

# RNA INTERFERENCIA – NOVÝ NÁSTROJ GÉNOVEJ TERAPIE

Bc. Branislav Kusenda<sup>1,2</sup>, RNDr. Šárka Pospíšilová, Ph.D.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centrum molekulární biologie a genové terapie, Interní hematologická klinika, FN Brno, Brno

<sup>2</sup>Katedra genetiky, Univerzita Komenského, Přírodovědecká fakulta, Bratislava

RNA interferencia bola popísaná ako proces post-transkripčného utlmovania génovej expresie, sprostredkovaný dvojreťazcovými molekulami RNA, a ako obranný mechanizmus bunky proti vírusom a transpozónom. Porozumenie mechanizmu RNA interferencie umožnilo jeho experimentálne využitie na cieleňé utlmovanie génovej expresie a prinieslo zaujímavé informácie o spojitosti RNA interferencie a niektorých ochorení. Cieleňé utlmovanie génovej expresie umožňuje jednak detailné štúdium funkcie jednotlivých génov a stáva sa jedným z nových a nádejných prístupov pre génovú terapiu.

**Kľúčové slová:** RNA interferencia, génová terapia, siRNA, miRNA.

Neurol. pro praxi, 2006; 2: 69–71

## Úvod

Expresia genetickej informácie zapísanej v DNA má viacero krokov (obrázok 1). Prvým krokom je transkripcia, pri ktorej vzniká mediátorová RNA (mRNA), konečným krokom je translácia, pri ktorej vzniká proteín. Každý z krokov expresie je pod prísnou kontrolou regulačných mechanizmov, ktoré zabezpečujú, aby dochádzalo k expresii správnych génov, v správnom čase a v správnych bunkách. Nedávno bol popísaný regulačný mechanizmus označený ako RNA interferencia (RNAi), podieľajúci sa na regulácii rozmanitých procesov ako je bunkový cyklus, diferenciácia, ontogenéza, apoptóza, kancerogenéza a vznik niektorých neurologických ochorení.

## Objav RNA interferencie

Jav RNA interferencie bol najprv popísaný na rastlinách a nižších živočíchoch. Prekvapivé výsledky priniesli experimenty na Petúniách, kde sa vedci snažili pripraviť transgénne rastliny s tmavšou purpurovou farbou vnesením pigment-produkujúceho génu. Namiesto očakávanej tmavo purpurovej farby mnohé kvety mali formu variegata (na kvetoch sa striedala biela a purpurová farba) alebo dokonca boli úplne biele. Pomocou molekulárnych analýz zistili, že expresia endogénneho pigment produkujúceho génu nebola nahradená, ale hladina mRNA produkovaná týmto génom bola 50krát nižšia ako u štandardných rastlín (15).

## dsRNA indukuje post-transkripčné utlmenie génovej expresie

Prvé dôkazy o tom, že by dsRNA mohla spôsobovať utlmovanie génovej expresie, prišli z prác na modelovom organizme hlístke *Caenorhabditis elegans*, ktorých cieľom bolo utlmiť expresiu par-1 génu pomocou jednovláknových antisense RNA a ná-

sledne určiť jeho funkciu (10). Neskôr sa ukázalo, že injekcia dvojitých RNA (zmes sense a antisense reťazcov RNA) vedie až k dvojnásobnému utlmeniu expresie cieľového génu v porovnaní s aplikáciou jednovláknovej RNA samostatne. Následné experimenty ukázali, že k utlmeniu expresie dochádza na post-transkripčnej úrovni (obrázok 1) (8). Novo objavený mechanizmus utlmovania génovej expresie sprostredkovaný dvojitými RNA bol označený ako "RNA interferencia" (RNAi) (18).

## Mechanizmus RNA interferencie

Aj keď sa mechanizmus RNA interferencie môže líšiť v detailoch u živočíchov, rastlín a húb, ide o vysoko konzervovaný mechanizmus. Základný proces zahŕňa štiepenie dsRNA na kratšie fragmenty, ktoré zabezpečujú rozpoznanie cieľovej mRNA na základe sekvenčnej homológie (14). Existujú dva základné mechanizmy (dráhy) siRNA a miRNA (obrázok 1).

Tieto dráhy sú geneticky a biochemicky odlišné (obrázok 2), avšak o konkrétnom mechanizme utlmenia expresie rozhoduje stupeň komplementarity a homológie siRNA alebo miRNA k cieľovej mRNA (6).

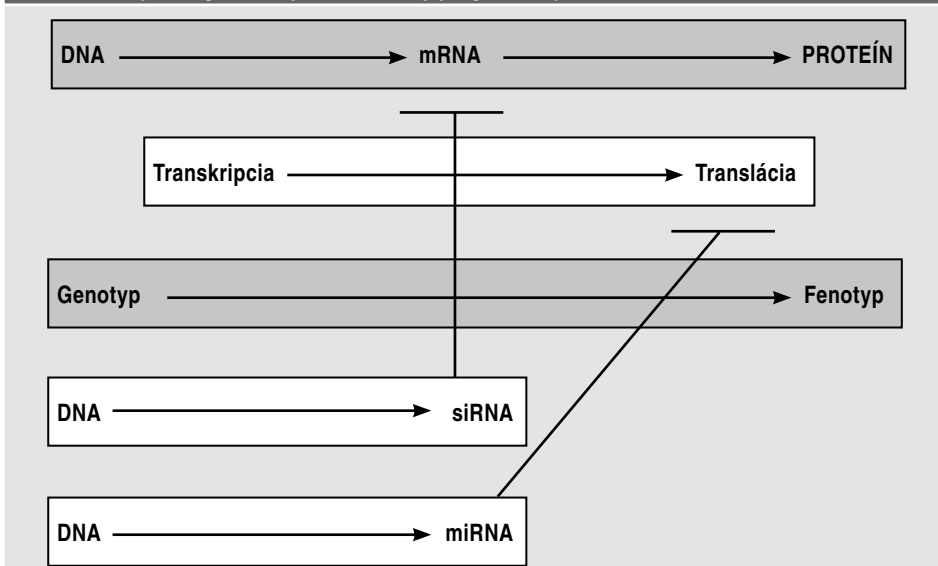
## siRNA (malé interferujúce RNA)

siRNA dráha začína štiepením dlhšej dsRNA (obrázok 2) enzýmom Dicer na krátke dvojreťazcové RNA označované ako siRNA. Tieto siRNA sú začlenené do proteínového komplexu RISC a aktivujú ho. Nakoniec môže aktívny RISC\* rozpoznať a štiepiť cieľovú mRNA na základe striktnej komplementarity siRNA k cieľovej mRNA (11).

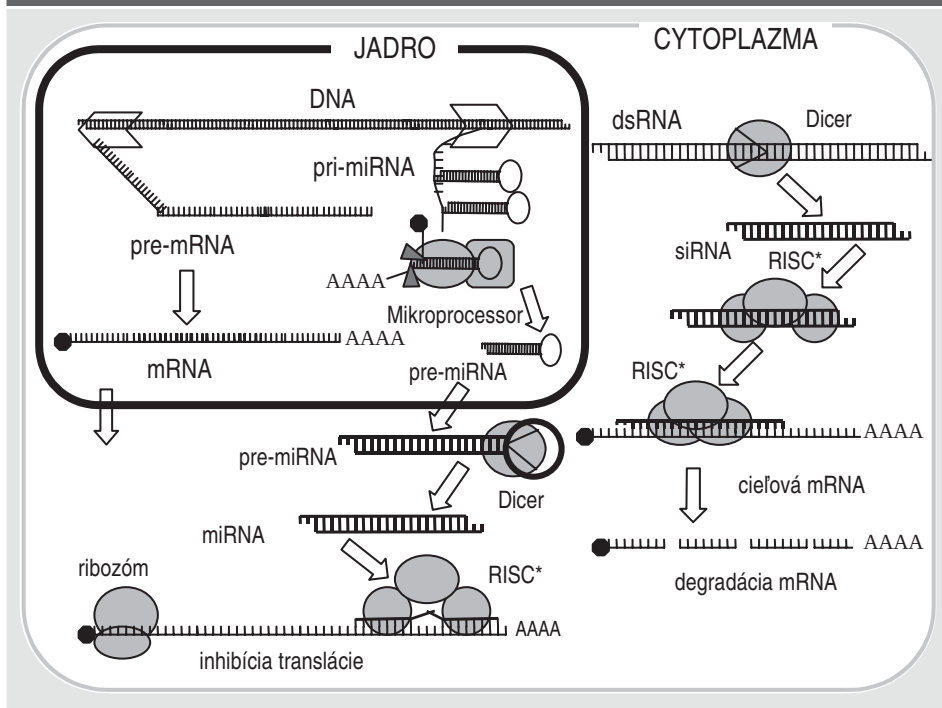
## miRNA (mikro RNA)

Na rozdiel od siRNA sú miRNA kódované génom bunky (19) ako prekursor pomenovaný pri-miRNA (obrázok 2). Enzymatický komplex Mikroprocessor obsahujúci enzým DGCR8 a enzým

Obrázok 1. Expresia genetickej informácie a jej regulácie sprostredkovaná siRNA a miRNA



Obrázok 2. Mechanizmus RNA interferencie miRNA a siRNA dráha



Drosha, štiepi pri-miRNA na kratšie fragmenty označované ako pre-miRNA. V ďalšom kroku z pre-miRNA pôsobením enzýmu Dicer vzniká miRNA, ktorá sa stáva súčasťou RISC. Aktívny komplex RISC\* môže inhibovať transláciu mRNA na základe parciálnej komplementarity miRNA k mRNA cieľového génu (9).

## Ochorenia a RNAi

U viacerých ľudských ochorení bola identifikovaná deregulácia expresie konkrétnych miRNA alebo narušenie funkcie komponentov mechanizmu RNAi (1). Príkladom ľudského ochorenia, na ktorého vzniku sa pravdepodobne podieľa narušenie funkcie komponentov RNAi mechanizmu, je DiGeorgov syndróm, ktorý postihuje asi 1 z 3000 živo narodených detí. Jeho klinický prejav je veľmi variabilný od srdcových defektov cez imunodeficienciu až po schizofréniu, delečný región obsahuje asi 30 génov, pričom jeden z nich je DGCR8, ktorý je súčasťou komplexu Mikroprocessor zapojeného v biogenéze miRNA (17). Nedávno bol popísaný regulátor sekrécie inzulínu miRNA – miR-375. Zvýšená expresia miR-375 utlmuje glukózou indukovanú sekréciu inzulínu a pri inhibícii miR-375 je sekrécia zvýšená. Modulácia sekrécie inzulínu pomocou miR-375 je nezávislá na zmenách glukózového metabolizmu a intracelulárnej Ca<sup>2+</sup> signalizácie, čo robí z miR-375 potenciálny farmaceutický cieľ (16).

## Deregulácia expresie miRNA sa podieľa na karcinogéze

Pozoruhodné zistenie o diferenciálnej expresii miRNA v nádoroch v porovnaní s zdravým tkanivom

naznačuje na ich dôležitú úlohu v procese karcinogenézy. Predpoklad, že niektoré miRNA majú funkciu nádorových supresorov alebo protoonkogénov podporuje štúdia, v ktorej bolo zistené, že 98 z 186 (tj. 52,5%) analyzovaných miRNA génov leží v oblastiach častých chromozómových prestavieb pozorovaných u nádorov alebo na fragilných miestach (5). Viacero autorov referovalo o tkanivovo špecifickom expresnom profile miRNA a o klasifikácii nádorov založenej na expresii miRNA ako o perspektívnom diagnostickom a prognostickom markeri (13).

## RNAi a neurologické ochorenia

Jedným z neurodegeneratívnych ochorení na ktorého vzniku sa pravdepodobne podieľa narušenie RNAi, je Spinálna muskulárna atrofia (SMA), spôsobená zníženou expresiou alebo stratou funkcie v dôsledku mutácie SMN (survival of motor neurons) génu. SMN proteín je súčasťou proteínového komplexu, ktorého dva proteíny (Gemin 3 a Gemin 4) sa podieľajú aj na biogenéze miRNA (7). Ďalším ochorením v ktorého patogenéze sú pravdepodobne zapojené komponenty procesu RNAi, je syndróm fragilného X. Toto ochorenie je spôsobené mutáciou v FXMR (fragile X mental retardation) géne, alebo jeho zníženou expresiou. Experimenty na modelových organizmoch ukázali, že FXMR proteín je súčasťou RISC komplexu a je asociovaný s enzýmom Dicer (12). Génový lokus miR-175 bol identifikovaný ako kandidátny región pre neurologické ochorenia: Parkinsonovu chorobu so skorým nástupom a na X viazanú mentálnu retardáciu (MRX3) (7).

## Génová terapia

Pre aplikácie RNAi v génovej terapii je potrebné vyriešiť mnohé problémy, dva z nich sú možná cytotoxická odpoveď po vnesení dsRNA do bunky a dostatočne efektívne vnesenie siRNA/miRNA do cieľových buniek. Syntetické siRNA sprostredkovávajú silnú a špecifickú RNAi, ale ich účinok je iba dočasný, čo značne obmedzuje využitie tohoto prístupu (2). Na prekonanie tohoto nedostatku sú vyvíjané rôzne expresné vektory či už na základe plazmidov alebo vírusov. Takéto vektory majú dve hlavné potenciálne využitia – v oblasti funkčnej genetiky a v génovej terapii. Pomocou RNAi je teoreticky možné utlmiť expresiu ktoréhokoľvek génu v transkriptóme, čo z nej robí ideálny nástroj pre štúdium funkcie génov. Nedávne experimenty dokázali, že siRNA/miRNA inhibujú génovú expresiu in vivo a poukazujú na reálnu možnosť využiť RNAi ako nástroj pre génovú terapiu (3). Pokrok v cielelom vnesení a vhodných vektoroch smeruje k možnému využitiu RNAi ako terapeutického nástroja pre rôzne genetické a neurologické ochorenia (4). Úspech tohoto prístupu bude závislý na metóde vnesenia siRNA/miRNA alebo vektoroch schopných infikovať cieľové bunky. Špecifické utlmenie expresie iba mutantnej verzie génu alebo fúzneho génu umožňuje vysoko špecifické pôsobenie iba na choré alebo nádorové bunky bez ovplyvnenia zdravých buniek. Táto skutočnosť značne znižuje nutnosť tkanivo/nádorovo špecifických vektorov alebo tkanivo špecifickej expresie (3). V súčasnosti je RNA interferencia využívaná na odhaľovanie funkcie génov ako nástroj funkčnej genetiky a neustále pribúdajú experimenty zamerané na potenciálne využitie v génovej terapii. Prvé klinické testy využívajúce RNAi ako terapeutický prístup už prebiehajú, ale ešte stále sme len na začiatku objavovania veľkého potenciálu malých RNA.

*Táto práca bola podporovaná grantom MŠMT ČR 1K04017 a grantom Elpida-Nukleus.*

## Vysvetlenie skratiek a niektorých termínov:

- antisense RNA – (nekódujúca RNA) RNA komplementárna k mRNA
- bp – (base pairs), básových párov
- Dicer – enzým, člen RNáza III rodiny, s dsRNA špecifickou endonukleázovou aktivitou, štiepi dsRNA na 19-25 nukleotidové (nt) fragmenty
- DGCR8 – (DiGeorge syndrome critical region gene 8), gén 8 kritického regiónu DiGeorgovho syndrómu, dsRNA viažuci proteín.
- Drosha – dsRNA špecifická ribonukleáza, odštiepuje vlásenkovú slučku z pri-miRNA
- ds – (double stranded), dvojvláknová
- nt – (nucleotide), nukleotid

- PTGS (Post-transcriptional Gene Silencing) Utlmenie génovej exprese na post-transkripčnej úrovni. Počas PTGS dochádza k transkripcii génu, ale mRNA je degradovaná alebo je inhibovaná jej transláciou
- Ribozóm – nukleoproteínový komplex ktorý zabezpečuje transláciu
- RISC – (RNA-induced silencing complex). Nukleázový komplex, zložený z proteínov a siRNA alebo miRNA, ktorý na základe sekvenčnej komplementarity k siRNA degraduje cieľovú mRNA, alebo inhibuje transláciu na základe čiastočnej komplementarity k miRNA
- RNA interferencia (RNAi) – Post-transkripčné utlmenie génovej exprese indukované dvojitou vláknovou RNA, prvý krát použitý vedcami skúmajúcimi *C. elegans*
- sense RNA – (kódujúca RNA), RNA komplementárna k antisenseRNA
- siRNA – (small interfering RNA), exogénna, 19-25bp, niektoré publikácie uvádzajú až 29bp

dsRNA, vzniká štiepením dlhej dsRNA alebo shRNA enzýmom Dicer. Môže vzniknúť produkt transkripcie pomocou RdRP alebo môže byť pripravená synteticky z oligonukleotidov. Zabezpečuje špecifickú interakciu RISC a cieľovej mRNA

- Transkripcia – prepis genetickej informácie z DNA do RNA
- Translácia – preklad genetickej informácie z mRNA do proteínu, prebiehajúci na ribozóme
- miRNA – (micro RNA), endogénna, 21-24bp RNA, ako súčasť RISC sprostredkováva inhibíciu translácie väzbou na 3' neprekladanú oblasť cieľovej mRNA
- mRNA – mediatorová RNA, vznikajúca po úpravách primárneho transkriptu, ktorý vzniká transkripciou
- par-1 – (polarity-inducing kinase 1), gén pre polaritu indukujúcu serín treonín kinázu
- pre-miRNA – prekursor miRNA asi 70nt RNA dlhý s 1-4nt prečnievajúcim 3' koncom a 25-30bp vlá-

senkovou štruktúrou zakončenou relatívne malou slučkou

- pri-miRNA – primárny transkript obsahujúci viacero pre-miRNA, niekoľko dlhý prekursor pre –miRNA
- Variegata – forma sfarbenia rastlín pri ktorej sa striedajú sfarbené a nesfarbené (biele) pruhy tkaniva

#### Bc. Branislav Kusenda

Centrum molekulárnej biológie a genovej terapie,  
Interní hematologická onkologická klinika  
Černoplní 9, 625 00 Brno  
e-mail: Kusenda.Branislav@seznam.cz

#### Literatúra:

1. Alvarez-Garcia I, Miska EA, MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; 132: 4653–4662.
2. Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells. *Science* 2002; 296: 550–553.
3. Brummelkamp TR, Bernards A, Agami R, Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2002; Published online August 22, 2002.
4. Buckingham SD, Esmaili B, Wood M, Sattelle DB. RNA interference: from model organisms towards therapy for neural and neuromuscular disorders. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(2): 275–288.
5. Calin GA, Sevignani D, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bulirich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *PNAS* 2004; 101: 2999–3004.
6. Doench JG, Christian P, Petersen CP, Sharp A. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Development* 2003; 17: 438–442.
7. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, Sharma A, Dreyfuss G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs RNA 2003; 9: 180–186.
8. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–811.
9. Gregory RI, Shiekhattar R, MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res.* 2005; 65 (9): 3509–3512.
10. Guo S, and Kempheus KJ. Par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; 81: 611–620.
11. Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Current Opinion in Genetics & Development* 2002; 12: 225–232.
12. Ishizuka A, Siomi MC, Siomi HA. Drosophila fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev.* 2002; 16: 2497–2508.
13. Lu J, Getz G, Miska EA, Saavedra EA, Lamb J, Peck D, Cordero AS, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz RH, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834–838.
14. Matzke M, Matzke AJM, Kooter JM. RNA: Guiding Gene Silencing. *Science* 2001; 293: 1080–1083
15. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279–289.
16. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, MacDonald PE, Pfeffer S, Tuschl T, Rajewsky N, Rorsman P, Stoffel M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226–230.
17. Shiohama A, Sasaki T, Noda N, Minoshima S, Shimizu N, Molecular cloning and expression analysis of a novel gene DGCR8 located in the DiGeorge syndrome chromosomal region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003; 304 (1) 184–190.
18. Tabara H, Grishok A, Mello CC. RNAi in *C. elegans*: Soaking in the Genome Sequence. *Science* 1998; 282: 430–431.
19. Ying SY, Lin SL, Intronic microRNAs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2005; 326: 2497–2508.