

# Ingeniería Genética II

## Unidad VIII

***RNAs no codificantes***  
***Parte B: Ribozimas***

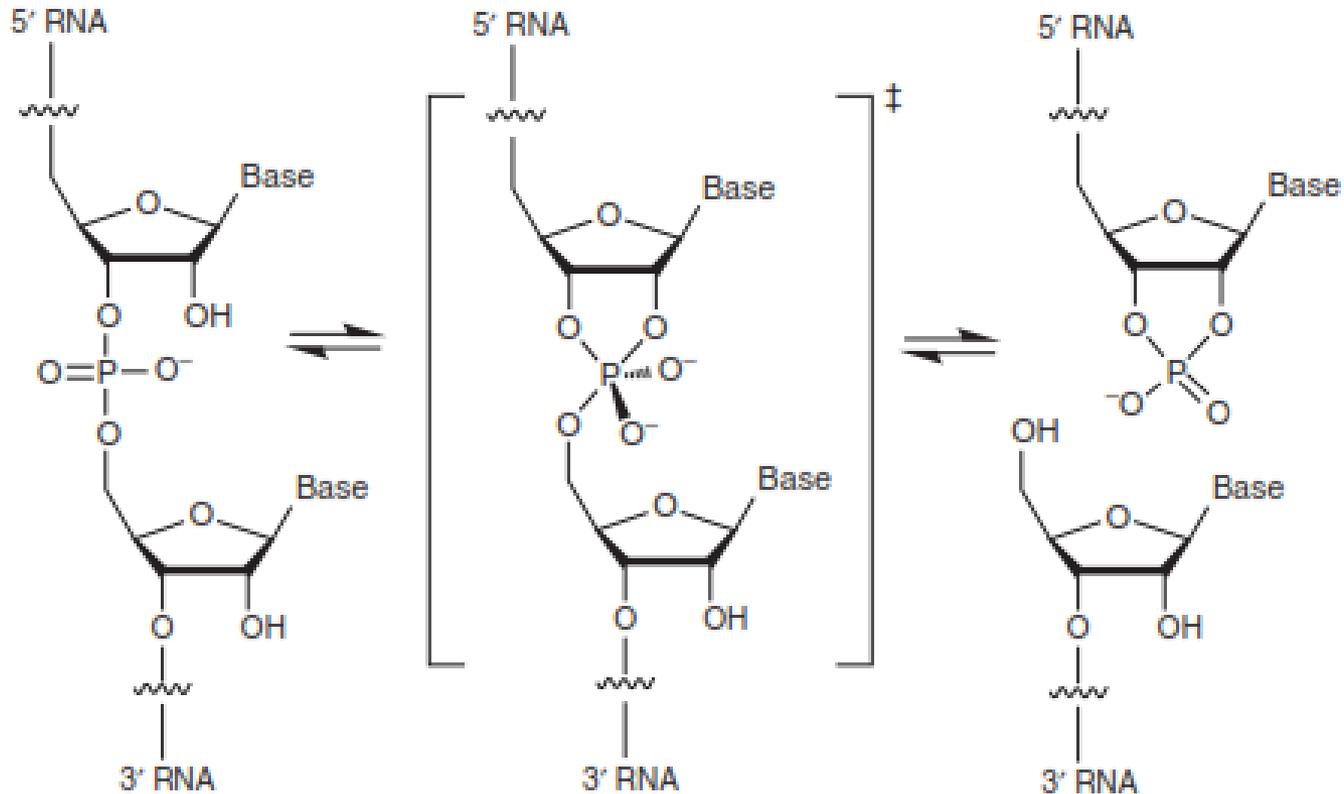
# RNAs no codificantes

## Ribozimas

- Dentro del grupo de los **RNAs no codificantes** se encuentran las **ribozimas**.
- Por definición, son **ácidos ribonucleicos** que actúan como **enzimas**.
- La **principal actividad** catalizada es la **transesterificación e hidrólisis de enlaces fosfodiéster**, de la propia molécula de RNA (acción en ***cis***), o de otras (acción en ***trans***).
- Las **ribozimas** están **dispersas** en **todas las formas de vida**, y su **accionar** puede funcionar **sólo una vez** (acciones en ***cis***), **o repetirse** sobre otros sustratos (acciones en ***trans***) como lo hacen las enzimas proteicas.

# RNAs no codificantes

## Ribozimas

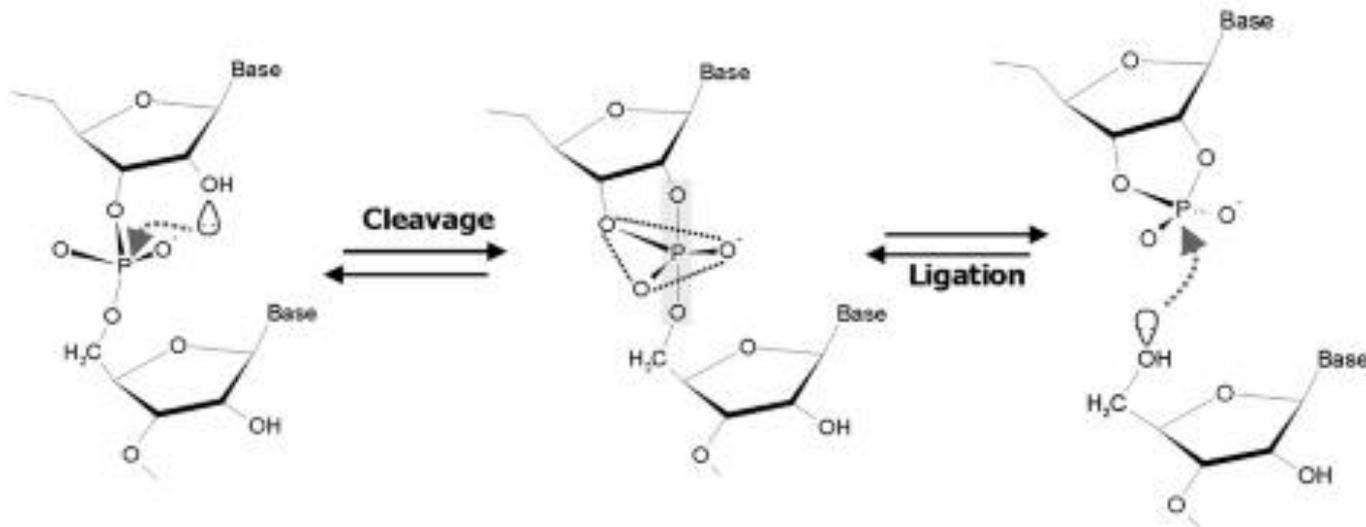


Reacción de transesterificación

# RNAs no codificantes

## Ribozimas

- **Reacción de clivaje y formación de enlace fosfodiéster**



Para la catálisis de estas actividades en general requieren de Mg<sup>2+</sup> y de un plegamiento adecuado. Algunas también requieren cofactores.

# RNAs no codificantes

## Ribozimas

- El concepto de **ribozimas** se debe a los **científicos Altman y Cech**, quienes en simultáneo postularon que ciertos RNAs podían actuar como enzimas.
- Gracias a estos estudios iniciales, ambos investigadores obtuvieron el **Premio Nobel de Química** en 1989.



*Sid Altman*

*Estudios sobre  
RNAsa P  
(1983)*



*Tom Cech*

*Estudios  
sobre intrones  
de Grupo I  
(1982)*

# RNAs no codificantes

## Ribozimas

### Ribozimas descritas



#### Ribozimas grandes (> 200 nt)

- *Intrones de Grupo I*
- *Intrones de Grupo II*
- *Ribosomas*
- *RNAsa P*

#### Ribozimas pequeñas (< 200 nt)

- *Hammerhead*
- *Virus Hepatitis Delta (HDV)*
- *Varkud satellite (VS)*
- *glucosamine-6-phosphate-responsive (glmS) ribozymes*
- *Hairpin.*

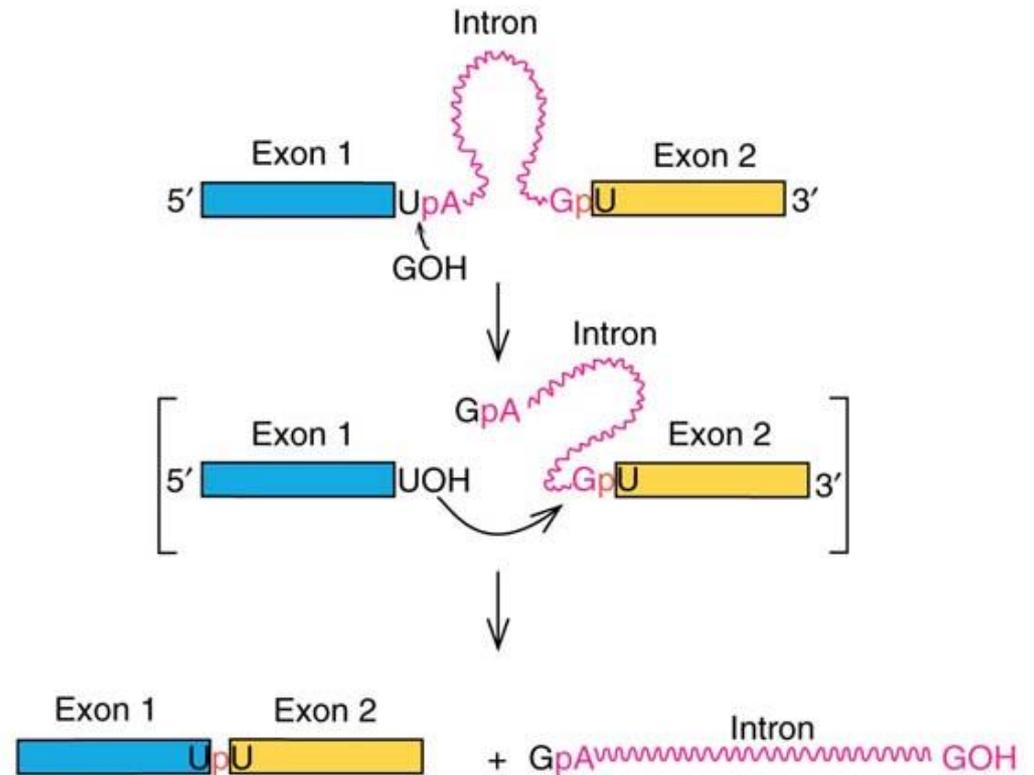
# **Algunas características de las ribozimas grandes**

# RNAs no codificantes

## Ribozimas grandes

### Intrones de Grupo I

Encontrados en protozoos, algunas mitocondrias, virus y bacterias.

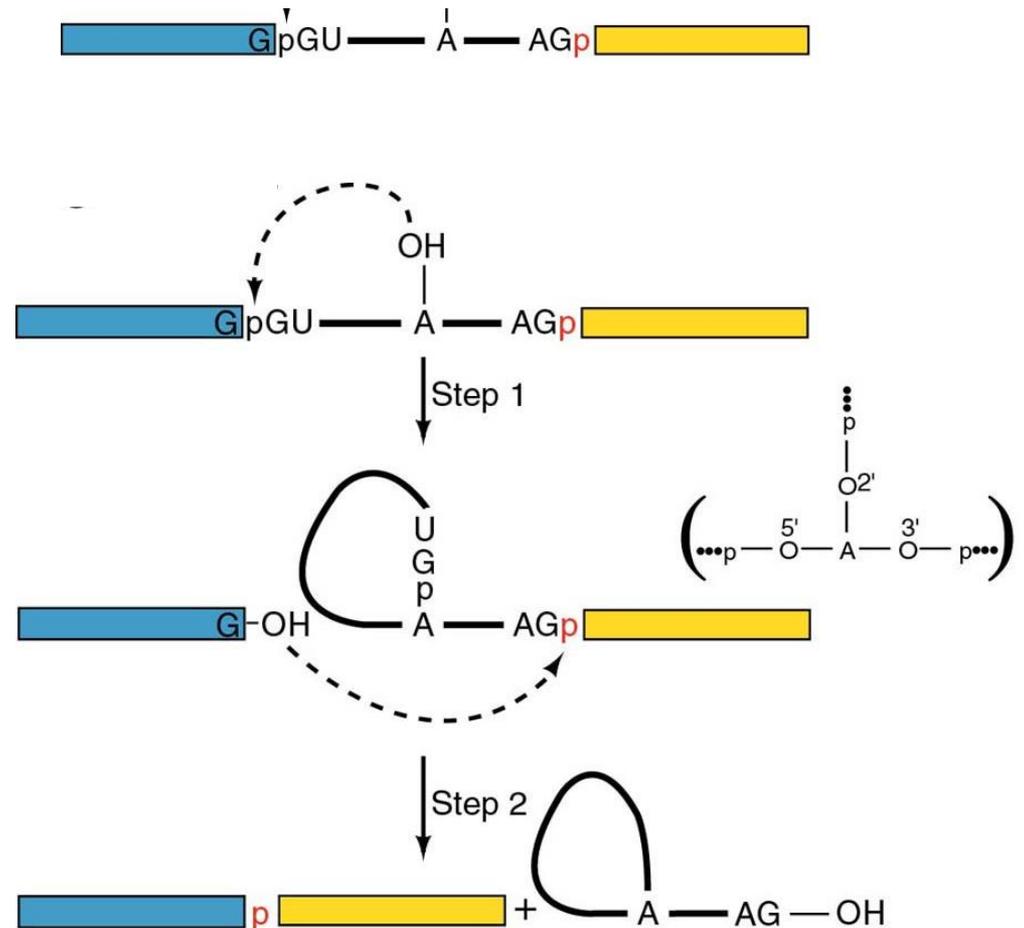


# RNAs no codificantes

## Ribozimas grandes

### Intrones de Grupo II

Encontrados en algunas mitocondrias y otros plástidos.

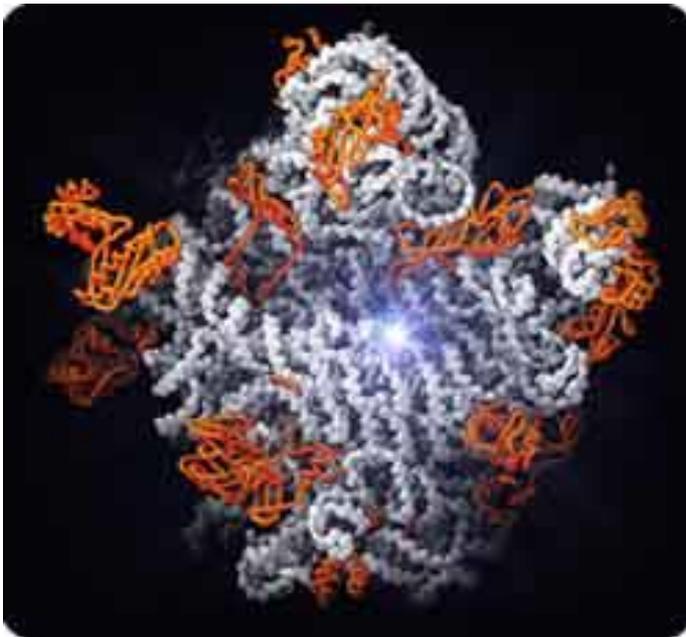


# RNAs no codificantes

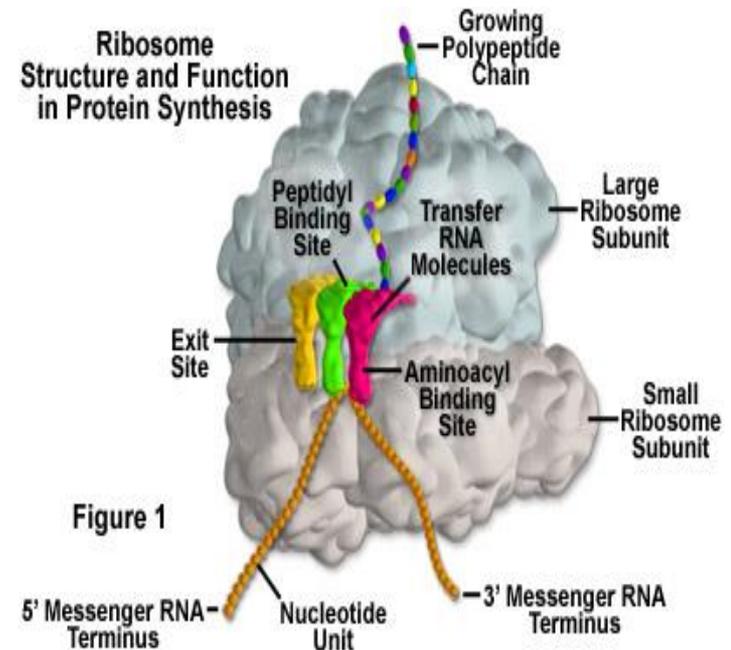
## Ribozimas grandes

### Ribosomas

El sitio activo de los ribosomas está conformado por RNA



Naranja: polipéptidos; Blanco: RNA

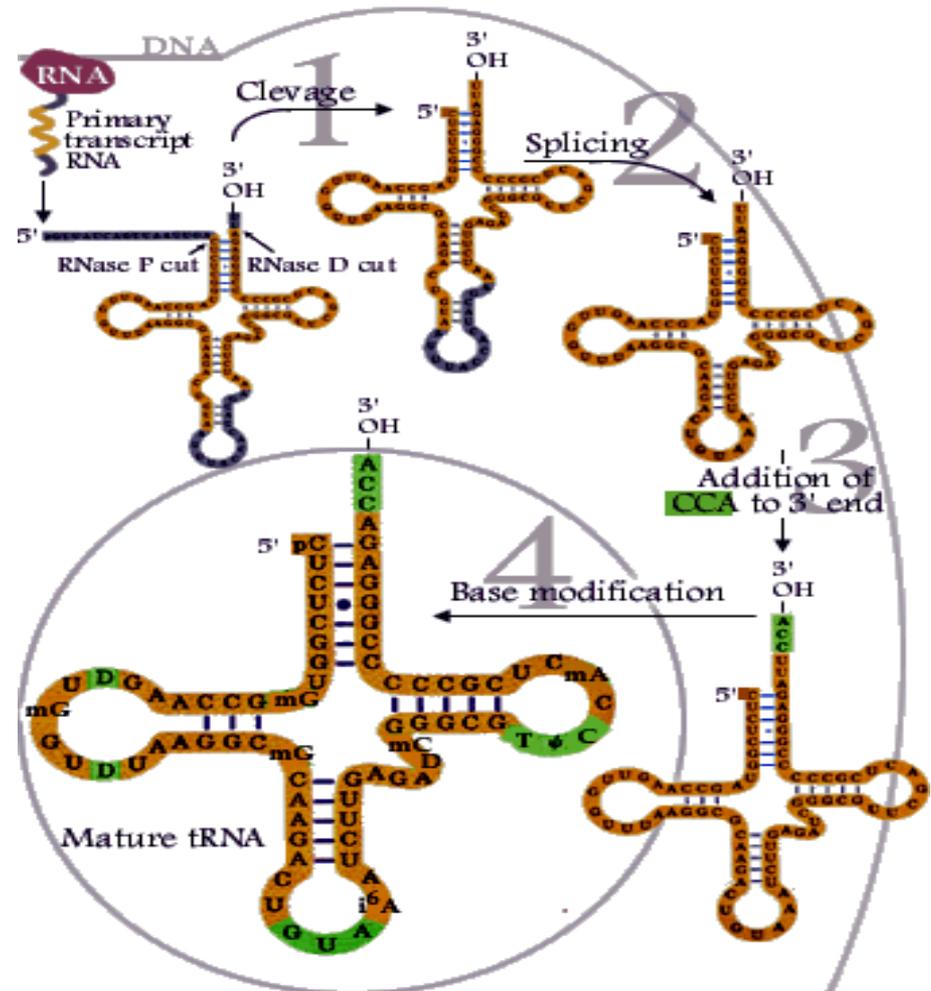


# RNAs no codificantes

## Ribozimas grandes

### RNAsa P

- La RNAsa P es un **complejo riboproteico** cuyo núcleo activo está conformado por RNA.
- Cataliza la **maduración** de los tRNAs.



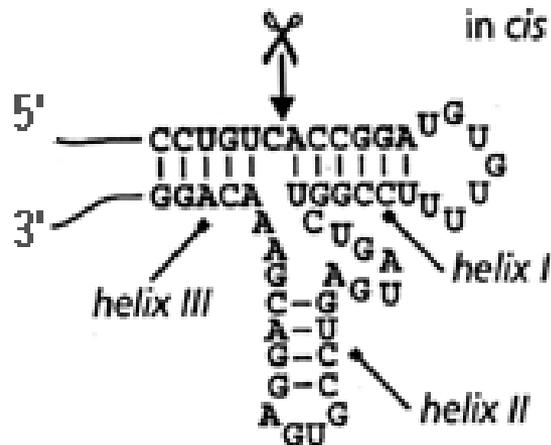
# **Algunas características de las ribozimas pequeñas**

# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Hammerhead

*hammerhead ribozyme*



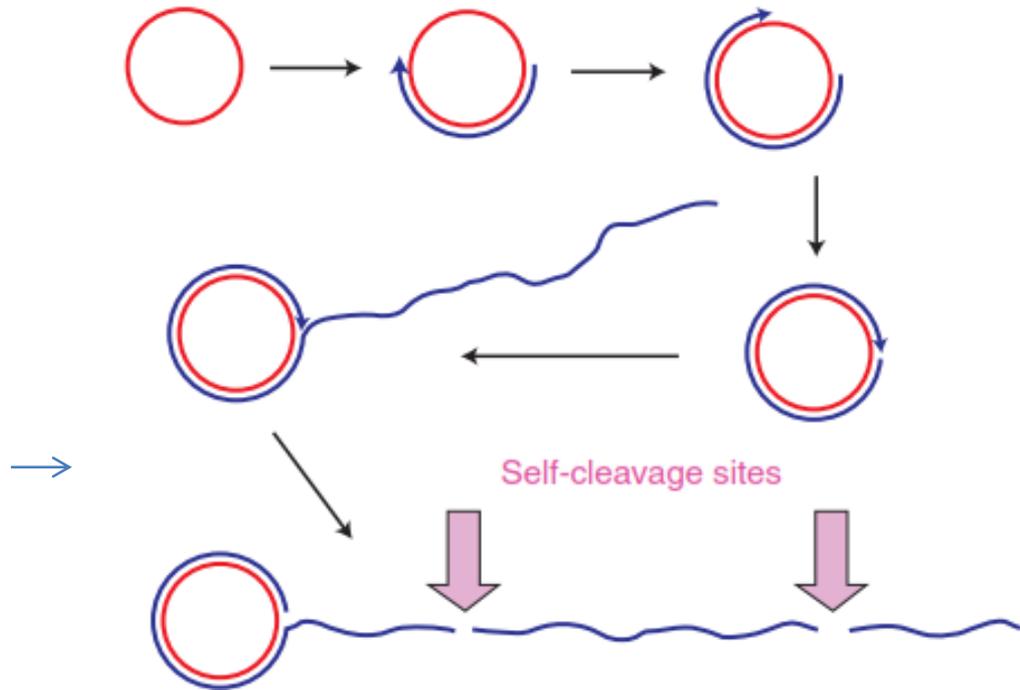
- Reciben este **nombre** por la peculiar **estructura** que poseen, similar a la cabeza de un martillo.
- Forman **tres stem** o hélices y un **loop**.
- Poseen entre **50 y 150 nt**.
- Se las ha detectado en **viroides** y **virus satélites** de plantas, **genomas eucariotas** e incluso algunas **bacterias**.
- **Actúan** en **cis**, generalmente resolviendo concatémeros de RNA.

# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Hammerhead

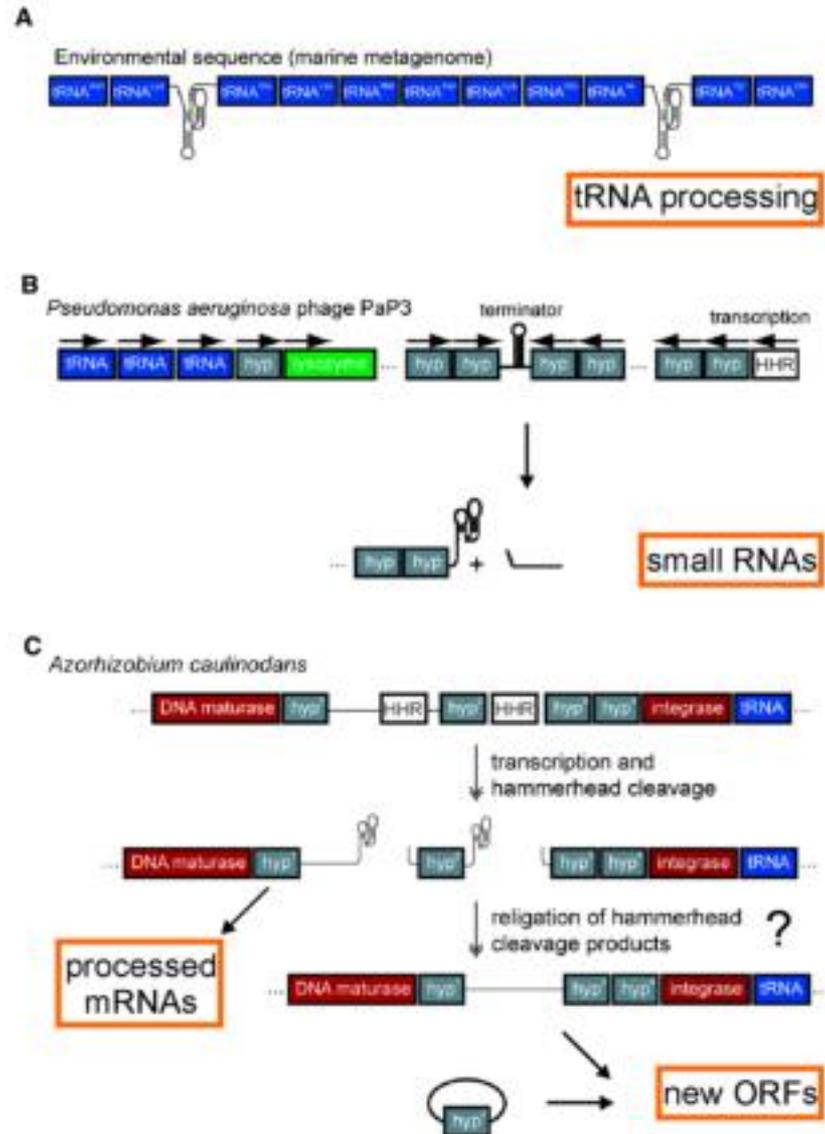
Funciones biológicas en  
viroides y virus satélites



# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Hammerhead



Posibles funciones biológicas celulares →

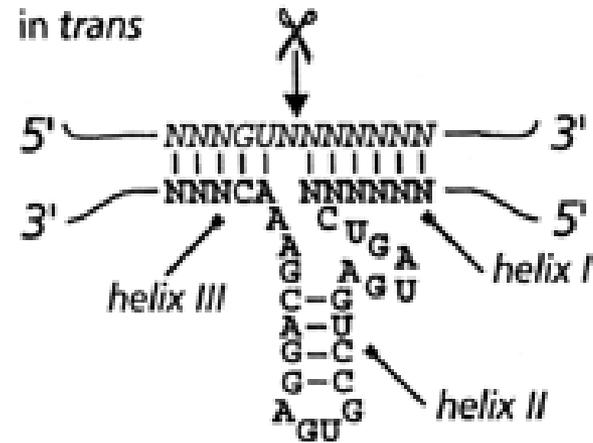
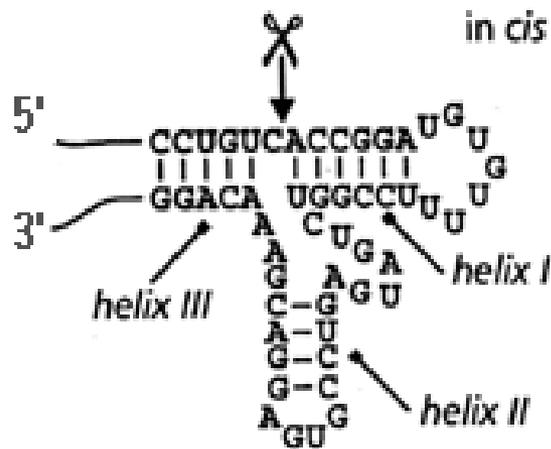
# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Hammerhead

Aplicación biotecnológica

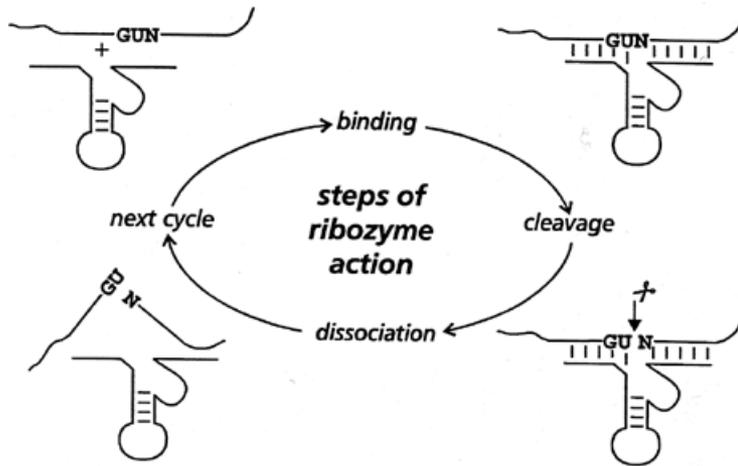
*hammerhead ribozyme*



# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Hammerhead

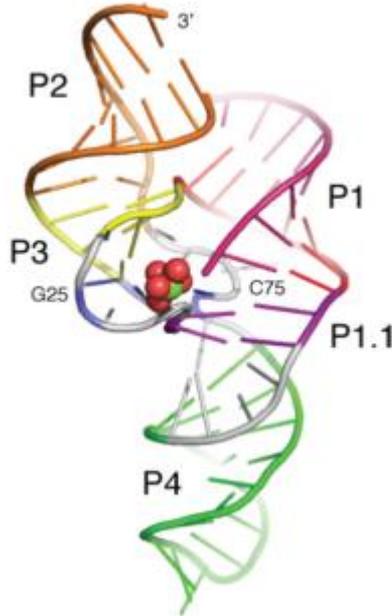


- Las **ribozimas *hammerhead*** se aplican como mecanismo de **silenciamiento** para **transcriptos** y **genomas virales**.
- Esto es así dado que catalizan la **hidrólisis específica** de los RNA diana seleccionados.
- Su **aplicación** es **similar** a la utilización de **siRNA** o **shRNAs**

# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Virus de la Hepatitis Delta



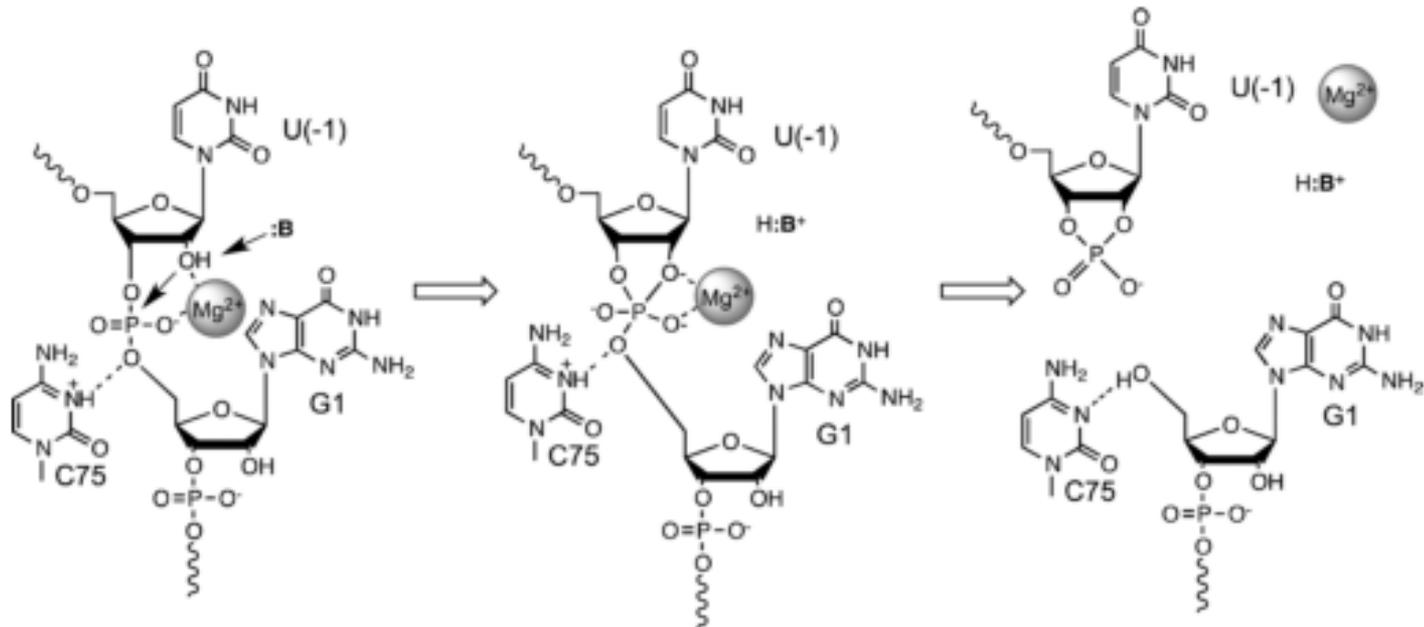
- Es una **ribozima** de un **virus humano** (Hepatitis Delta).
- Posee **85 nt** y participa en la **resolución del concatémero** genómico de RNA.
- Como el genoma es de dsRNA, existe una **ribozima para cada hebra**.
- Se han detectado **ribozimas similares** en **muchos organismos**, dado que están contenidas en transposones.
- **Funciona** en **cis**, pero puede ser **manipulada** para hacerlo en **trans**.

# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Virus de la  
Hepatitis Delta

Mecanismo de acción

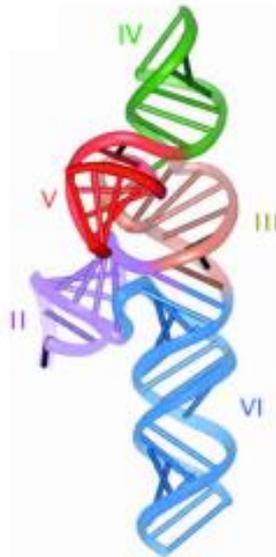
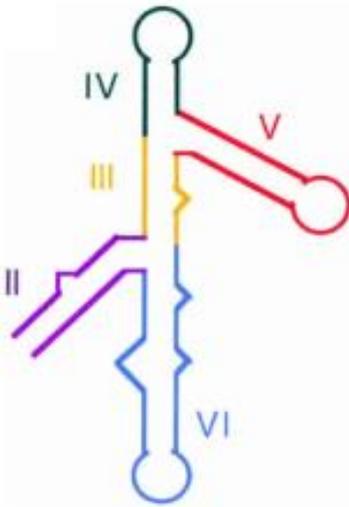


# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Varkud Satellite

- Es un **transcripto** muy **abundante** encontrado en las **mitocondrias** de *Neurospora*.
- Posee **150 nt** y es considerado un **retroplásmido** mitocondrial.
- Su **actividad** es **resolver** los **intermediarios** de **replicación** del **RNA satélite**.

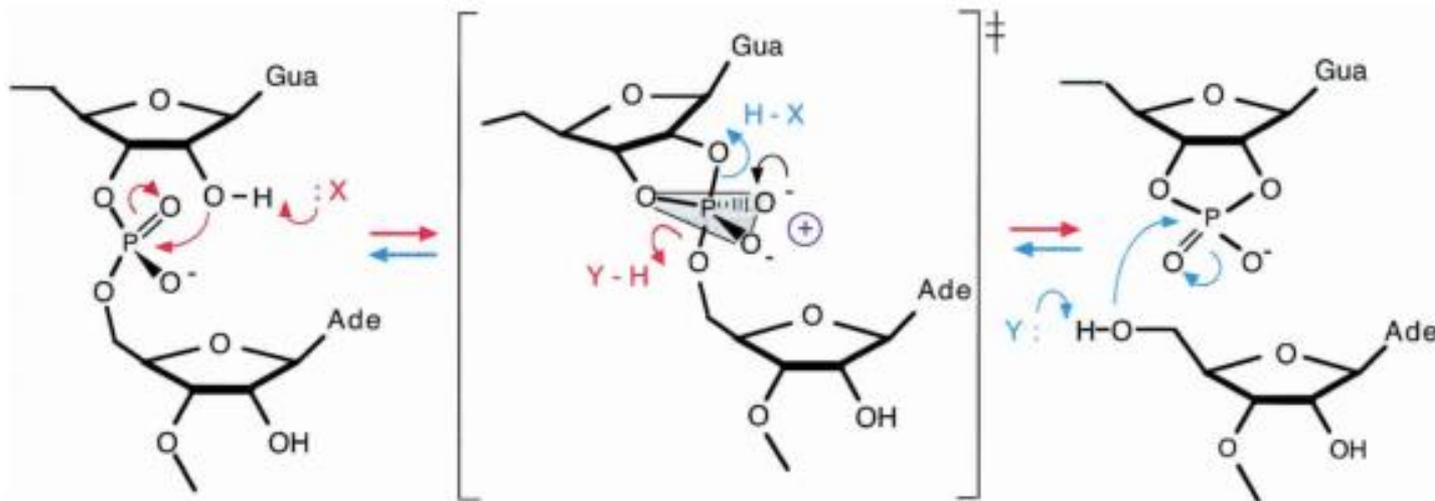


# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Varkud Satellite

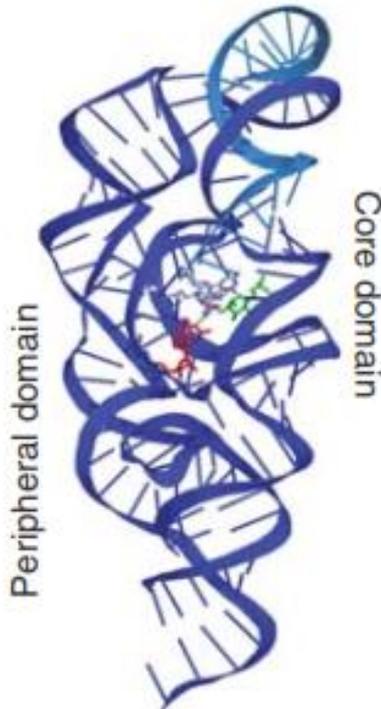
Mecanismo de acción



# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Ribozima *glmS*



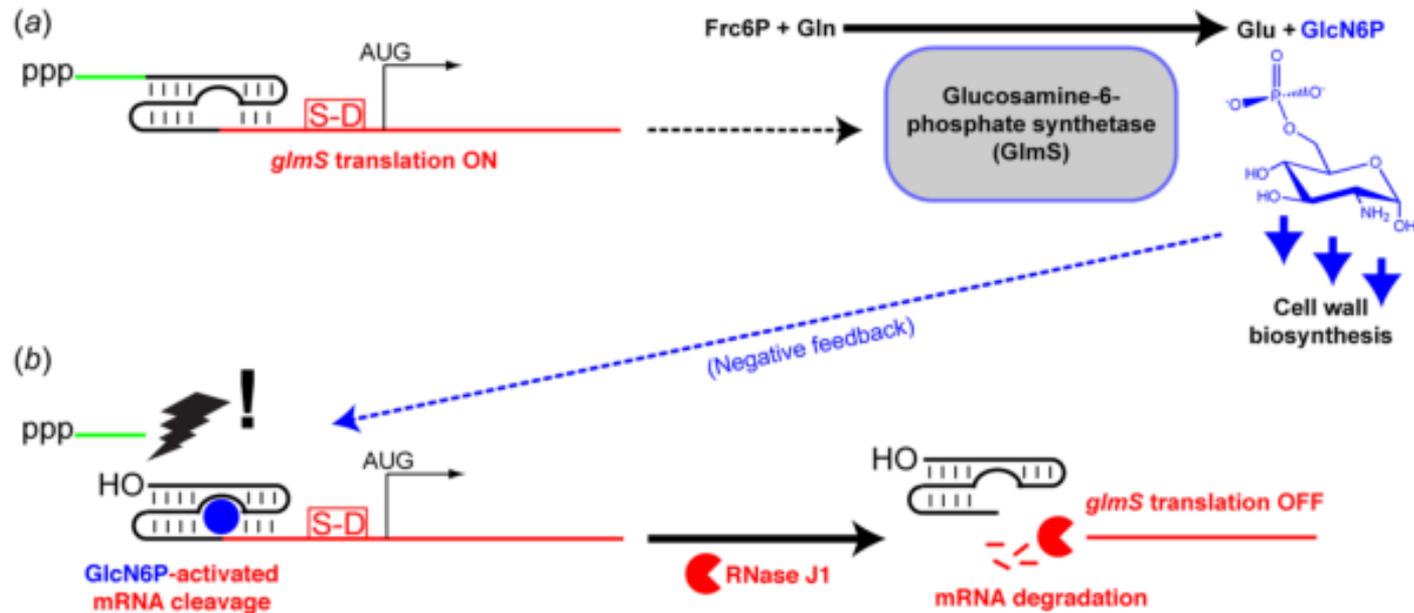
- Fue **descubierta** como un **dominio de RNA** que cataliza el **clivaje específico** en la presencia de **glucosamina 6-fosfato (GlcN6P)**.
- En **ausencia** de **GlcN6P** no sucede la **catálisis**.
- Se **encuentra** en **bacterias Gram positivas**, y se lo detectó en el **gen** de la *glucosamina-6-fosfato sintetasa* (*glmS*).
- Su presencia **controla** el **nivel de producto**, ya que en exceso de GlcN6P actúa la hidrólisis y se expone el mRNA a las RNAsas.

# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

Ribozima *glmS*

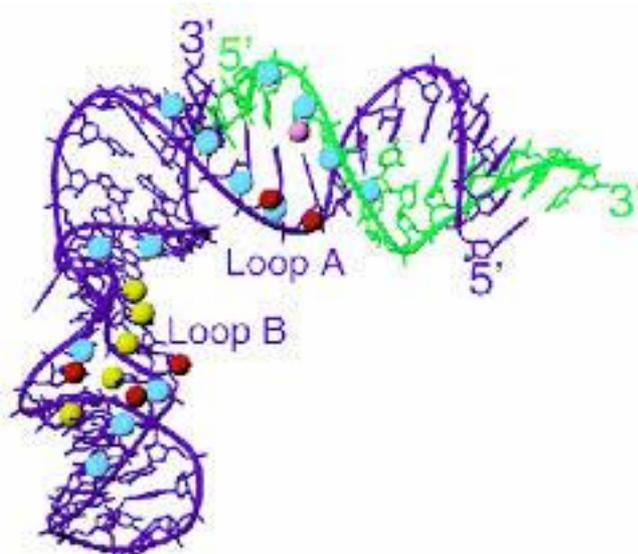
Rol biológico



# RNAs no codificantes

## Ribozimas pequeñas

### Hairpin



- Se encuentra en **satélites de RNA de virus de plantas**.
- Se detectó por primera vez en la cadena menos de un satélite de un virus de tabaco (**TRSV**).
- **Posee** alrededor de **50 nt**.
- Su **función** es **resolver los concatémeros de replicación**.

# **Aplicaciones de las ribozimas en terapias humanas**

# RNAs no codificantes

## Ribozimas en terapia

**Table 3. Ribozymes in Clinical Trials**

Company	Drug	Delivery Route	Target	Modification(s)	Disease	Phase	Status
Merck-Sirma	Angiozyme	SC	VEGFR-1	5'-PS, 2'-O-Me, 2'-deoxy-2'-C-allyl uridine, inverted 3'-3' dT	renal cancer	II	Completed
Merck-Sirma	Heptazyme	SC	HCV IRES	5'-PS, 2'-O-Me, 2'-deoxy-2'-C-allyl uridine, inverted 3'-3' dT	HCV	II	Terminated
UCSD	MY-2	Ex vivo, autologous CD4+ T cells	HIV U5 and pol	Expressed in MMLV vector	HIV	I	Completed
Johnson & Johnson, St. Vincent's Hospital	RRz1	Ex vivo, syngeneic CD4+ T cells	HIV Tat and Vpr	Expressed in MMLV vector	HIV	I	Completed
Janssen-Cilag Pty Ltd, UCLA	OZ1 (RRz1)	Ex vivo, autologous HPCs	HIV Tat and Vpr	Expressed in MMLV vector	HIV	II	Ongoing
City of Hope, Benitec	CCR5 ribozyme	Ex vivo, autologous HPCs	CCR5	Expressed in lentiviral vector	HIV	0	Ongoing
Ribozyme, City of Hope	L-TR/Tat-neo	Ex vivo, autologous HPCs	HIV Tat and Rev	Expressed in MMLV vector	HIV	II	Completed

**Nuevas aplicaciones de ácidos  
nucleicos con actividad  
catalítica**

# Delivery of DNAzyme targeting aurora kinase A to inhibit the proliferation and migration of human prostate cancer

This article was published in the following Dove Press journal:

International Journal of Nanomedicine

9 September 2015

[Number of times this article has been viewed](#)

Zhen Xing<sup>1</sup>

Sai Gao<sup>1</sup>

Yan Duan<sup>1</sup>

Haobo Han<sup>1</sup>

Li Li<sup>2</sup>

Yan Yang<sup>1</sup>

Quanshun Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory for Molecular Enzymology and Engineering of Ministry of Education, School of Life Sciences, Jilin University, <sup>2</sup>Department of Clinic Library, Changchun Women and Children's Health, Changchun, People's Republic of China

**Abstract:** Herein, a polyethylenimine derivative *N*-acetyl-L-leucine-polyethylenimine (*N*-Ac-L-Leu-PEI) was employed as a carrier to achieve the delivery of DNAzyme targeting aurora kinase A using PC-3 cell as a model. Flow cytometry and confocal laser scanning microscopy demonstrated that the derivative could realize the cellular uptake of nanoparticles in an energy-dependent and clathrin-mediated pathway and obtain a high DNAzyme concentration in the cytoplasm through further endosomal escape. After DNAzyme transfection, expression level of aurora kinase A would be downregulated at the protein level. Meanwhile, the inhibition of cell proliferation was observed through 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide and cell colony formation assay, attributing to the activation of apoptosis and cell cycle arrest. Through flow cytometric analysis, an early apoptotic ratio of 25.93% and G2 phase of 22.58% has been detected after *N*-Ac-L-Leu-PEI-mediated DNAzyme transfection. Finally, wound healing and Transwell migration assay showed that DNAzyme transfection could efficiently inhibit the cell migration. These results demonstrated that *N*-Ac-L-Leu-PEI could successfully mediate the DNAzyme delivery and downregulate the expression level of aurora kinase A, triggering a significant inhibitory effect of excessive proliferation and migration of tumor cells.

**Keywords:** gene therapy, DNAzyme, aurora kinase A, *N*-acetyl-L-leucine-polyethylenimine, cell proliferation, cell migration

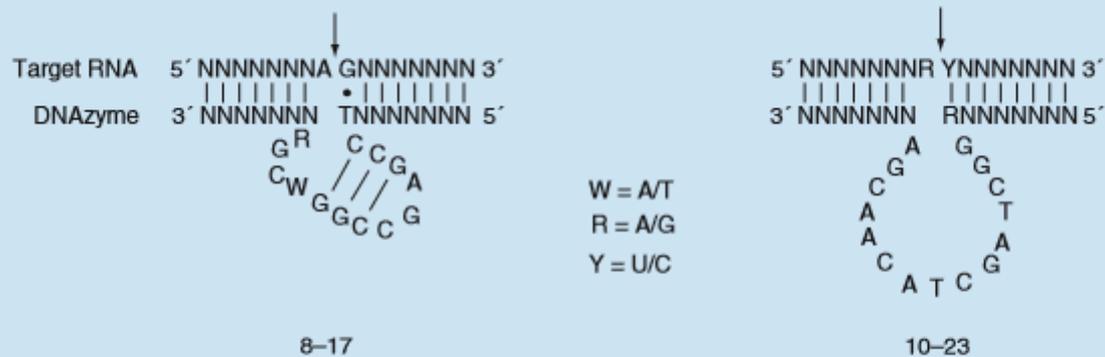
## DNAzyme-based therapeutics for cancer treatment

Gene-silencing strategies based on catalytic nucleic acids have been rapidly developed in the past decades. Ribozymes, antisense oligonucleotides and RNA interference have been actively pursued for years due to their potential application in gene inactivation. Pioneered by Joyce *et al.*, a new class of catalytic nucleic acid composed of deoxyribonucleotides has emerged via an *in vitro* selection system. The therapeutic potential of these RNA-cleaving DNAzymes have been shown both *in vitro* and *in vivo*. Although they rival the activity and stability of synthetic ribozymes, they are limited by inefficient delivery to the intracellular targets. Recent successes in clinical testing of the DNAzymes in cancer patients have revitalized the potential clinical utility of DNAzymes.

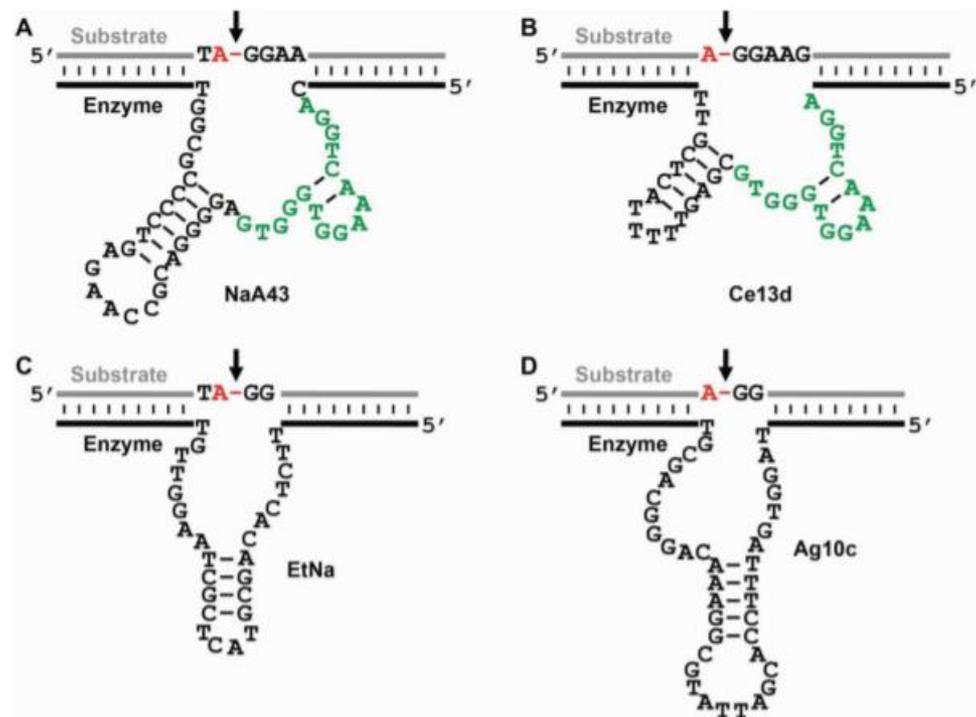
Shujun Fu<sup>1</sup> & Lun-Quan Sun<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Center for Molecular Medicine, Xiangya Hospital, Central South University  
Changsha, China 410008

\*Author for correspondence:  
[lunquansun@csu.edu.cn](mailto:lunquansun@csu.edu.cn)



**Figure 1. Structures of '8-17' and '10-23' DNAzymes.** The substrate binding domain binds RNA through Watson-Crick pairing. The catalytic domain cleaves targets at the site indicated by the arrow.



**Figure 3.** Proposed secondary structures of four new RNA-cleaving DNAzymes.