

## PROTEAZY ASPARTYLOWE W CHOROBIE ALZHEIMERA

Barbara NAWROT\*

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Łódź

**Choroba Alzheimer** (*Alzheimer's disease, AD*) to zespół zaburzeń neurodegeneracyjnych mózgu prowadzący do demencji. Schorzenie to statystycznie dotyka co dziewiątą osobę po 80-tym roku życia, a według ocen ekspertów do roku 2025 na całym świecie będzie 22 mln chorych.<sup>1</sup> Problem jest tym bardziej istotny, że stale powiększa się liczba ludności na Ziemi i wydłuża się średni czas życia człowieka. Konsekwencją jest wzrost populacji ludzi starych - a podeszły wiek stanowi największy czynnik ryzyka wystąpienia tej choroby.

AD towarzyszą patologiczne zmiany w mózgu, prowadzące do neurodegeneracji i powstania tzw. **splotów neurofibrilarnych** (ang. *neurofibrillary tangles, NFT*) oraz **płytek starczych** (ang. *senile plaques*). Sploty NFT utworzone są z prawo- lub lewoskrętnych, podwójnych, helikalnych filamentów (ang. *paired helical filaments, PHF*), składających się z ubikwityny, triady białek neurofilamentów, peptydów beta-amyloidowych oraz hiperfosforylowanego białka tau, należącego do tzw. białek MAP (ang. *microtubule-associated proteins*).<sup>2</sup> Płytki starcze, zwane też blaszkami lub złogami amyloidowymi, posiadają rdzeń zbudowany z  **$\beta$ -amyloidu**, dystroficznych neurytów oraz komórek astro- i mikrogleju. Generalnie, nazwa  **$\beta$ -amyloid** określa grupę peptydów i białek, zwykle glikozylowanych, charakteryzujących się wspólnym motywem strukturalnym, zawierającym struktury  $\beta$ -fałdowe równoległe albo prostopadłe do osi włókien. Blaszkami amyloidowymi mają szkodliwy wpływ na neurony, powodując ich uszkodzenie na drodze niewyjaśnionych do dziś mechanizmów. Uważa się, że na skutek akumulacji blaszek amyloidowych zostaje zaburzona równowaga jonowa w komórkach nerwowych, co prowadzi m.in. do uszkodzenia przewodzenia sygnału nerwowego i zmienionej aktywności kanałów wapniowych w synapsach. Złogi  $\beta$ -amyloidu mogą też powodować uszkodzenia mitochondriów oraz uwalnianie wolnych rodników. Efektem tych procesów jest niszczenie i obumieranie komórek nerwowych. Procesy degradacji pogłębia reakcja zapalna organizmu wywołana przez obecne w mózgu komórki mikrogleju i astrocyty.<sup>3</sup>

**Molekularne podłoże choroby Alzheimer** (formy rodzinnej) związane jest z mutacjami w trzech genach. Pierwszym z nich jest **gen APP** (ang. *Amyloid Precursor Protein*), znajdujący się

---

\*Adres korespondencyjny : Doc. dr hab. Barbara Nawrot, Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych PAN, Zakład Chemii Bioorganicznej, Sienkiewicza 112, 90-363 Łódź  
e-mail: [bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl](mailto:bnawrot@bio.cbmm.lodz.pl)

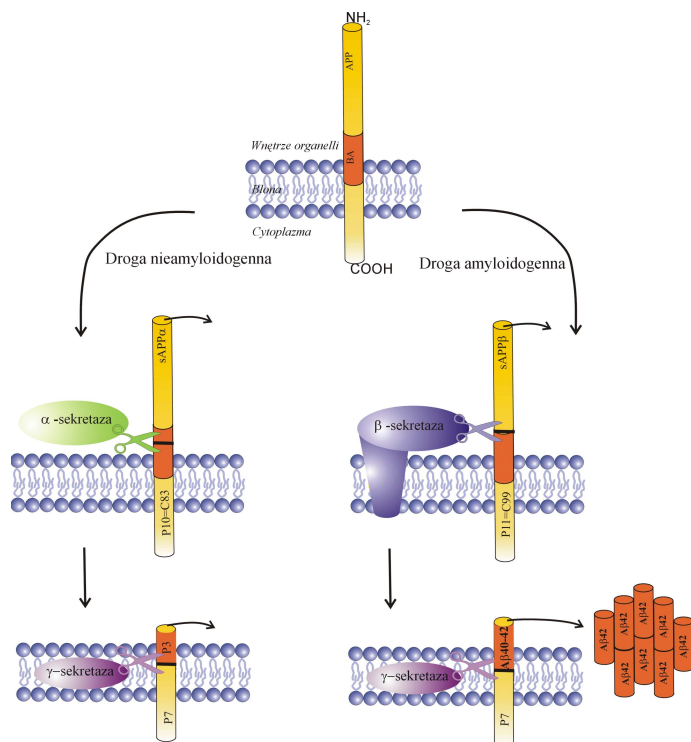
na chromosomie 21, kodujący białko prekursorowe amyloidu. W wyniku kilku możliwych dróg składania (ang. *alternative splicing*) mRNA białka APP tworzące się matryce translacyjne zawierają od 16 do 18 eksonów. Fragmenty eksonów 16 i 17 kodują sekwencję  $\beta$ -amyloidu. APP jest białkiem transbłonowym obecnym w większości organelli komórkowych. Jedną z dróg jego proteolizy prowadzi do powstawania szkodliwego  $\beta$ -amyloidu, gromadzącego się w płytkach starczych. Mutacje w genie APP są odpowiedzialne za niewielki odsetek rodzinnych postaci AD o późnym początku.

Wczesne otępienie starcze (<40 roku życia) obserwowane u osób z **zespołem Downa**, którego przyczyną jest **trisomia chromosomu 21**, spowodowane jest nadmierną ekspresją tego białka. Większość rodzin obciążonych AD o wczesnym początku (<30 roku życia) jest nosicielami mutacji w dwóch kolejnych genach, **presenilinie 1 i presenilinie 2** (PS1 i PS2). Do chwili obecnej zidentyfikowano ponad 100 różnych mutacji w genach PS1 i PS2. Pod koniec lat dziewięćdziesiątych w genie PS1 wykryto pierwszą mutację nazywaną polską.<sup>4</sup> Ostatnie badania dotyczące wpływu mutacji w genach presenilin odpowiedzialnych za wczesne przypadki AD doprowadziły do wykrycia dwóch nowych mutacji polskich w genie PS1 oraz jednej w genie PS2.<sup>5</sup> Preseniliny są dużymi białkami obecnymi w błonach siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego. Zaangażowane są w transport transbłonowy oraz w hydrolizę białka APP (jako składniki  $\gamma$ -sekreazy).

Ze sporadycznymi lub późnymi przypadkami rodzinnej choroby Alzheimera wiąże się polimorfizm genu **apolipoproteiny (ApoE)**, którego *locus* znajduje się na chromosomie 19. Stwierdzono, że częstość występowania allelu *apoE4* ( $\epsilon 4$ ) u pacjentów ze sporadyczną formą AD jest znacznie wyższa, niż u pacjentów z dziedziczną chorobą AD. Stwierdzono, że izoforma białka ApoE4 ( $\epsilon 4$ ) może stanowić „patologiczny *chaperon*” wspomagający tworzenie trzeciorzędowej struktury  $\beta$ -amyloidu, uczestniczącego w formowaniu złogów amyloidowych (przewaga struktury  $\beta$ -fałdowej nad  $\alpha$ -helikalną). Druga hipoteza zakłada, że  $\beta$ -amyloid stanowi dla białka  $\epsilon 4$  tzw. „*escort protein*”, tzn. jest fenotypowym markerem pierwotnej roli  $\epsilon 4$ .

Kolejnym genem ryzyka, wywierającym wpływ na rozwój AD, jest gen kodujący enzym zaliczany do **metaloendopeptydaz rozkładających insulinę** (ang. *insulin-degrading enzyme*, IDE) oraz inne małe peptydy. Białko IDE bierze udział w degradacji  $\beta$ -amyloidu wydzielanego do przestrzeni międzykomórkowej. Zaburzenia równowagi tworzenia  $\beta$ -amyloidu i jego usuwania na drodze degradacji są czynnikiem ryzyka wystąpienia AD.

W patogenezie choroby Alzheimera główną rolę odgrywa białko prekursorowe beta-amyloidu APP. **Proteoliza białka APP** zachodzi na jednej z dwóch możliwych dróg (według schematu na rysunku).



Na drodze nieamyloidogennej proteoliza zachodzi za pomocą  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekretazy, zaś na drodze amyloidogennej udział biorą  $\beta$ - i  $\gamma$ -sekretaza.

W pierwszej z tych dróg **sekretaza  $\alpha$**  hydrolizuje łańcuch polipeptydowy APP pomiędzy Lys687 i Leu688, w wyniku czego powstaje rozpuszczalny peptyd  $\alpha$ -APPs, oraz związany z błoną peptyd C83 o masie 9-10 kDa. Peptyd C83 jest dalej śródbłonowo hydrolizowany przez  $\gamma$ -sekretazę dając nietoksyczne peptydy P3 i P7 (CTF). Jest to droga dominująca; 90 % białka prekursorowego beta-amyloidu jest hydrolizowane przez  $\alpha$ -sekretazę.

Na drodze amyloidogennej białko APP hydrolizowane jest za pomocą **sekretazy  $\beta$**  pomiędzy aminokwasami Met671 i Asp672. Produktem tej hydrolizy jest rozpuszczalne białko  $\beta$ -APPs, oraz zakotwiczony w błonie peptyd C99 o masie 11-12 kDa. Ten ostatni jest dalej hydrolizowany za pomocą **sekretazy  $\gamma$** , dając w efekcie peptyd  **$\beta$ -amyloidowy** o masie ~4 kDa oraz produkt CTF.

Cząsteczki A $\beta$  są w większości peptydami o długości 39 i 40 aminokwasów (A $\beta$ 39, A $\beta$ 40), ale powstaje także pewna pula peptydu zawierającego 42 aminokwasów (A $\beta$ 42). A $\beta$ 42 jest bardziej hydrofobowy niż krótsze peptydy, co determinuje jego większe zdolności do tworzenia agregatów (złogów) - głównych składników płytek starczych.

Powiązanie przyczyn AD z proteolizą APP pozwoliło na początku lat dziewięćdziesiątych sformułować **hipotezę kaskady amyloidowej**,<sup>6,7</sup> według której złogi amyloidowe powstające w mózgu powodują najwcześniejsze i krytyczne zmiany istotne dla rozwoju choroby Alzheimerera. Kilka lat później sformułowano **hipotezę starzenia się białek w AD**,<sup>8</sup> według której peptyd A $\beta$  odgrywa główną rolę w genecie AD, jednak o jego toksyczności decydują zmiany konformacyjne zachodzące w łańcuchu (spontaniczna, chemiczna modyfikacja reszt asparaginianowych zachodząca w rozpuszczalnej formie A $\beta$ ). Zatem według obu hipotez obecność beta-amyloidu ma decydujący wpływ na rozwój AD.

### Charakterystyka proteaz białka APP

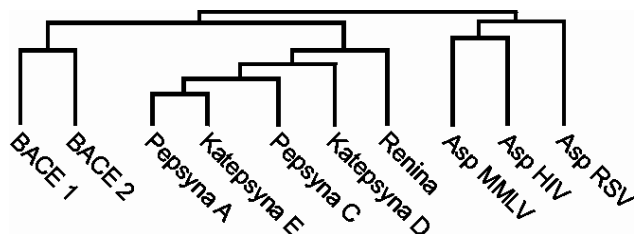
Proteoliza białka APP na drodze nieamyloidogennej zachodzi pod wpływem  $\alpha$ - i  $\gamma$ -sekretazy.  **$\alpha$ -Sekretaza jest metaloproteinazą dezintegryny** zależną od jonów cynku. Jest to najprawdopodobniej białko TACE [ADAM17 lub ADAM10]. Aktywność proteolityczna tego enzymu znacznie wzrasta w obecności aktywatorów kinazy białkowej C (PKC), takich jak estry forbolu. Aktywacja receptorów PKC może prowadzić do zwiększenia stopnia hydrolizy APP w miejscu  $\alpha$  i obniżenia proteolizy w miejscu  $\beta$ . Badania przeprowadzone na myszach pozbawionych genu TACE wykazały całkowity zanik aktywności  $\alpha$ -sekretazy w proteolitycznej hydrolizie białka APP. Tak genetycznie zmienione myszy nie dożywały narodzin, co wskazywałoby na istotną rolę białka TACE w metabolizmie komórki i, co bardziej istotne, że TACE nie może stanowić terapeutycznego celu w projektowaniu leków przeciwko AD.

**$\gamma$ -Sekretaza** jest to transbłonowy kompleks białkowy o aktywności **proteazy aspartylowej**, katalizujący proteolizę białka APP wewnątrz błony *reticulum endoplazmatycznego* (ER) i aparatu Golgiego. Kompleks ten składa się z heterodimerów presenilin 1 i 2 (PS1 i PS2), odpowiedzialnych za aktywność proteolityczną APP, glikozylowanej formy nikastryny (ang. *nicastrin*, NCT), biorącej udział w tworzeniu aktywnego kompleksu, oraz białek Aph-1a/Aph-1b i Pen-2, które prawdopodobnie stabilizują cały kompleks i biorą udział w tworzeniu aktywnej formy presenilin (heterodimerów).<sup>9</sup>

Białka PS1 i PS2 mają bardzo zbliżoną topologię; „przecinają” wielokrotnie błonę komórkową. Posiadają 8 domen transmembranowych połączonych pętlami wystającymi do przestrzeni wewnątrz- i zewnątrzkomórkowej. Preseniliny są proteazami katalizującymi reakcję wewnątrz błon (I-CliPs, ang. *intramembrane-cleaving proteases*).<sup>10</sup> Prowadzą proteolizę kilku różnych białek transbłonowych: APP, receptora Notch, receptora Erb-B4 i E-kadheryny.<sup>11</sup> Fragment CTF białka PS1 tworzy kompleksy z kalsenilinami oraz  $\beta$ -kateninami. Kalseniliny są neuronalnymi białkami wiążącymi jony wapnia, degradowanymi przez kaspazy. Obniżenie poziomu kalsenilin może prowadzić do zaburzeń transdukcji sygnału z udziałem jonów  $\text{Ca}^{2+}$ . Mnogość funkcji jakie spełniają preseniliny raczej wyklucza zastosowanie skutecznego inhibitora aktywności  $\gamma$ -sekretazy – związku o potencjalnych właściwościach terapeutycznych - nie wywołującego skutków ubocznych.

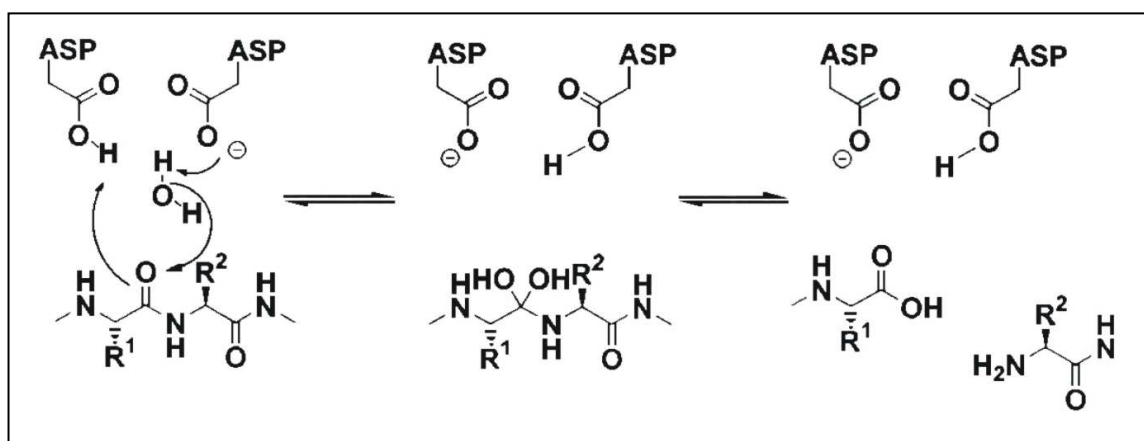
W 1999 r. metodami biologii molekularnej zidentyfikowano gen białka o aktywności  $\beta$ -sekretazy.  **$\beta$ -Sekretaza jest proteazą aspartylową Asp 2, zwaną także białkiem BACE1** (ang.  *$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme*) lub memapsyną 2.<sup>12</sup> Białko to wykazuje około 30 % homologię z białkami rodziny pepsyn. Zidentyfikowano także białko **BACE2** (memapsyna 1, Asp1) posiadające 64 % homologię z białkiem BACE (nazywanym teraz BACE1). Oba te białka

stanowią nową grupę transbłonowych proteaz aspartylowych<sup>13</sup>. Wiadomo już, że białko BACE2 w przeciwieństwie do białka BACE1 nie odgrywa zasadniczej roli w procesie generowania  $\beta$ -amyloidu. Drzewo rodziny proteaz aspartylowych pokazane jest na schemacie.



Białko BACE jest przede wszystkim obecne w błonach otaczających takie organelle jak aparat Golgiego czy endosomy, ale może być zlokalizowane także w błonie cytoplazmatycznej. BACE składa się z 501 aminokwasów; na N-końcu znajduje się 21 aminokwasowy peptyd sygnałowy oraz pomiędzy aminokwasami 22-45 sekwencja propeptydu. W świetle organeli komórkowych pozostaje region pomiędzy aminokwasami 46 i 460. Bliżej C-końca zlokalizowana jest domena transbłonowa, utrzymująca białko w membranie (pomiędzy aminokwasami 461-478), za którą pozostaje 24-aminokwasowy ogon cytoplazmatyczny. W obrębie regionu pozostającego w świetle organeli BACE posiada dwa miejsca aktywne, zawarte w sekwencjach aminokwasowych 93-96 i 289-292. Regiony te zawierają aminokwasy o silnie konserwatywnej sekwencji charakterystycznej dla proteaz aspartylowych: kwas asparaginowy, glicynę i serynę lub treoninę.

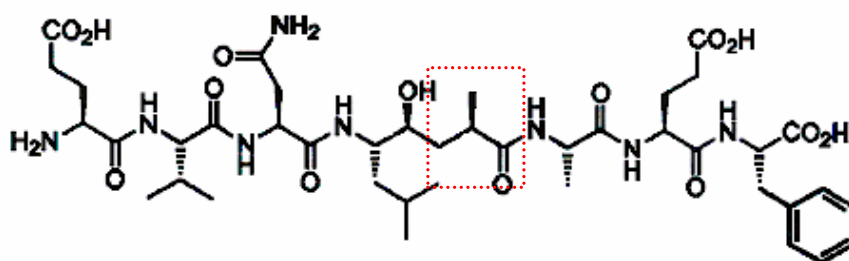
BACE charakteryzuje się właściwościami typowymi dla białek z rodziny proteaz aspartylowych. Proteazy te hydrolizują wiązanie peptydowe z wykorzystaniem dwóch reszt asparaginianu, przy czym jedna z nich musi być zjonizowana. Kwasowo-zasadowa funkcja katalityczna reszt Asp polega na tym, że aktywują one znajdującą się między nimi cząsteczkę wody i działają jak akceptory i donory protonów. Schemat reakcji katalizowanej przez tę rodzinę proteaz aspartylowych przedstawiony jest poniżej.



Udane próby wykrycia białka BACE w kompleksie z inhibitorem peptydowym OM99-2<sup>14</sup> pozwoliły ustalić strukturę tego białka. Poznanie sekwencji genu oraz struktury trzeciorzędowej  $\beta$ -sekreazy znacznie ułatwiło poszukiwania inhibitorów tego białka. Z drugiej strony wykazano, że myszy pozbawione genu BACE (BACE *knock-out*) nie wykazywały aktywności  $\beta$ -sekreazy i nie produkowały A $\beta$ .<sup>15</sup> Transgeniczne myszy przeżywały, były płodne i nie wykazywały defektów rozwojowych.

Wyniki powyższych badań sugerują bezpieczeństwo terapii, mających na celu obniżenie aktywności  $\beta$ -sekreazy, a więc wskazują, że  **$\beta$ -sekreaza może być dobrym celem terapeutycznym.**

Wiele grup badawczych, szczególnie z amerykańskich firm farmaceutycznych prowadzi poszukiwania nowych leków zapobiegających bądź leczących chorobę Alzheimera w grupie **inhibitorów hamujących aktywność  $\beta$ -sekreazy**. Poszukiwania inhibitorów BACE prowadzone są w obrębie peptydowych analogów substratu, tj. peptydomimetyków o sekwencji homologicznej do sekwencji białka APP, rozpoznawanej przez  $\beta$ -sekreazę. Jednym z nich jest inhibitor OM99-2, o sekwencji Glu-Val-Asn- $\Psi$ (Leu-Ala)-Ala-Glu-Phe. Inhibitor ten całkowicie hamuje aktywność  $\beta$ -sekreazy (IC<sub>50</sub> = 2,0 nM). Jego duże powinowactwo do BACE pozwoliło na krystalizację i rozwiązanie struktury białka z rozdzielczością 1,9 Å.



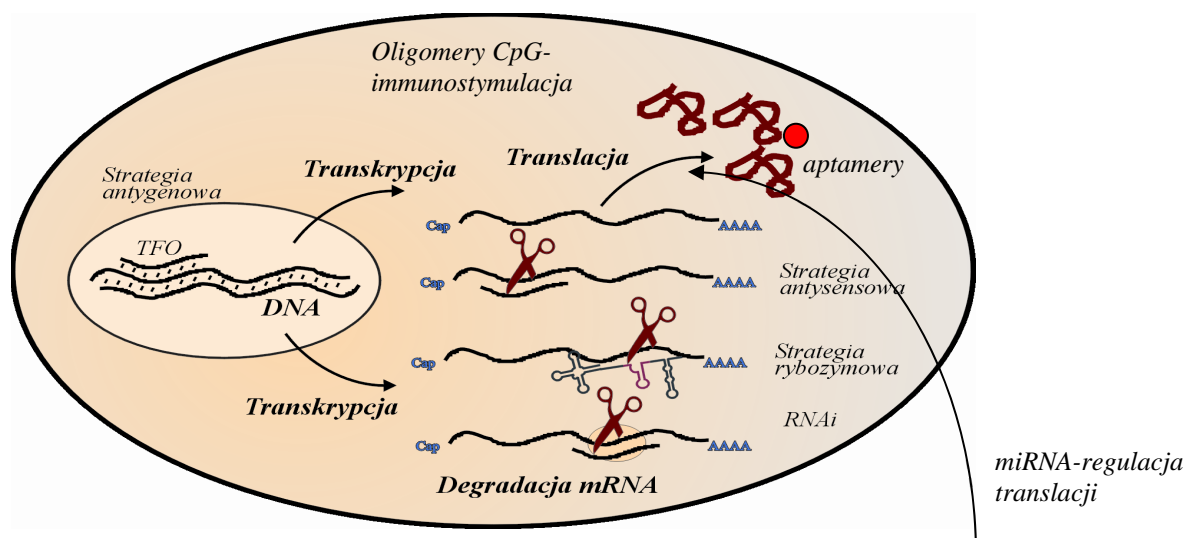
Istnieją jednak pewne ograniczenia w uzyskaniu skutecznego inhibitora białka BACE. Dotychczas wytworzone niskocząsteczkowe inhibitory  $\beta$ -sekreazy nie wykazują koniecznych właściwości leku, chociażby dlatego, że nie przekraczają bariery krew-mózg (ang. *blood-brain barrier*, BBB), oraz są inhibitorami innych proteaz aspartylowych takich jak katepsyna D, koniecznych dla prawidłowego funkcjonowania komórki. Dlatego też problem znalezienia dobrego inhibitora białka BACE, spełniającego wymagania stawiane lekom, jest wciąż otwarty.

Zaprezentowane powyżej podejście opiera się na poszukiwaniach **niskocząsteczkowych inhibitorów białek blokujących niepożądaną aktywność** (poprzez tworzenie funkcjonalnie nieaktywnych kompleksów białko / lek).

Aktywność białka może być także obniżona bądź zniesiona poprzez ograniczenie ekspresji jego genu. Od ponad 25 lat rozwijane są różnego rodzaju podejścia zmierzające do wykorzystania fragmentów kwasów nukleinowych, zarówno syntetycznych jak i wytwarzanych wewnątrzkomórkowo, do sekwencyjnie specyficznego hamowania ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym. Wśród nich największe znaczenie mają:

1. **Terapia antygenowa** (ang. *antigene*) wykorzystuje oligonukleotydy TFO (ang. *triplex forming oligonucleotides*) do hybrydyzacji z dwuniciowym DNA i utworzenia trwałego trypleksu hamującego proces transkrypcji.
2. **Terapia antysensowa** (ang. *antisense*) polega na tworzeniu komplementarnych dupleksów antysensowy DNA / mRNA i aktywacji RNazy H degradującej RNA w takich kompleksach. Konsekwencją jest inhibicja ekspresji genu na etapie translacji.
3. Efekt niszczenia matrycy translacyjnej można osiągnąć wykorzystując rybozomy i **deoksyrybozomy**. Częsteczki te rozpoznają komplementarną sekwencję substratu w sposób analogiczny do oligonukleotydów antysensowych i degradują mRNA poprzez katalityczną hydrolizę lub trans-estryfikację wiązania internukleotydowego.
4. Najnowszą, bardzo atrakcyjną strategią terapeutyczną wyciszania ekspresji genów na etapie potranskrypcyjnym jest wykorzystanie zjawiska **interferencji RNA**. Syntetyczne dupleksy RNA (ang. *short interfering RNA*, siRNA) podawane do komórek ssaczych wywołują efekt wyciszania genu komplementarnego do antysensowej nici siRNA. W procesie tym bierze udział kompleks białkowy RISC zawierający zarówno helikazy RNA jak i rybonukleazy.

**Strategie hamowania ekspresji genów** i aktywności niepożądanych białek za pomocą syntetycznych oligonukleotydów, fragmentów DNA i RNA pokazane są na rysunku poniżej.





Znajomość sekwencji kodującej  $\beta$ -sekreazy otworzyła także możliwości wykorzystania dostępnych strategii terapeutycznych do hamowania ekspresji tego białka. W Zakładzie Chemii Bioorganicznej CBMiM PAN w Łodzi prowadzone są badania nad inhibitorowymi kwasami nukleinowymi, skierowanymi na gen  $\beta$ -sekreazy. W ostatnim czasie uzyskano analogi kwasów nukleinowych, które, podane do ludzkich komórek embrionalnych nerki (ang. *human embryonal kidney cells*) HEK293 lub ludzkich komórek neuroblastomy SH-SY5Y, wywołują zahamowanie ekspresji genu białka BACE i w konsekwencji obniżają ilość wydzielanego pozakomórkowo peptydu beta-amyloidowego.<sup>12,16,17,18</sup> Związki te są testowane jako potencjalne czynniki anty-amyloidowe o właściwościach terapeutycznych.

Badania realizowane są w ramach grantu zamawianego PBZ-KBN /059/T09/09.

### Piśmiennictwo

1. www.alzforum.org
2. Liberski PP. Biologia molekularna chorób neurozwyrodnieniowych człowieka. XVII Zimowa Szkoła Instytutu Farmakologii PAN „Genetyka Molekularna Chorób Układu Nerwowego” Mogilany 2001, 63-84.
3. St George-Hyslop P. H., Otepienna układanka. Świat Nauki (Scientific American), 2001, 2, 56-63
4. Wisniewski Th., Dowjat W. K., Buxbaum J.D., Khorkova O., Efthimiopoulos S., Kulczucki J., Lojkowska W., Wegiel J., Wisniewski H. M., Frangione B.: A novel Polish presenilin-1 mutation (P117L) is associated with familial Alzheimer’s disease and leads to death as early as the age of 28 years. *NeuroReport*, 1998, 9, 217-221
5. Żekanowski C., Styczyńska M., Peplowska B., Gabryelewicz T., Religa D., Ilkowski J., Kijanowska-Haładyna B., Kotapka-Minc S., Mikkelsen S., Pfeffer A., Barczak A., Łuczywek E., Łączkowski J., Sobów T., Kuźnicki J., Barcikowska M., 2003, Mutations in presenilin 1, presenilin 2 and amyloid precursor protein genes in patients with early-onset Alzheimer’s disease in Poland, *Exp. Neurol.*, 184, 991-996
6. Selkoe D.J., The molecular pathology of Alzheimer’s disease. *Neuron*, 1991, 6, 487-498
7. Hardy J., Allslop D. 1991, Amyloid deposition as the central event in the etiology of Alzheimer’s disease. *Trends Pharmacol Sci*, 12, 383-388
8. Orpizewski J., Schorman N., Kluge-Beckerman B., Liepnieks J. J., Benson M. D.: Protein aging hypothesis of Alzheimer disease, *FASEB J.*, 2000, 14, 1255-1263
9. LaVoie M.J., Fraering P.C., Ostaszewski B.L., Ye W., Kimberly W.T., Wolfe M.S., Selkoe D.J., Assembly of the gamma-secretase complex involves early formation of an intermediate sub-complex of Aph-1 and Nicastrin. *J. Biol Chem.* 2003 Jul 11, 10.1074/jbc.M303941200
10. Wolfe M.S., Selkoe D.J., intramembrane Proteases – Mixing oil and Water. *Science*, 2002, 296, 2156-2157
11. De Strooper B., Annaert W., Cupers P., Saftig P., Craessaerts K., Mumm J.S., Schroeter E.H., Schrijvers V., Wolfe M.S., Ray W.J., Goate A., Kopan R., A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain. *Nature*, 1999, 398, 518-522
12. Nawrot B.: Targeting BACE with small inhibitory nucleic acids – a future for Alzheimer’s disease therapy? *Acta Biochim. Pol.* **2004**, 51 (2), 431-444.
13. Citron M.,  $\beta$ -secretase As a Target for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *J. Neurosci. Res.*, 2002, 70, 373-379 .



14. Hong L., Koelsch G., Lin X., Wu S., Terzyan S., Ghosh A.K., Zhang X.C., Tang J., Structure of the protease domain of memapsin 2 (beta-secretase) complexed with inhibitor. *Science*, 2000, 290, 150-153
15. Roberds S.L., et al., BACE knock-out mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain. Implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum. Mol. Genet.*, 2001, 10, 1317-1324
16. B. Nawrot, S. Antoszczyk, M. Maszewska, G. Rebowski, T. Kuwabara, M. Warashina, K.Taira, W.J. Stec: Modulation of beta-Secretase Gene Expression by Action of Catalytic Nucleic Acids” *Nucleic Acids Res. Suppl. No 2*, **2002**, 105-106.
17. Nawrot B., Antoszczyk S., Maszewska M., Kuwabara T., Warashina M., Taira K., Stec W.J.: Efficient Inhibition of  $\beta$ -Secretase (BACE) Gene Expression in HEK293T Cells by tRNA<sup>Val</sup>/CTE-Driven Hammerhead Ribozymes. *Eur. J. Biochem.* **2003**, 270, 3962-3970.
18. Nawrot B., Sipa K., Sierant M., Maszewska M., Taira K., BACE-directed silencing efficiency of siRNA expressed under tRNA<sup>Val</sup> promoter. *Annals of the Polish Chemical Society*, **2004**, 625-628.