

## RNA INTERFERENCE A PRAKTICKÉ ASPEKTY JEJÍHO VYUŽITÍ

KATEŘINA KONTOVÁ, VOJTĚCH ŠKOP,  
JIŘÍ SAJDOK a JARMILA ZÍDKOVÁ

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-  
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6  
vojtech.skop@vscht.cz

Došlo 27.3.08, přijato 15.9.08.

Klíčová slova: RNA interference, siRNA, miRNA,  
transfekce, buněčné kultury, biotechnologie

### Obsah

1. Teoretický úvod k RNA interferenci
  - 1.1. Mechanismus RNAi
    - 1.1.1. siRNA
    - 1.1.2. miRNA
    - 1.1.3. Tvorba heterochromatinu
2. Praktická hlediska využití RNA interference
  - 2.1. Způsoby získání siRNA
    - 2.1.1. Faktory ovlivňující vnesení siRNA do cílových buněk
    - 2.1.2. Analýza efektu RNA interference

### 1. Teoretický úvod k RNA interferenci

První zmínky o existenci procesu utlumování genové exprese, nazývaný nyní RNA interference (RNAi), se objevily koncem 80. let 20. století v publikacích zabývajících se geneticky modifikovanými rostlinami<sup>1,2</sup>.

V roce 1998 se A. Fire a C. Mello se spolupracovníky pokusili indukovat sekvenčně specifickou degradaci cytoplasmatické mRNA injekcí dsRNA obsahující stejnou sekvenci jako cílová mRNA u hlísty *Caenorhabditis elegans*. Nečekaně došlo k několikanásobnému snížení exprese cílového genu, než při vnesení jednořetězcových RNA (ssRNA). Vznikl tak nový termín „RNA interference“, jenž popisoval schopnost dvouřetězcové RNA (dsRNA), použité ve zmíněných experimentech, degradovat mRNA komplementární k jednomu z řetězců vnesené dsRNA<sup>3,4</sup>. Za tento objev dostali Andrew Fire a Craig Mello v roce 2006 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství. Schopnost dsRNA ovlivňovat genovou expresi byla u savců známa již dříve. Řada signálních drah indukovatelných interferonem odpovídá na dsRNA inhibicí translace účinkem dsRNA-aktivované proteinkinasy (např. proteinkinasa R, PKR)<sup>5</sup>. Klíčový rozdíl mezi touto odpovědí a RNAi spočívá

v jejich specifitě. Zatímco odpověď PKR inhibuje genovou expresi globálně, RNAi je schopna cílit svůj účinek na útlum exprese konkrétního genu<sup>6</sup>. Objev RNAi u hlístů a dalších organismů vysvětlil již dříve popsané posttranskripční umlčování genů (PTGS) u rostlin a hub. Poté, co byl stejný jev pozorován i u prvoků a většiny testovaných vyšších eukaryot, začala být RNAi intenzivně studována jako významný přirozený mechanismus regulace genové exprese i jako obranný mechanismus buňky proti virům a transponům. Vzhledem k možnosti využití vlastností RNAi k rozpoznání a specifické inaktivaci mutantních nebo chimérických molekul mRNA se tento jev stal účinným nástrojem funkční genomiky<sup>7</sup>.

#### 1.1. Mechanismus RNAi

K současnému obecně uznávanému modelu mechanismu RNAi vedly jak biochemické, tak i genetické výzkumné přístupy. Mechanismus RNAi je v detailech mezi-druhově odlišný, ale přesto se jedná o vysoce konzervativní a evolučně starý proces. Základním principem je štěpení dvouvláknové RNA (dsRNA) na krátké nepřekrývající se úseky, které rozpoznávají homologní mRNA a indukují utlumení jejich exprese. RNAi může být realizována dvěma způsoby, a to prostřednictvím tzv. „small interfering RNA“ (siRNA) indukující degradaci cílových mRNA nebo pomocí „microRNA“ (miRNA), které ve většině případů inhibují proces translace.

##### 1.1.1. siRNA

Biochemické charakterizace ukazují, že siRNA jsou 19–23 nukleotidů (nt) dlouhé úseky dsRNA se symetrickými 2–3 nt přesahy na 3'-konech, které obsahují 5'-fosfatovou a 3'-hydroxylovou skupinu<sup>8</sup>. Tyto krátké dsRNA úseky vznikají většinou štěpením dlouhých exogenních dsRNA enzymovým komplexem s RNasovou aktivitou nazývaným Dicer.

Dicer patří do skupiny vysoce konzervativní enzymové rodiny endoribonukleas (RNas III) s charakteristickými rysy štěpení. Ze struktury Diceru vyplývá, že se jedná o dimerní enzym. Precizní štěpení dsRNA na definované fragmenty je pravděpodobně umožněno faktem, že jedno z aktivních míst na každém z obou částí dimerní molekuly RNasy III je defektní, což přefazuje periodicitu štěpení z přibližně 9–11 nt, běžně probíhající u bakteriálních RNas III, na zhruba 22 nt, vyskytující se u enzymů skupiny Dicer<sup>9</sup>. Dicer je multidoménový protein, jehož molekulová hmotnost se pohybuje okolo 200 kDa. Předpovězená struktura zahrnuje následující domény: ATPasová a RNA helikasová doména, konzervativní PAZ doména, která je sdílená s Argonautem, dvě katalytické domény RNasy III a C-terminální dsRNA vazebná doména. Argonaut proteiny mají molekulovou hmotnost okolo 100 kDa, obsahují kata-

lytické místo pro štěpení mRNA a konzervativní domény zvané PAZ a PIWI. Argonaut proteiny mohou být rozděleny do dvou podrodin, Ago a Piwi, v závislosti na stupni sekvenční homologie buď k AGO1 z *Arabidopsis thaliana* nebo Piwi z *Drosophila melanogaster*. PIWI doména slouží ke kontaktu 5'-konce aktivního vlákna siRNA s komplexem RISC (viz dále), PAZ doména zprostředkovává vazbu s komplexem RISC přes 3'-konec siRNA<sup>10</sup>.

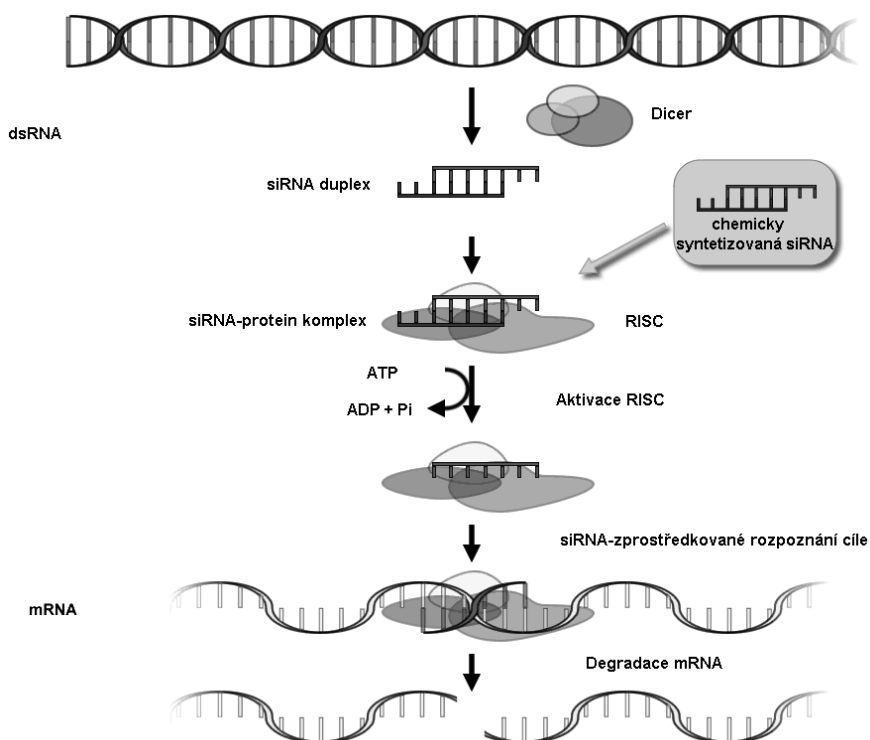
Komponenty procesu RNAi specificky rozpoznávají siRNA duplex a připojují jednotlivé siRNA na multiproteiновый komplex RISC (RNA-induced silencing complex). Helikasovou aktivitou komplexu RISC dojde k rozpletení siRNA duplexu a k aktivaci komplexu RISC nasednutím jednoho z vláken a degradací vlákna druhého. Aktivovaný komplex RISC následně vyhledává na molekule mRNA sekvenci zcela komplementární k návazanému vlákně siRNA a svou ribonukleasovou aktivitou ji degraduje, čímž zabrání translaci dané mRNA. O tom, které z vláken bude začleněno do proteinového komplexu RISC a účastní se vlastního procesu degradace cílové mRNA, rozhoduje termodynamická stabilita úseku na 5'-konci obou vláken siRNA duplexu. Vlákno s nižší stabilitou párování bazí v oblasti 2–4 nt na 5'-konci preferenčně asociuje s RISC a vyhledává komplementární sekvenci na cílové mRNA.

Detailní katalytický mechanismus degradace mRNA není v současné době ještě zcela objasněn, ale všechny modelové organismy sdílejí společné charakteristiky toho-

to procesu. PAZ doména Argonaut proteinu váže 3'-konec aktivního siRNA vlákna. PIWI doména Argonaut proteinu, která je strukturně podobná RNase H a je silným kandidátem pro umístění katalytického místa, se váže na 5'-konec siRNA vlákna<sup>11–13</sup>. První rozštěpení cílové mRNA probíhá v oblasti 10–11 nt (počítáno od 5'-konce siRNA vlákna). Uvolnění dvou vzniklých mRNA fragmentů z komplexu RISC vyžaduje dodání energie ve formě ATP. *In vivo* je 3'-fragment mRNA štěpen cytoplasmatickou exonukleasou XrnI, zatímco 5'-fragment je degradován exosomem, což je komplex exonukleas řídící degradaci mRNA ve směru 3'→5' (cit.<sup>13</sup>).

Objasnění struktury siRNA vedlo k hypotéze, že by siRNA mohla efektivně potlačovat genovou expresi u savčích buněk, aniž by došlo ke spuštění interferonové odpovědi, což bylo potvrzeno *in vitro* na tkáňových kulturách<sup>8,14,15</sup>.

Jedním z nejužasnějších aspektů RNAi je schopnost opakovaného tlumení signálu, přestože celý cyklus je spouštěn pouze minimálním množstvím dsRNA. To je způsobeno skutečností, že komplex RISC-RNA je schopen po degradaci komplementární mRNA regenerovat a pokračovat v dalším cyklu. Použití malého množství dsRNA minimalizuje také případné vedlejší efekty jako např. nasycení komplexu RISC. U všech eukaryot kromě hmyzu a savců byla zjištěna i další forma šíření signálu, zprostředkovaná tzv. RdRP (RNA-dependentní RNA polymeráza).



Obr. 1. Mechanismus účinku RNA interference zprostředkované molekulami siRNA

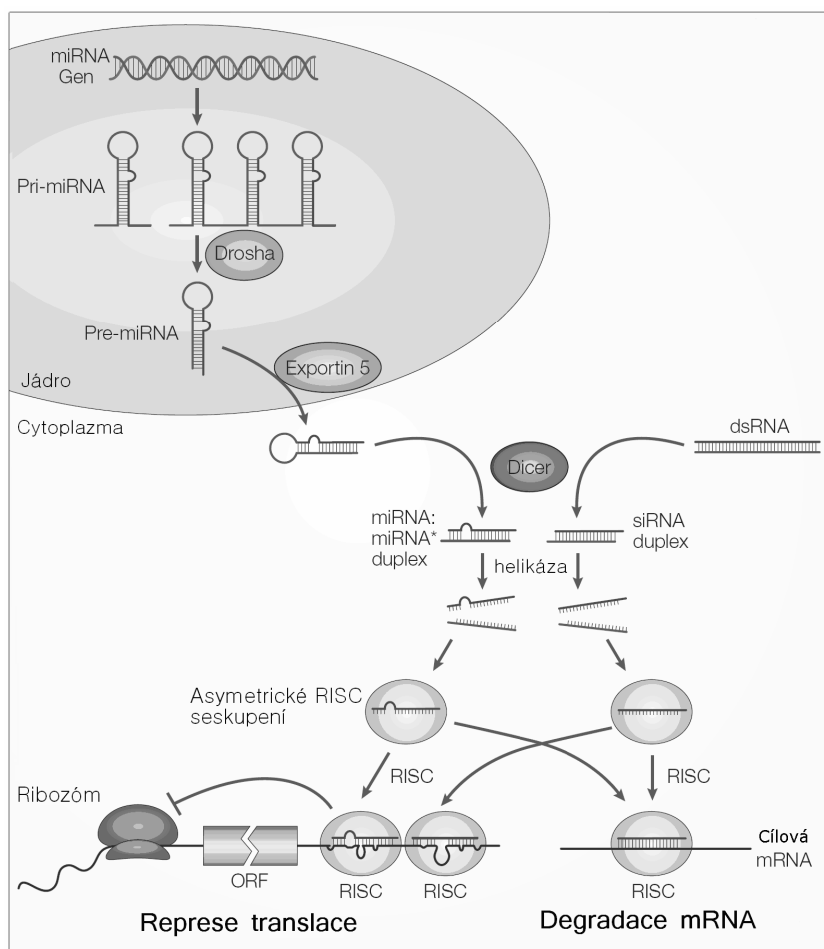
rasa) enzymem, který využívá jednořetězcovou siRNA jako templát pro syntézu komplementárního RNA řetězce. Transport siRNA může být zprostředkován komplexem RISC nebo přímo inkorporován do RdRP komplexu.

### 1.1.2. miRNA

MicroRNA (miRNA) jsou malé molekuly RNA kódované v rostlinném i živočišném genomu. Jedná se o evolučně konzervativní, endogenní nekódující RNA, které se podílejí na negativní regulaci genové exprese na posttranskripční úrovni. miRNA tvoří okolo 1–5 % předpovězených genů v živočišném genomu a 10–30 % genů kódujících proteiny je regulováno miRNA. V současnosti bylo zaznamenáno u obratlovců, bezobratlých a rostlin více než 4000 miRNA. Zralé miRNA jsou 19–25 nt dlouhé úseky mající významné biologické funkce v buněčné diferenciaci, buněčné proliferaci, apoptóze, sekreci inzulínu, struktuře chromosomů a virové rezistenci. Regulují translační proces svou vazbou na 3'-nepřekládanou oblast (untranslated region, UTR) cílové mRNA, čímž zabraňují pohybu ribosomu a následnému vzniku proteinu.

Geny pro miRNA se často v genomu vyskytují ve shlucích (tzv. klastry). Následně jsou pomocí dosud neznámého enzymu (pravděpodobně RNA polymerasy II) transkribovány jako jedna transkripční jednotka do dlouhého polycistronního primárního transkriptu (tzv. pri-miRNA)<sup>16</sup>. Ten vstupuje do jaderného multiproteinového komplexu zvaného Microprocessor, jehož klíčovými složkami jsou specifická endonukleasa Drosha a RNA vazebný protein Pasha (Partner of Drosha)<sup>17,18</sup>.

Pri-miRNA je štěpena pomocí enzymu Drosha na přibližně 70 nt RNA prekurzory, které obsahují neúplnou vlásenku se smyčkou a které mají na 3'-konci charakteristický 1–4 nt přesah (pre-miRNA)<sup>19</sup>. Drosha vytváří také buď 3'-nebo 5'-konec zralé miRNA v závislosti na řetězci, který je vybrán pro vazbu na RISC. Přesahující úsek je následně rozpoznáván jaderným exportním faktorem exportin-5 (Exp5), kterým je pre-miRNA transportována z jadra do cytoplasmy<sup>20</sup>. V cytoplasmě dochází ke stejnému štěpení enzymem Dicer jako v případě vzniku siRNA molekul. RNasa III štěpí pre-miRNA ve vzdálenosti 19 až 21 nt od konce vytvořeného enzymem Drosha a vytváří tak



Obr. 2. Mechanismus působení endogenní miRNA v buňce ve srovnání s účinkem exogenní siRNA

miRNA duplex. Aktivní vlákno molekuly miRNA ve vazbě na komplex RISC vyhledává úsek na 3'-UTR cílové mRNA, čímž dochází k tvorbě miRNP a k sekvencně specifické represi translace<sup>21,22</sup>.

V tomto kroku RNA interferenčního procesu je nejvíce patrný rozdíl mezi exogenními siRNA a endogenními miRNA. siRNA rozeznává zcela komplementární sekvence převážně v kódující oblasti cílové mRNA, zatímco miRNA je schopna interagovat i se sekvencemi pouze částečně komplementárními a to převážně v 3'-UTR. Dále siRNA iniciuje štěpení a degradaci mRNA na rozdíl od miRNA, která vazbou na cílovou mRNA způsobuje represi její translace. Oba mechanismy regulace – siRNA i miRNA – jsou vzájemně propojené; miRNA, která je zcela komplementární k cílové mRNA, může působit i jako siRNA a naopak<sup>23</sup>. Přesný mechanismus potlačení exprese genů pomocí miRNA není v dnešní době zcela objasněn, patrně k němu dochází v průběhu translace jiným než degračním mechanismem, protože množství funkční mRNA zůstává nezměněno. Obvykle jsou vyžadována vícenásobná vazebná místa v 3'-UTR cílové mRNA k získání měřitelné represe translace. Nedávné studie ukazují, že malé RNA molekuly, které se vážou na savčí Argonaut protein Ago2, dokáží přesunout cílové mRNA z cytoplasmy do tzv. P-bodies (tělíska pro zpracování, processing bodies), o kterých se předpokládá, že by mohl být místy degradace mRNA. P-bodies jsou mikroskopické útvary v eukaryotických buňkách, které se podílejí na přeměně (turnover) a degradaci mnohých mRNA, které jsou nepoužitelné pro další translační proces. Zůstává otázkou, zda je snížení stability cílové mRNA a represe translace důsledkem přemístění mRNA do P-bodies nebo naopak<sup>13</sup>.

### 1.1.3. Tvorba heterochromatinu

Mezi procesy tlumící genovou expresi vlivem dsRNA se začleňuje také utlumení chromatinu (chromatin silencing). Pod tímto pojmem rozumíme modifikaci jaderné DNA a histonů a následné sbalení chromatinu do kondenzované, transkripčně neaktivní heterochromatinové formy. Genom eukaryot obsahuje rozsáhlé oblasti aktivně transkribovaného euchromatinu a neaktivní kompaktní heterochromatin, který se dále dělí na konstitutivní a fakultativní<sup>24</sup>. Konstitutivní heterochromatin se vyskytuje zejména v telomerických a centromerických oblastech chromosomů a je tvořen repetitivními sekvencemi a inzercí mobilních elementů, tzv. transposomů. Množství unikátních genů v konstitutivním heterochromatinu je extrémně nízké. Příkladem vzniku fakultativního heterochromatinu může být inaktivace jednoho ze dvou X-chromosomů<sup>25</sup>. Heterochromatin je charakteristický sníženou acetylací histonů, vyšším obsahem methylovaného lysinu (K) v histonu 3 v pozici 9 (H3K9<sup>Me</sup>) a u rostlin a savců obsahují často heterochromatinové oblasti methylovanou DNA<sup>26–28</sup>. Methylace histonu H3 je nezbytná pro vazbu konzervativních heterochromatinových proteinů, zejména heterochromatinového proteinu 1 (HP1)<sup>29,30</sup>. Ačkoliv jsou dráhy vzniku heterochromatinu intenzivně studovány, iniciační fáze celého procesu zůstává stále nejasná. V současnosti se

předpokládá, že významnou roli v indukci vzniku heterochromatinu mají malé nekódující RNA<sup>25,31</sup>. Především je mechanismus chromatinové represe pomocí dsRNA příkladem zapojení RNA molekul do epigenetické regulace<sup>32</sup>.

Malé molekuly RNA (siRNA), způsobující v cytoplasmě posttranskripční útlum genové exprese, mohou v jádře způsobovat represi transkripce homologních genů a tím vyvolat lokální změny ve struktuře chromatinu. Umělá exprese malých molekul RNA odpovídající aktivně transkribovaným genům vedla u kvasinek, rostlin i lidských buněk k represi transkripce a k nárůstu množství methylovaných histonů H3K9<sup>Me</sup> (cit. <sup>33,34</sup>). U savců a rostlin byla represe indukovaná molekulami siRNA spojena také s methylací homologních úseků DNA<sup>34,35</sup>. Existují rozdílné efektorové komplexy obsahující siRNA, které reprimují translaci a štěpí mRNA (RISC komplex) nebo indukují chromatinovou represi (RITS komplex, RNA-induced initiation of transcriptional silencing complex). Tyto komplexy zahrnují řadu rozdílných proteinů, ale oba obsahují proteiny rodiny Argonaut. Mutace genů kódujících protein Argonaut ovlivnila dsRNA řízenou degradaci mRNA, represi translace pomocí miRNA a také represi transkripce a vznik heterochromatinu způsobenou malými molekulami RNA<sup>36</sup>.

Další funkcí malých nekódujících molekul RNA v jádře je ochrana genomu pomocí transkripční represe mobilních elementů (tzv. transposonů). Mnohá eukaryota obsahují dsRNA a siRNA odpovídající sekvencím retrotransposonů nebo DNA-transposonů<sup>37</sup>. Mobilní elementy mohou být často transkribovány jak přímo, tak také reverzně. Opačný směr transkripce může záviset na vlastních „antisense“ promotorech transposonů nebo na externích promotorech v blízkosti inzerce mobilního elementu<sup>38</sup>. Inverzní oblasti v transkripci transposonů mohou produkovat vlásečkové struktury<sup>39</sup>. Kvůli přítomnosti dsRNA transposonů může buněčný aparát RNA interference utlumit jejich expresi, což je pro organismus často zhoubné, protože vede k mutacím a přeuspořádáním chromosomů<sup>40</sup>.

Zapojení siRNA do regulace genové exprese ukazuje, že ne pouze proteiny, ale také molekuly RNA nekódující proteiny hrají v tomto procesu významnou roli. miRNA a siRNA jsou pouze malou částí nekódujících regulačních molekul RNA. U eukaryot je značné množství DNA transkribováno, avšak vzniklá mRNA není zapojena do syntézy proteinů. Kromě heterochromatinizace řízené pomocí siRNA byly popsány i jiné případy zapojující nekódující RNA do regulace struktury chromatinu. U savců a hmyzu regulují aktivitu X-chromosomových genů na chromatinové úrovni nekódující a dosti rozsáhlé molekuly RNA (až více než 10 000 nukleotidů)<sup>25</sup>. Inaktivace X-chromosomů u samic savců pomocí nekódujících RNA je spojena s methylací DNA.

Produkce krátkých dsRNA zapojených do inaktivace chromatinu a jejich šíření do přilehlých oblastí umožňuje nový úhel pohledu nejenom na mechanismus genové represe, ale také na novou funkci heterochromatinu a jeho evoluci<sup>32</sup>.

## 2. Praktická hlediska využití RNA interference

Ačkoliv existuje více metod pro studium genových funkcí, mnoho z nich, jako např. transgenní zvířecí modely, knockout genů a antisense RNA, je velice časově náročných, drahých a složitě aplikovatelných na rozsáhlejší studie. Po důkazech podaných skupinou T. Tuschla v roce 2001 (cit.<sup>41</sup>), že exogenní syntetická siRNA může sloužit v savcích buňkách k cílenému utlumení exprese genů, se RNA interference stala klíčovou strategií pro studium genových funkcí mnoha výzkumných týmů. Rychlé přijetí RNAi technologie vycházelo primárně ze snadného použití siRNA a silné potřeby najít metodu, která redukuje expresi jednotlivých genů v savcích buňkách s cílem potvrdit vazbu mezi identitou genů a jejich funkcí.

Nejvíce kritickými aspekty experimentálního designu je výběr funkčních siRNA, vhodných buněčných linií a účinného transportu siRNA do buněk. Tato rozhodnutí by měla být založena na typu studovaného biologického procesu.

Efektivní siRNA design je klíčový pro úspěšnost celého experimentu. Nejúčinnějšího tlumení genové exprese se dosahuje použitím 19–21 nt dlouhé dsRNA. siRNA je obvykle cílena do kódující sekvence genu, 50–100 nt od iniciačního kodónu. V této oblasti je hledána sekvence AA(N19)TT obsahující 30–50 % GC párů. Důležitým faktorem pro začlenění správného ze dvou vláken siRNA do komplexu RISC je počet GC párů na 3'-konci interferenční sekvence<sup>42</sup>. Pro ověření specifity navržené siRNA je nezbytné vybranou sekvenci podrobit hledání v BLAST<sup>®</sup> algoritmu, aby byla vyloučena homologie s některým z dalších genů a tak byla degradována pouze cílová mRNA. I přes dodržení všech pravidel však není zaručeno, že navržená siRNA sekvence bude účinně tlumit expresi cílového genu. Navrhuje se proto připravit si siRNA sekvenci více a jejich účinnost si experimentálně ověřit.

Řada společností zabývajících se problematikou RNAi nabízí na svých stránkách algoritmy pro návrh účinné siRNA sekvence. Také jsou na internetu přístupné databáze ověřených siRNA (např. [www.rnainterference.org/Sequences.html](http://www.rnainterference.org/Sequences.html)), ve kterých lze vyhledat již publikované sekvence. Mnoho komerčních výrobců siRNA (Ambion, Dharmacon, Qiagen, Proligo atd.) nabízí syntézu podle požadované sekvence zaslané zákazníkem (tzv. custom siRNA). Další možností je vybrat si ze seznamu ověřených siRNA (tzv. validated), které výrobci sami experimentálně otestovali a zaručují tak jejich účinnost. Nevýhodou validovaných siRNA je, že výrobce neposkytuje informace o jejich sekvenci.

### 2.1. Způsoby získání siRNA

Jak již bylo uvedeno výše, dsRNA delší než 30 bp aktivuje v savcích buňkách interferonovou odpověď a nespecifickou inhibici translace, a to buď aktivací protein-kinasy R (PKR), která fosforyluje a inaktivuje iniciační translační faktor eIF2a, což vede k represii translace<sup>43</sup>, nebo aktivací RNasy L, která způsobuje nespecifickou

degradaci RNA<sup>44</sup>. Tento jev se při vědeckém využití mechanismu RNAi obchází přímým vnášením krátkých siRNA do buněk, což významně eliminuje nespecifickou odpověď. V následujících odstavcích jsou shrnuty 4 hlavní způsoby získávání krátkých molekul siRNA, přičemž všechny mají své výhody a nevýhody a výběr vhodné metody závisí na cílech daného experimentu.

Mezi metody *in vitro* přípravy siRNA patří chemická syntéza, *in vitro* transkripce a štěpení dlouhých dsRNA molekul pomocí RNasy III. Další metody jsou založeny na transfekci DNA do buněk, které se *in vivo* transkribují do funkčních siRNA molekul. Jedná se o expresi z siRNA/shRNA vektorů nebo siRNA expresních kazet.

#### Chemická syntéza siRNA

Chemická syntéza oligoribonukleotidů je preferovaný a nejčastěji používaný způsob přípravy siRNA pro krátkodobé experimenty na buněčných kulturách. Velkou výhodou chemicky syntetizovaných siRNA je velký výtěžek vysoce čisté siRNA a nenáročnost na pracovní úsilí uživatele, nevýhodou je vysoká finanční náročnost, snadná degradovatelnost a časově omezený účinek. Takto připravované siRNA jsou často používány k pilotním screeningovým studiím.

#### *In vitro* transkripce

siRNA mohou být připraveny také metodou *in vitro* transkripce (IVT) syntetických DNA oligonukleotidových templátů. Oproti chemické syntéze je tento přístup levnější a rychlejší, ale uživatelsky náročnější. Odlišný může být také výtěžek a kvalita získané siRNA, pro některé buněčné linie byla empiricky zjištěna vyšší toxicita při použití IVT produkovaných siRNA.

#### Štěpení dlouhé dsRNA pomocí RNasy III

Dlouhý dsRNA řetězec připravený *in vitro* transkripce a kódující 200–1000 nt oblast cílové mRNA je následně *in vitro* štěpen RNasou III nebo enzymem Dicer. Vzniká tak směs mnoha různých siRNA proti jednomu cílovému genu. Je to jediná z uvedených metod, která nevyžaduje návrh vhodné siRNA sekvence. Jedná se o metodu náročnou na uživatelskou zručnost a často při transfekci buněk touto směsí různých siRNA dochází k nechtěným vedlejším efektům (např. „off-target“ efekt – nespecifické tlumení sekvencně homologních genů).

#### shRNA expresní vektory

Protože v savcích buňkách neexistuje mechanismus amplifikace siRNA (neobsahují RNA-dependentní RNA polymerasu, RdRP), zajišťují transfekce buněčných kultur krátkými siRNA molekulami pouze krátkodobý účinek (3–7 dní). Pro dlouhodobě trvající experimenty byl vyvinut systém expresních plasmidů a virových vektorů schopných zajišťovat expresi siRNA v buňce po delší dobu, v některých případech i tvale. Expresní vektory obsahují oligonukleotid kódující tzv. krátkou vlásenkovou RNA (short hairpin RNA, shRNA), která je složena ze dvou 19–21 nt inverzních repetitiv oddělených několika (obvykle

3–9) nukleotidy. Po transfekci vektoru do buňky dojde *in vivo* transkripci k přepisu shRNA, z které po štěpení enzymem Dicer vzniká funkční siRNA molekula, která se začleňuje do soukolí RNA interference v buňce. Většina shRNA expresních vektorů je řízena promotorem pro RNA polymerasu III (např. lidské promotory U6, H1), některé obsahují promotor pro RNA polymerasu II (např. virové promotory SV40, CMV). Příprava expresních vektorů je poměrně časově náročná, avšak jejich výhody pro potřeby dlouhodobých studií jsou nesporné – exprese cílového genu je snížena po dobu několik týdnů, někdy i déle. Velkou výhodou je možnost vnesení selekčního markeru, který slouží k obohacení kultury o úspěšně transfekované buňky nesoucí příslušný vektor, což velice zvyšuje úspěšnost tlumení exprese genů u těžko transfekovatelných buněk. Komerčně dostupné jsou také různé adenovirové a retrovirové vektory pro expresi shRNA, produkující virové částice, jejichž míra infekce cílových buněk je výrazně vyšší než u klasických plasmidů. Hlavní nevýhodou expresních vektorů ve srovnání se syntetickými oligonukleotidy je jejich výrazně nižší účinnost transfekce z důvodu nutnosti dopravit vektor až do buněčného jádra, nikoliv pouze do cytoplasmy, jak je tomu u krátkých siRNA.

### 2.1.1. Faktory ovlivňující vnesení siRNA do cílových buněk

Za normálních podmínek je účinnost příjmu a exprese exogenní DNA v savčích buňkách velice nízká. To je způsobeno hydrofóbní lipidovou dvouvrstvou eukaryotní plasmatické membrány, která tvoří významnou bariéru pro vstup nabitých molekul do buňky. Pro řešení tohoto problému bylo vyvinuto několik typů transfekčních činidel. Díky těmto metodám se genové exprese v buněčných kulturách s použitím DNA a RNA transfekcí staly rutinní záležitostmi. V následujících odstavcích jsou jednotlivé parametry ovlivňující úspěšnost transfekce diskutovány podrobněji.

#### Typ transfekovaných buněk

Kvalita, typ a množství zvolených buněk mohou významně ovlivnit průběh experimentu. Konkrétní buněčná linie se volí podle typu studovaného biochemického procesu, nejvhodnější jsou adherentní transformované buňky, a to pro jejich dostupnost a lepší reprodukovatelnost zvolených experimentů. Existuje široká řada veřejně dostupných lidských, myších, potkaních a hmyzích transformovaných buněčných linií. Obecně platí, že zdravé a pravidelně pasážené buňky jsou snadněji transfekovatelné. Při dodržení stálých podmínek kultivací a experimentů se minimalizuje riziko nestability kontinuálních buněčných linií a změn expresních profilů buněk způsobených stresem vyvolaným častými změnami podmínek (teplota, pH, množství séra, složení kulturačního média, obsah antibiotik, atd). Důležitým parametrem je konfluencí buněk v době transfekce. Většinou je doporučována 30–70% konfluencí v závislosti na zvolené metodě transfekce, přičemž jak nižší, tak vyšší procento konfluencí může výrazně snížit úspěšnost transfekce.

#### Kvalita a kvantita siRNA

Kvalita siRNA může významně ovlivnit RNAi experimenty. siRNA by měla být zbavena všech kontaminujících sloučenin jako pozůstatků z příprav a izolací, zejména proteinů, solí a ethanolu. Dále je nutné se vyvarovat kontaminace dsRNA delší než 30 bp, která může spustit nespecifickou interferenovou odpověď, cytotoxicitu a degradaci RNA. Optimální množství siRNA závisí na typu transfekovaných buněk, cílovém genu a povaze transfekčního činidla. Obvyklá koncentrace se pohybuje v rozmezí 1 až 200 nM pro siRNA a 50 ng až několik mg pro připravené expresní vektory (v závislosti na objemu transfekční směsi).

#### Typ transfekční metody

Obecně existují dva typy transfekčních metod, použití transfekčního činidla nebo elektroporace. Transfekční činidla umožňují vstup nabitým nukleovým kyselinám do buněk maskováním jejich náboje. Směsi polyaminů bývají pro některé typy buněk účinnější, obecně jsou ale rozšířenější tzv. lipofekční činidla, která obsahují lipidy s pozitivně nabitými hlavičkami, které obalí záporně nabitě nukleové kyseliny a usnadní jim prostup cytoplasmatickou membránou mechanismem endocytózy (tento postup bývá často nazýván lipofekce). Elektroporace umožňuje prostup nukleových kyselin do cytoplasmy pomocí mikroskopických pórů vzniklých v důsledku krátkodobého (ms) vystavení buněk elektrickému pulsu.

#### Podmínky experimentu

Všechny výše uvedené parametry je potřeba experimentálně optimalizovat pro potřeby konkrétního výzkumu. Důležité je zaměřit se především na vhodný objem transfekčního činidla (pokud je příliš nízký, transfekce je neúčinná, pokud je příliš vysoký, činidlo působí cytotoxicky), na správný poměr vnášené siRNA (DNA) k objemu transfekčního činidla, dále na přítomnosti / nepřítomnosti séra v transfekčním médiu, na dobu působení transfekční směsi k dosažení nejnižší exprese (přibližně 2–4 dny), popř. na optimalizaci parametrů elektroporace.

### 2.1.2. Analýza efektu RNA interference

Míru utlumení exprese studovaného genu lze detegovat a kvantifikovat na úrovni transkribované mRNA (northern blot, qRT-PCR) nebo na úrovni proteinů (western blot, imunofluorescence). Nejvhodnější je sledovat pokles množství jak mRNA, tak také cílového proteinu. V ideálním případě pokles hladiny mRNA koreluje s poklesem množství sledovaného proteinu. V případě snížení hladiny mRNA sledovaného genu, avšak stejného množství proteinu, je pravděpodobným vysvětlením pomalý obrát (turn-over) proteinu v buňce, v opačném případě, kdy je hladina mRNA stejná, ale množství proteinu pokleslo, došlo zřejmě k působení vnesené siRNA na represí translace mechanismem miRNA. Důležitým efektem RNAi je změna fenotypového projevu buňky (morfologie, změna buněčného cyklu, apoptóza, proliferace, změny v metabolismu). Během RNAi experimentů nesmí být

opomenuta důležitost sledování pozitivních a negativních kontrol, které vypovídají o správnosti celého procesu.

Aplikace metod RNA interference na savčí buňky významně urychlila výzkum v oblasti funkční genomiky i objevů léků. S experimentálním důkazem úspěšného utlumení exprese cílových genů se nabízel využití RNA interference v terapeutickém procesu. Bylo však problém přenést výsledky získané *in vitro* na buněčných modelech do tak komplikovaného mnohobuněčného systému, jako je lidský organismus. Nejvíce problematický se projevil způsob vnášení siRNA do cílových buněk *in vivo*. I přes počáteční problémy se však podařilo inhibovat v myších játrech expresi proteinů viru hepatitidy C (cit.<sup>45</sup>). V humánní medicíně se dnes vývojem terapií založených na RNA interference procesech zabývá mnoho biotechnologických společností.

*Tato publikace vznikla za finanční podpory grantů IAA500110805 a MŠMT 6046137305.*

#### LITERATURA

- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R.: *Plant Cell* 2, 279 (1990).
- van der Krol A., Mur L., Beld M., Mol J., Stuitje A.: *Plant Cell* 2, 291 (1990).
- Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C.: *Nature* 391, 744 (1998).
- Montgomery M., Xu S., Fire A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 15502 (1998).
- Williams B.: *Oncogene* 18, 6112 (1999).
- Hammond S., Caudy A., Hannon G.: *Nat. Rev. Genet.* 2, 110 (2001).
- Štruncová S., Borská R., Kusenda B., Mejstřík P., Dvořáková D., Mayer J., Pospíšilová Š.: *Biologické listy* 70, 231 (2005).
- Elbashir S., Lendeckel W., Tuschl T.: *Genes Dev.* 15, 188 (2001).
- Blaszczyk J., Tropea J., Routzahn K., Waugh D., Court D., Ji X.: *Structure* 9, 1225 (2001).
- Rivas F., Tolia N., Song J., Aragon J., Liu J., Hannon G., Joshua-Tor L.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 12, 340 (2005).
- Filipowicz W.: *Cell* 122, 17 (2005).
- Tomari Y., Zamore P.: *Genes Dev.* 19, 517 (2005).
- Zamore P., Haley B.: *Science* 309, 1519 (2005).
- Bitko V., Barik S.: *BMC Microbiol.* 1, 34 (2001).
- Caplen N., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9742 (2001).
- Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T.: *Science* 294, 853 (2001).
- Denli A., Tops B., Plasterk R., Ketting R., Hannon G.: *Nature* 432, 231 (2004).
- Gregory R., Yan K., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar T.: *Nature* 432, 235 (2004).
- Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V.: *Nature* 425, 415 (2003).
- Lund E., Guttinger S., Calado A., Dahlberg J., Kutay U.: *Science* 303, 95 (2004).
- Xu P., Vernoooy S., Guo M., Hay B.: *Trends Genet.* 20, 617 (2004).
- Ke X., Liu C., Liu D., Liang C.: *Curr. Opin. Chem. Biol.* 7, 516 (2003).
- Mallory A., Vaucheret H.: *Curr. Opin. Plant. Biol.* 7, 120 (2004).
- Pollard T., Earnshaw W.: *Cell Biology* 210 (2002).
- Akhtar A.: *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13, 161 (2003).
- Jenuwein T., Allis C.: *Science* 293, 1074 (2001).
- Bird A.: *Genes Dev.* 16, 6 (2002).
- Richards E., Elgin S.: *Cell* 108, 489 (2002).
- Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T.: *Nature* 410, 116 (2001).
- Bannister A., Zegerman P., Partridge J., Miska E., Thomas J., Allshire R., Kouzarides T.: *Nature* 410, 120 (2001).
- Andersen A., Panning B.: *Curr. Opin. Cell Biol.* 15, 281 (2003).
- Klenov M., Gvozdev V.: *Biochemistry* 70, 1187 (2005).
- Schramke V., Allshire R.: *Science* 301, 1069 (2003).
- Kawasaki H., Taira K.: *Nature* 431, 211 (2004).
- Morris K., Chan S., Jacobsen S., Looney D.: *Science* 305, 1289 (2004).
- Verdel A., Jia S., Gerber S., Sugiyama T., Gygi S., Grewal S., Moazed D.: *Science* 303, 672 (2004).
- Xie Z., Johansen L., Gustafson A., Kasschau K., Lellis A., Zilberman D., Jacobsen S., Carrington J.: *PLoS Biol.* 2, E104 (2004).
- Lankenau S., Corces V., Lankenau D.: *Mol. Cell. Biol.* 14, 1764 (1994).
- Sijen T., Plasterk R.: *Nature* 426, 310 (2003).
- Gvozdev V.: *Genetica* 39, 151 (2003).
- Elbashir S., Harbort J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K., Tuschl T.: *Nature* 411, 494 (2001).
- Schwarz D., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P.: *Cell* 115, 199 (2003).
- Manche L., Green S., Schmedt C., Mathews M.: *Mol. Cell. Biol.* 12, 5238 (1992).
- Minks M., West D., Benveniste S., Baglioni C.: *J. Biol. Chem.* 254, 10180 (1979).
- McCaffrey A., Meuse L., Pham T., Conklin D.: *Nature* 418, 38 (2002).

**K. Kontrová, V. Škop, J. Sajdok, and J. Zídková**  
(*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague*): **RNA Interference and Practical Aspects of Its Application**

RNA interference (RNAi) is a natural mechanism that inhibits gene expression at the stage of translation or by blocking the transcription of specific genes. RNAi targets include RNA from viruses and transposons which could contribute to innate immune response. RNAi plays a key

role in regulating genom development and its maintenance. Small interfering RNA (siRNA) and micro RNA (miRNA) are a key to the RNAi process. Their nucleotide sequences are complementary to the target mRNA strand. The selective effect of RNAi on gene expression makes it a valuable research tool, both in cell culture and in living organisms, because synthetic dsRNA introduced into cells can induce suppression of specific genes of interest. RNAi

may also be used for large-scale screenings that systematically silence expression of genes in the cell, which can help identify the components necessary for a particular cell process. To develop an effective gene-silencing procedure, several approaches to the long-term introduction of RNA into cells have been tested. RNA silencing seems to be a promising tool in biotechnology, pharmacology and medicine.