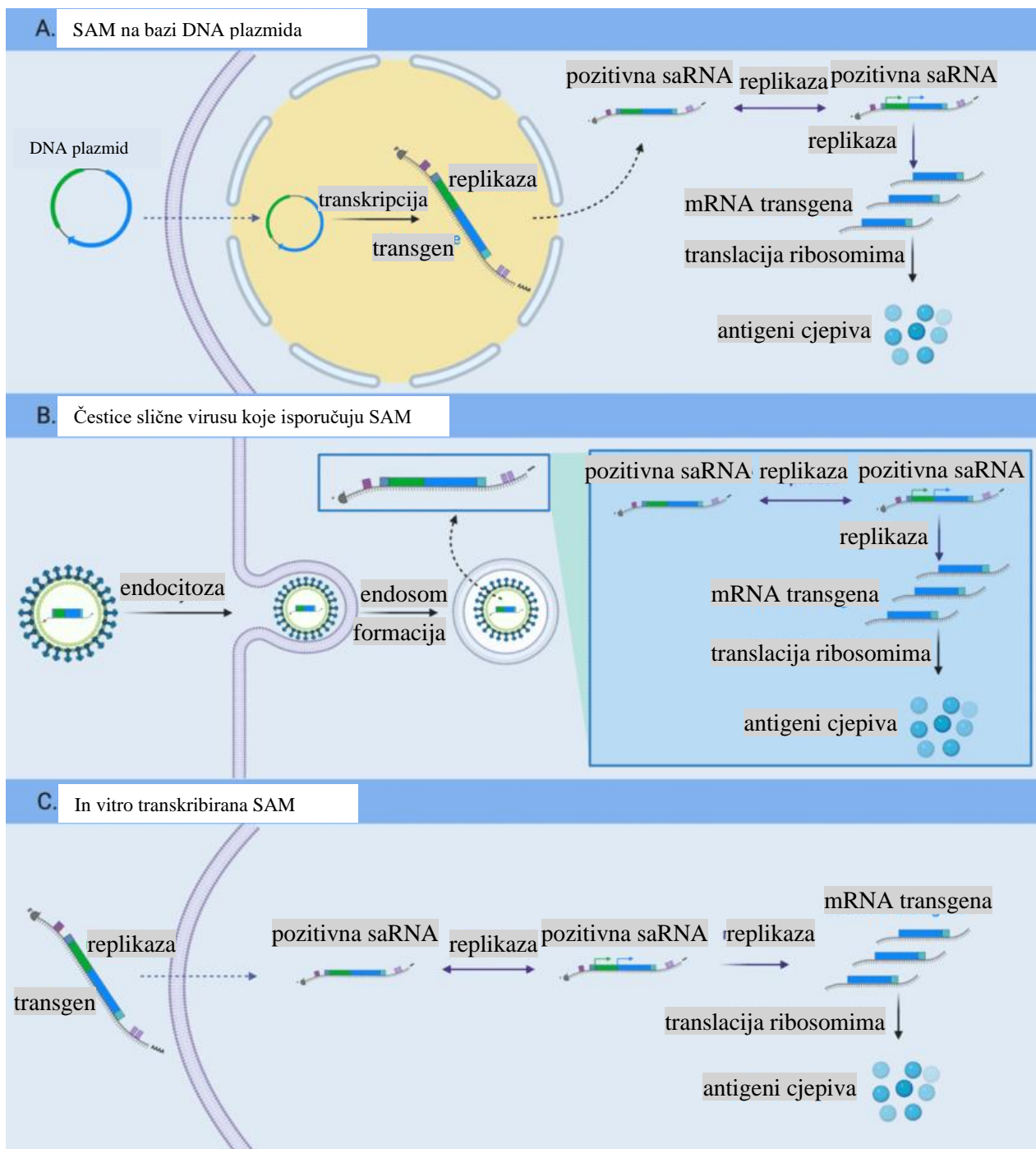
Nestabilnost mRNA, prekomjerna imunogenost i nedostatak učinkovitog sustava za isporuku mRNA¹⁹ samo su neki od izazova s kojima su se susretali u istraživanjima mRNA cjepiva. No, unaprjeđenjem eksperimentalnih tehnika postignut je napredak u sigurnosti, učinkovitosti i industrijskoj proizvodnji mRNA cjepiva čime je omogućena primjena mRNA cjepiva u liječenju tumora i virusnih bolesti. Razvoj učinkovitog i sigurnog sustava dostave modificiranom mRNA može povećati učinkovitost i ukloniti nuspojave mRNA cjepiva.¹⁹ Zbog potrebe za brzim razvojem i industrijskom proizvodnjom mRNA cjepiva tijekom pandemije COVID-19, istraženi su novi oblici vektora isporuke (engl. *delivery vectors*) te modificiranih mRNA. RNA cjepiva možemo podijeliti u dvije skupine: konvencionalna nereplicirajuća cjepiva na bazi mRNA te samoumnažajuća mRNA cjepiva (engl. *selfamplifying mRNA vaccines, SAM*) kao što je prikazano na slici 15.



Slika 15. Struktura konvencionalnih nereklicirajućih i samoumnažajućih cjevica te prikaz imunološkog odgovora nakon primitka LNP mRNA cjevica- preuzeto i prilagođeno prema²⁰

Konvencionalna nereklicirajuća cjevica slična su mRNA molekuli stanice domaćina te kodiraju samo određeni antigen te sadrže 5'- i 3'-UTR regije, otvoreni okvir za čitanje (engl. *open reading frame, ORF*) te poli-A-rep, dok SAM cjevica potječe od genoma alfavirusa te sadrži jedan gen odgovoran za replikaciju virusne RNA, a drugi transgen koji kodira terapijski antigen. Za stabilnost mRNA te učinkovitost translacije kod konvencionalnih cjevica presudni su 5'- i 3'-UTR regije te poli-A-rep. RNA cjevica koriste glasničku RNA za stvaranje imunološkog odgovora. Nakon što mRNA prijeđe u citosol, stanica proizvodi protein koji prolazi kroz posttranslacijske modifikacije te kao rezultat nastaje pravilno savijeni, u potpunosti funkcionalni protein. Imunosni sustav sadrži receptore za prepoznavanje obrazaca (engl. *pattern-recognition receptor, PRPP*) koji detektiraju molekulske obrasce povezane s patogenom (engl. *pathogen-associated molecular patterns, PAMPs*) pri čemu nastaje upalni odgovor, veza između urođenog i stečenog (adaptivnog) imuniteta. Konvencionalna cjevica ne

aktiviraju PRPP-ove, stoga im je potrebno dodati određena pomoćna sredstva za poticanje urođene imunosti, dok s druge strane, RNA može izravno aktivirati PRPP-ove. Kod samoumnažajućih RNA cjepiva nailazimo na različite metode ekspresije antigena kao što je prikazano na slici 16.

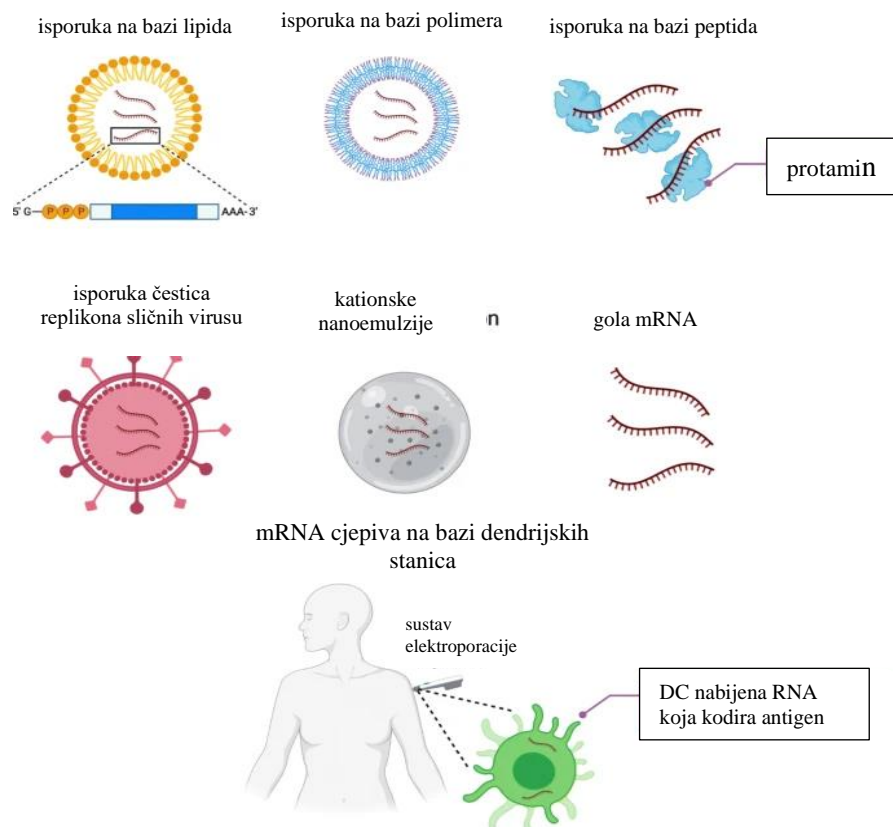


Slika 16. Različite metode ekspresije mRNA koja kodira antigen – preuzeto i prilagođeno prema ¹⁹

Samoumnažajuća RNA temeljena na DNA plazmidu koristi plazmidnu DNA kao nosač za prijenos replikaznih gena (engl. *replicase genes*) te transgena u jezgru. Po završetku transkripcije u jezgri, dolazi do translokacije u citosol zbog samoreplikacije RNA, proizvodnje mRNA i translacije antigena. Stabilnost DNA plazmida s višom razinom ekspresije gena zaslužna je za indukciju snažnijeg imunološkog odgovora te za jednostavniju proizvodnju SAM. Idući, klinički dokazano siguran i učinkovit postupak, obuhvaća čestice nalik virusu koje pakiraju SAM te dostavljaju replikon RNA u citosol pomoću endocitoze posredovane receptorom. Postupci samoreplikacije RNA za stvaranje antigena identični su onima kod SAM na bazi DNA plazmida. *In vitro* transkribirane SAM isporučuju se u fiziološkoj otopini ili sintetičkim formulacijama.¹⁹ Za induciranje zaštitnog imuniteta Beissert i suradnici razvili su takozvanu trans-umnažajuću RNA (engl. *trans-amplifying RNA, taRNA*). Mehanizam započinje replikazom koja transkribira negativni lanac RNA (engl. *negative strand RNA*) koji koristi kao predložak za transkripciju pozitivnog lanca RNA. Nova taRNA ističe se sigurnošću, jednostavnošću optimizacije koja se može postići nukleozidnim modifikacijama, optimizacijom kodona te stabilizirajućim sekvencama¹⁹ te proizvodljivošću budući da taRNA skraćuje duljinu RNA. Najveći problem sinteze mRNA transkripcijom *in vitro* (engl. *in vitro transcription, IVT*) je imunogenost tako dobivene mRNA. Budući da IVT mRNA može aktivirati imunološke stanice te dovesti do upale posredovanu receptorima za čije aktiviranje je ključni element sekvenca mRNA bogata U nukleotidima, Thess i suradnici utvrdili su da je rješenje skraćivanje U-bogate sekvence mRNA za izbjegavanje imunogenosti mRNA¹⁹. Skraćivanje U-sekvence može se postići dodatkom poli(A) repova koji su neophodni za stabilnost mRNA. Postoje i druge metode kojima se može smanjiti imunogenost mRNA: kemijskom modifikacijom nukleotida koja ne utječe na translaciju mRNA te optimizacijom mRNA sa sekvencom bogatom G i C nukleotidima. Za uklanjanje imunogenosti neophodno je pročišćavanje mRNA koje uključuje razne kromatografske metode.

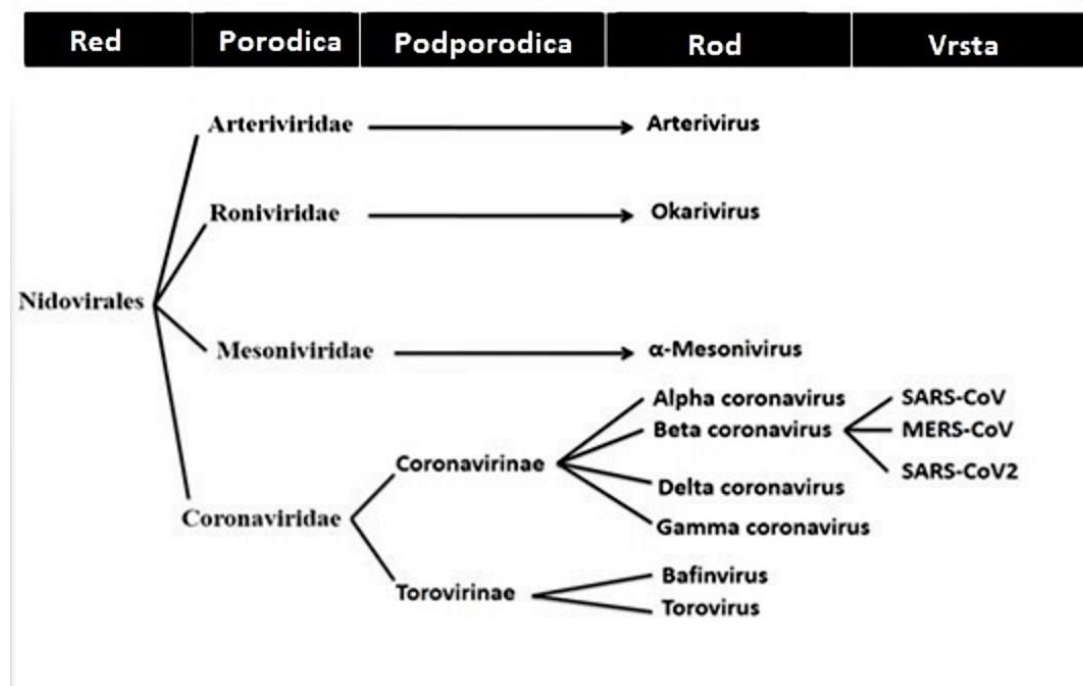
Budući da je gola mRNA nestabilna, i za unos mRNA u stanice potreban je prenositelj, razvijene su razne strategije isporuke mRNA cjepiva kao što je prikazano na slici 17. Neki od načina isporuke mRNA cjepiva su isporuka na bazi lipida, peptida, polimera, isporuka čestica replikona sličnih virusu (engl. *virus-like replicon particle delivery*), isporuka kationskom nanoemulzijom (engl. *cationic nanoemulsion, CNE*) koja potencira mRNA cjepiva vezanjem na SAM te isporuka na bazi dendritnih stanica (engl. *dendritic cell-based delivery*). Prilikom prvog kliničkog ispitivanja mRNA cjepiva kao nosač korištene su nanočestice lipida (engl. *lipid*

nanoparticles, LNPs). Nanočestice lipida su vezikule izgrađene od ionizirajućih lipida koji interakcijom s endosomskom membranom olakšavaju isporuku mRNA iz endosoma u citoplazmu kako bi sintetizirali antigene cjepiva. Neke od prednosti LNP-a su što štite mRNA od razgradnje enzimima, dok s druge strane imaju dobru biokompatibilnost kroz niz bioloških procesa za isporuku mRNA za ekspresiju¹⁹. Kao najučinkovitiji način lokalne dostave, ispostavila se intravenska primjena mRNA antigen cjepiva. Tako intravenski primijenjene nanočestice lipida mogu djelovati na dendritne stanice (engl. *dendritic cells, DCs*) te aktivirati antigen-specifične T stanice¹⁹. S druge strane, manje je klinički istražena isporuka na bazi polimera koji štite mRNA od razgradnje. Postoje dvije vrste polimera, dominantniji kationski polimeri te anionski polimeri primjerice poli D, L-laktin-ko-glikolid. Prilikom isporuke na bazi peptida, kationski peptidi zbog svoje pozitivne amino skupine mogu interagirati s negativno nabijenom mRNA. Jedan od primjera takvog kationskog peptida je protamin. Uz mRNA cjepiva na bazi nosača, mRNA se može isporučiti i kao gola mRNA. Gola mRNA ne može slobodno prolaziti kroz membranu, no neki istraživači vjeruju da uzimanje gole mRNA omogućuje ekspresiju mRNA koja kodira antigen, a najčešće korištene su Ringerova otopina te Ringerova otopina s laktatom.



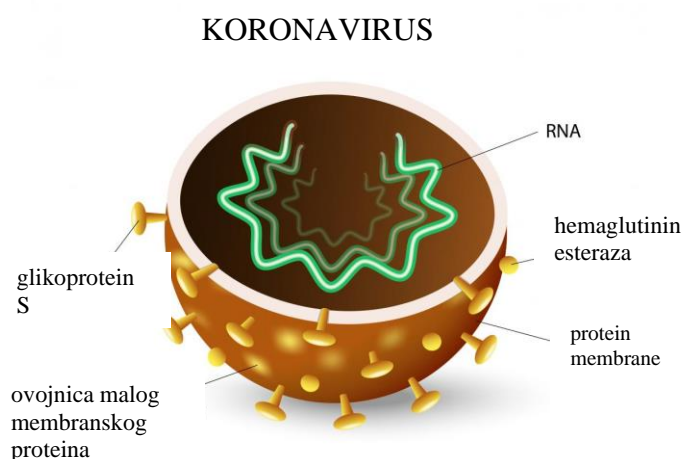
Slika 17. Strategije isporuke mRNA cjepiva (kratica DC (*engl. dendritic cell*)-dendritna stanica) – preuzeto i prilagođeno prema¹⁹

Koronavirus 2 koji uzrokuje teški akutni respiratorni sindrom (*engl. severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV2*) uzrok je koronavirusne bolesti COVID-19 koja se prvi puta pojavljuje krajem 2019. godine u Wuhanu u Kini. Koronavirusi (CoVs), iz obitelji Coronaviridae (prikazano na slici 18.) sadrže ovojniju i jednolančanu molekulu RNA koja nosi genetsku informaciju²¹.



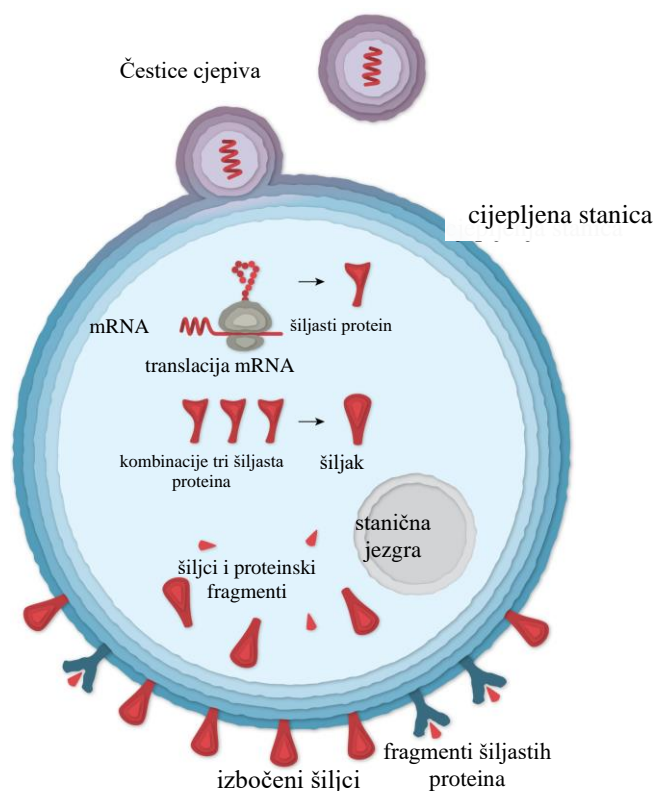
Slika 18. Klasifikacija koronavirusa: Red *Nidovirales*, porodica i podporodica *Coronaviridae*, rod *Beta coronavirus*, vrsta SARS-CoV2 - preuzeto i prilagođeno prema²¹

Virus SARS-CoV2 sadrži najveći genom u klasi RNA virusa. Virusna ovojnica SARS-CoV2 sastoji se od lipidnog dvosloja sastavljenog od glikoproteina S (engl. *spike protein*), proteina ovojnice (engl. *envelope protein, E*), proteina membrane (engl. *membrane protein, M*) koji definira oblik virusne ovojnice te hemaglutinin-esteraze (prikazano na slici 19.).



Slika 19. Virusna ovojnica koronavirusa- preuzeto i prilagođeno prema²²

U doba pandemije, farmaceutske industrije u kratkom vremenskom periodu trebale su razviti učinkovito cjepivo protiv bolesti COVID-19. Kao jedan od uspješnih kandidata u borbi sa SARS-CoV2 pokazala su se mRNA cjepiva u usporedbi s drugim cjepivima (inaktiviranim cjepivima, DNA cjepivima, cjepivima povezanim s pasivnom imunizacijom...). Za razliku od DNA cjepiva, cijepljenjem molekule mRNA ne ulaze u jezgru.¹⁹ Cjepiva na bazi mRNA ne sadrže oslabljene viruse, već sadrže glasničku mRNA s informacijama o načinu stvaranja proteina šiljastih izdanaka koronavirusa, odgovornih za stvaranje bolesti. Jednom kada osoba primi cjepivo, oslobađa se mRNA koja daje uputu za stvaranje proteina šiljastih izdanaka (prikazano na slici 20.), a imunostni sustav prepoznaje te proteine što dovodi do stvaranja antitijela. Trenutno odobrena mRNA cjepiva u suzbijanju pandemije koronavirusom su cjepiva proizvođača BioNTech i Pfizer te Moderne.



Slika 20. Prikaz stanice nakon primljenog mRNA cjepiva – preuzeto i prilagođeno prema²³

2.4. Zaključak

Kao učinkoviti lijekovi u liječenju raznih bolesti pokazali su se oligonukleotidi koji se vežu na pre-mRNA ili mRNA, važne molekule u prijenosu genetičke informacije s gena na proteine. U

ovome radu opisani su primjeri odobrenih lijekova koji koriste terapijsku tehnologiju temeljenu na RNA. Neki od lijekova su Miravirsen korišten za liječenje infekcije hepatitisom C, Mipomersen za liječenje homozigotne obiteljske hiperkolesterolemije, Nusinersen za liječenje spinalne mišićne atrofije te Eteplirsen za liječenje Duchenne mišićne distrofije. Dolazi do eksplozije novih saznanja o mehanizmima djelovanja oligonukleotida i uz veće razumijevanje regulacijskih uloga RNA, otkrivaju se mnogi procesi i mehanizmi koji bi se mogli iskoristiti u terapijske svrhe.⁷ U vrijeme pandemije koronavirusom SARS-CoV2, razvijaju se mRNA cjepiva kao alternativa klasičnim cjepivima. Ova cjepiva ne sadrže informaciju o cjelokupnom virusu već samo o jednom njegovom dijelu. Glavna prednost mRNA cjepiva je što nema direktnog doticaja s virusom te kod mRNA cjepiva proteini se ne moraju pročišćavati kao kod klasičnih cjepiva budući da naš organizam sam proizvodi te proteine. No, kao jedan od nedostataka mRNA cjepiva je nestabilnost molekule RNA, stoga se cjepiva moraju čuvati na niskoj temperaturi (-20°C). Terapijski pristupi temeljeni na molekuli RNA pokazuju velika obećanja u liječenju karcinoma, virusnih bolesti te genetskih poremećaja.

§ 3. LITERATURNI IZVORI

¹ R. K. Murray, David A. Bender, K. M. Botham, P. J. Kennelly, V. W. Rodwell and P. Anthony Weil, *Harperova ilustrirana kemija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2011, str. 290-365.

² D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger – Principles of Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, 2013, str. 273.-302.

³ T. Divjak, Ksenonukleinske kiseline, Završni rad, Kemijski odsjek, PMF, Sveučilište u zagrebu, 2020, str. 5., 22-27.

⁴ D.Pali, *Alternativno prekrajanje gena BPM1, BPM2 i BPM3 u uvjetima temperaturnog stresa*, Diplomski rad, Biološki odjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2020. str. 12.

⁵ B. Pavletić, *Evolucija alternativnog prekrajanja RNA*, Završni rad, Biološki odsjek, PMF, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 9.

⁶ M. Mustac, *RNA interferencija u genskoj terapiji*, Završni rad, Josip Juraj Strossmayer u Osijeku, Odjel za biologiju, 2018, str. 1-5.

⁷ A. Aartsma-Rus, A. L. Jackon, A. A. Levin, *Mechanisms of Oligonucleotide Actions*, u N. Ferrari, R. Seguin (ur.), *Oligonucleotide-Based Drugs and Therapeutic*, Vol. 1, Jonh Wiley & Sons, New York, 2018, str. 1-13.

⁸ M. Matokanovic i K. Barišić, *RNA Interference as a New Tool in Therapeutics*, Food Technol. Biotechnol. (2009), 229-235.

⁹ R. Kole, A. R. Krainer, S. Altman, *RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides*, Vol 11, Nat. Rev. Drug Discovery. (2012) 125–140.

¹⁰ R. Tinze de Almeida, C. David, S. S. Tinze de Almeida, *The Race of 10 Synthetic RNAi-Based Drugs to the Pharmaceutical Market*, Pharm. Res. **34** (2017) 1339–1363.

¹¹ M. H. van der Ree, A. J. van der Meer, A. C. van Nuenen, J. de Bruijne, S. Ottosen, H. L. Janssen, N. A. Kootstr and H. W. Reesink, *Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma*, Aliment Pharmacology and Therapeutics, **47** (2016) 102–113.

¹² <https://en.wikipedia.org/wiki/Miravirsen> (pristupljeno 21. lipnja 2021.)

¹³ C.F.Bennett, *Antisense oligonucleotide based drugs: progress and challenges*, Vol. 10, Elsevier, (2013) 105-106.

¹⁴ <https://en.wikipedia.org/wiki/Fomivirsen> (pristupljeno 28. srpnja 2021.)

¹⁵ https://hr.wikipedia.org/wiki/Obiteljska_hiperkolesterolemija (pristupljeno 14. lipnja 2021.)

¹⁶ <https://www.zymoresearch.com/pages/what-is-dna-methylation> (pristupljeno 30. srpnja 2021.)

¹⁷ Claudia A. Chiriboga, *Nusinersen for the treatment of spinal muscular atrophy*, SMA Clinical Research Center, Division of Pediatric Neurology, Department of Neurology, Columbia University, New York, USA, 2017, str. 1

¹⁸ D. Stipić, *Terapija spinalne mišićne atrofije*, Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2018, str. 3.

¹⁹ <https://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-021-01311-z> (pristupljeno 26. lipnja 2021.)

²⁰ P. S. Kowalski, A. Rudra, L. Miao and D.G. Anderson, *Delivering the Messenger: Advances in Technologies for Therapeutic mRNA Delivery*, Vol. 27, Molecular Therapy, USA (2019) 9.

²¹ I. Blažević, *Uloga i struktura glikoproteina S kod virusa SARS-Cov-2*, Završni rad, Odjel za kemiju, PMF, Sveučilište u Splitu, 2020, str. 2.

²² <https://www.zzzdnz.hr/hr/zdravlje/prevencija-zaraznih-bolesti/1369> (pristupljeno 28. lipnja 2021.)

²³ <https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/pfizer-biontech-covid-19-vaccine.html> (pristupljeno 28. lipnja 2021.)