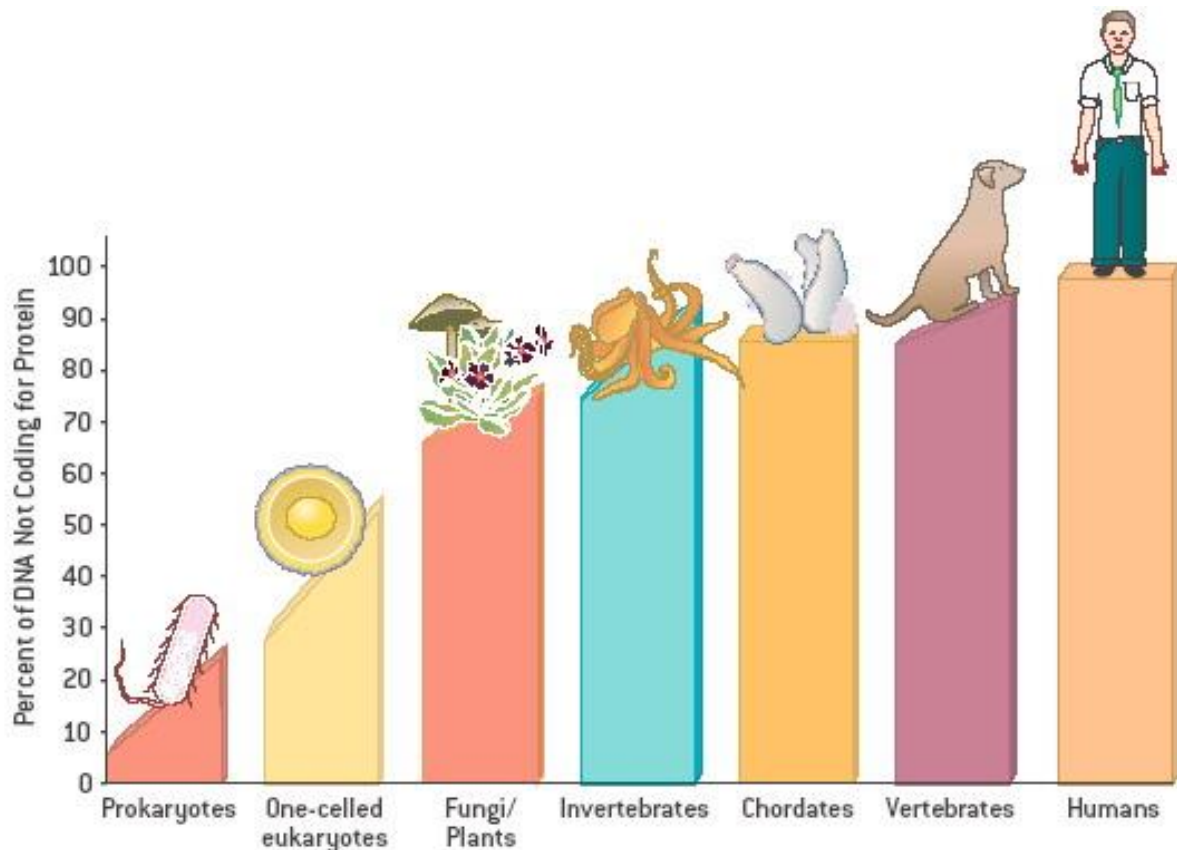


Primjena molekula siRNA u funkcionalnoj genomici i kao potencijalni terapeutici

Dr. sc. Višnja Bačun-Družina, izv. prof.

Molekule DNA koja ne kodiraju proteine



NONPROTEIN-CODING SEQUENCES make up only a small fraction of the DNA of prokaryotes. Among eukaryotes, as their complexity increases, generally so, too, does the proportion of their DNA that does not code for protein. The noncoding sequences have been considered junk, but perhaps it actually helps to explain organisms' complexity.

Slika 1. Prikaz udjela nekodirajućih molekula DNA u prokariota i eukariota

Nekodirajuće RNA (ncRNA)

Funkcionalne molekule RNA koje se ne prevode u proteine.

Sinonimi: non-protein-coding RNA (npcRNA), non-messenger RNA (nmRNA) and functional RNA (fRNA).

Vrlo raznolike: tRNA i rRNA, te snoRNA (mala nukleolarna RNA provodi kemijske modifikacije drugih RNA, uglavnom rRNA, tRNA i malih nuklearnih RNA), snRNA (uvijek poveže sa specifičnim proteinima)

u malim nuklearnim ribonukloproteinima, sazrijevanje pre-mRNA, u spajnosomu), mikroRNA (djeluje na transkripcijsku i post-transkripcijsku regulaciju ekspresije gena), siRNA (najznačajnija u interferenciji RNA), exRNA (izvanstanična RNA u tjelesnim tekućinama kao što su venska krv, slina, majčino mlijeko, urin i dr., zadužene za međustaničnu komunikaciju i staničnu regulaciju), piRNA (Piwi interakcija RNA, oblik RNA-proteinski kompleksa u interakciji je Piwi proteinom, nađen u Drosophila, povezani s stišavanjem epigenetskih i post-transkripcijski gena retrotranspozona i drugih genetskih elementa spolnih stanica) i dr.

siRNA

Molekule koje specifično utišavaju ekspresiju gena su snažno istraživačko oruđe, a siRNA (eng. "small interfering") molekule su jedne od najnovijih sredstava koji „utišavaju gen" u specifičnoj sekvenciji (eng. "sequence-specific gene-silencing agents");

Danas kada su genomi mnogih modelnih organizama sekvencionirani, pristupi koji uključuju nukleinske kiseline koje djeluju na ekspresiju gena u specifičnoj sekvenciji koriste se za istraživanje funkcije gena i kao potencijalni terapeutici.

Utišavanje produkata gena

Stvoreno je nekoliko tipova molekula koje inhibiraju produkte ekspresije gena prepoznavanjem sekvencije u mRNA

- Tri glavne molekule (eng. "nucleic-acid-based gene silencing") su : kemijski modificirane antisense oligodeoksiribonukleinske kiseline (ODNs); ribozimi (RNA enzimi) i siRNA (eng. "small interfering")

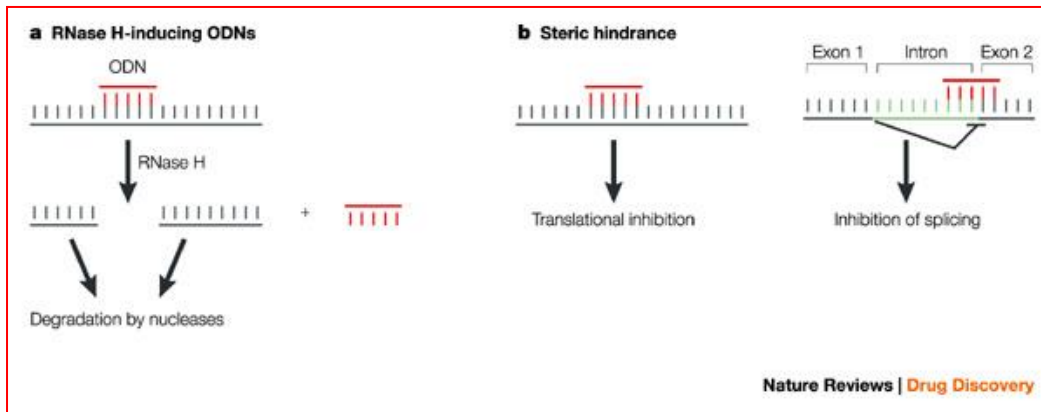
- Manje se koriste antisense molekule: peptid nukleinske kiseline; DNAzimi; te nedavno stvorene 5'kraj mutirane U1 male nuklearne RNA

Mehanizmi „utišavanja gena": oligodeoksiribonukleinske kiseline (ODNs)

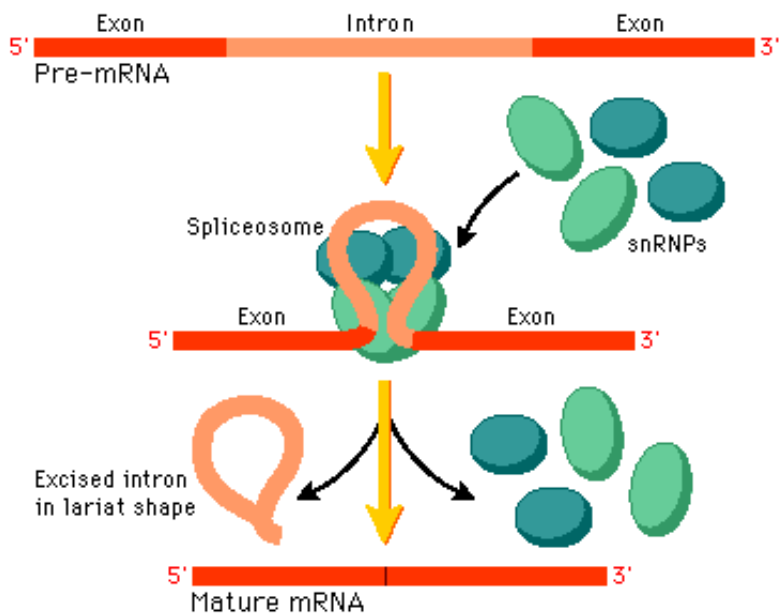
ODN unose u stanicu mikromanipulacijom:

a) sadrže oko 20 deoksiribonukleotida te hibridizira s pre-mRNA ili mRNA, čineći tako substrat za RNazu H, koja degradira RNA lanac hibrida DNA-RNA

b) Modificiran tako da steričkim zaklanjanjem inhibira translaciju mRNA ili inhibira splicing pre-mRNA



Slika 2. Shematski prikaz djelovanja oligodeoksiribonukleinske kiseline (ODNs)



Slika 3. Shematski prikaz uobičajnog uklanjanja introna iz pre-mRNA

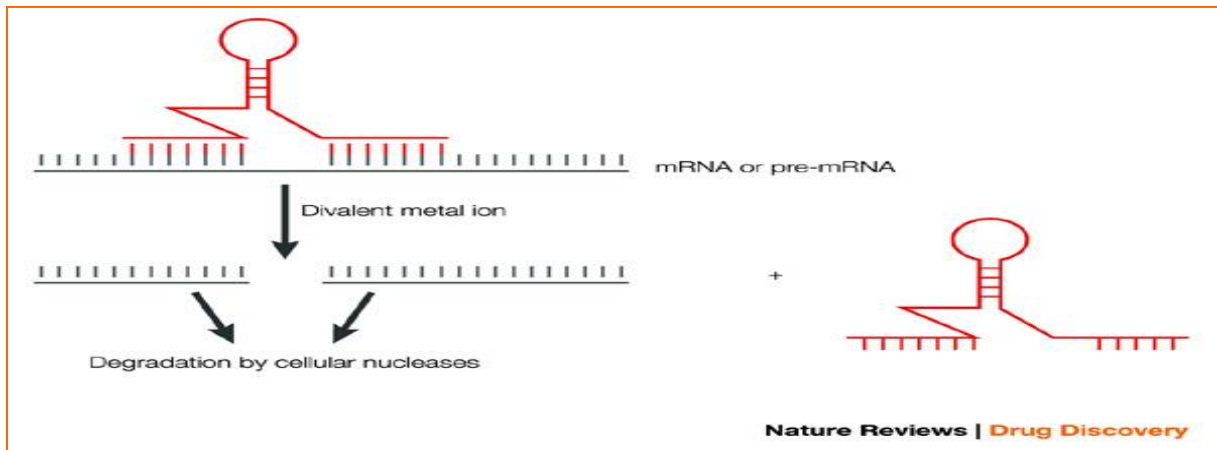
Mehanizam djelovanja ribozima (RNA enzimi)

Postoji nekoliko različitih klasa ribozima tzv. molekularne škare koje režu molekule RNA; najviše proučavani "hammerhead" ribozimi

"Hammerhead" ribozimi su jednolančane antisense molekule RNA koje kada hibridiziraju s ciljanom mRNA ili pre-mRNA (Prekursor mRNA) formiraju specifičnu sekundarnu strukturu

Katalitički važna mjesta se nalaze bočno od ciljanih komplementarnih sekvencija, koje okružuju RNA mjesto rezanja

Degradiranje mRNA ribozimima zahtjeva dvovalentne katione, kao npr. Mg, a isto tako ovisi i o strukturi i dostupnosti ciljane mRNA



Slika 4. Shematski prikaz djelovanja ribozima

siRNA (small interfering RNA)

Dvolančana RNA može nastati endogeno unutar stanice kao što je slučaj s microRNA ili transkripcijom dugačkih sense i antisense RNA

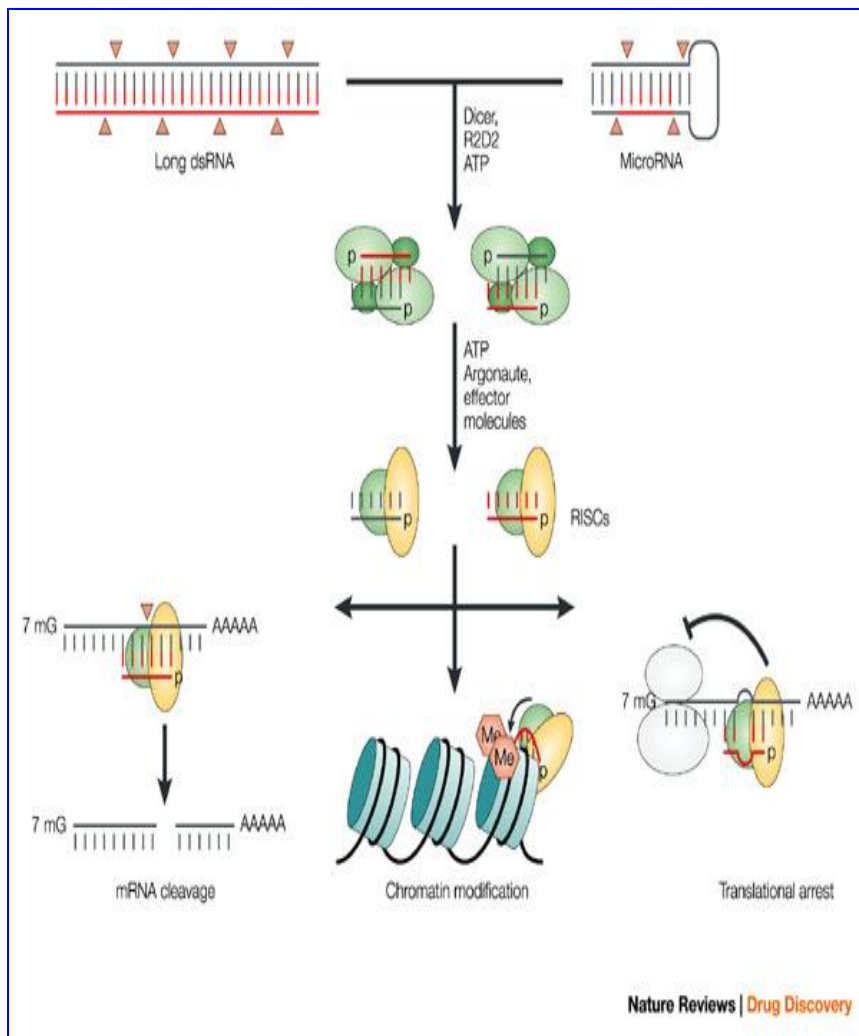
Alternativno u stanicu ulazi tijekom infekcije dRNA virusa ili eksperimentalnom manipulacijom

Dugačka dRNA se tada procesira RNasa-III-tipenzimom nazvanim Dicer

Dicer izrezuje dugačku RNA u 21-28 nukleotid siRNA duplekse

Komponente RNAi mašinerije prepoznaju siRNA duplekse, predaju jedan siRNA lanac proteinskom kompleksu što dovodi do nastajanja RNA-induciranog silencing kompleksa (RISC)

Različiti tipovi RISCa uzrokuju degradaciju mRNA, modifikaciju kromatina ili inhibiciju translacije.



Slika 5. Shematski prikaz molekula siRNA

Uporaba siRNA

siRNA može biti stvorena sintetički ili eksprimirana s vektora;

Za razliku od oligodeksiribonukleinske kiselina (ODNa) i ribozima, siRNA ne može efikasno ciljati pre-mRNA za degradaciju (u stanica sisavaca);

siRNA slične nekodirajućim RNA molekulama, a to su microRNA koje se u stanicama eukariota prirodno djeluju tijekom regulacije sinteze proteina.

Usporedba korištenja oligonukleinskih kiselina

Efikasnost „utišavanja gena“ ovisi o koncentraciji utišavajućeg reagensa, staničnom tipu, odabiru ciljanog mjesta, kemijskim modifikacijama te vremenu u kojem su podaci analizirani

RNA-binding proteini i sekundarna ili tercijalna struktura unutar mRNA interferiraju s hibridizacijom oligodeoksiribonukleinske kiseline (ODN) s ciljnom mRNA

siRNA je daleko efikasnija i trajnija od različitih tipova ODNa, ribozima i DNAzima

Budući da ODNi i ribozimi hibridiziraju s mRNA bez pomoći određenih proteina potrebna je njihova velika koncentracija kako bi došlo do utišavanja gena

Sva 3 pristupa imaju i potencijal za nespecifične efekte na produkte ekspresije gena

***In vivo* dostavljanje siRNA**

oligodeoksiribonukleinske kiseline (ODN) i ribozimi su uspješno dostavljani *in vivo* različitim metodama, od kojih je intravenozna metoda najpopularnija u kliničkim istraživanjima

Uspješno dostavljanje siRNA, pomoću siRNA-producirajućih plazmida ili virusa vrši se elektroporacijom, te lokalnim i sistemskim injekcijskim procedurama

Razvitak siRNA virusa puno obećava kao alternativan način genske terapije za bolesti u ljudi

Rekombinantni “adenoassociated” virus posreduje u dostavi i dugotrajnoj ekspresiji transgena (siRNA) u djeljivim i ne-djeljivim stanicama sisavaca

Injekcija takvog virusa u mozak miša rezultira efektivnim utišavanjem gena blizu mjesta injektiranja do 7 tjedana nakon infekcije (slično se postiže i s adenovirusom)

***In vivo* dostavljanje siRNA**

siRNA lentivirusi koji transduciraju stanice, izbjegavaju transkripcijsko utišavanje tijekom razvoja te se koriste za dostavljanje siRNA u embrionalne matične stanice za kreiranje “knockout” miša

Smatra se da ne postoji niti jedan razlog protiv korištenja siRNA-proizvedenih virusnih vektora u genskoj terapiji, koristeći strategiju sličnu onoj koja se koristi prilikom dostave ribozima u liječenju HIV-a nalazi se u 1. i 2. fazi kliničkih ispitivanja

Pokazalo se da siRNA uspješno cilja HIV u kulturama tkiva

Kako bi se siRNA mogla koristiti u terapijske svrhe potrebno je osmisliti načine sigurnog unosa takvih molekula *in vivo*

Pretraživanje genoma

siRNA je postala važan pristup za funkcionalnu genomiku u kulturi tkiva sisavaca iz nekoliko razloga: visoka efikasnost utišavanja gena pri niskim koncentracijama siRNA; lakoća nalaženja dostupnih ciljnih mjesta; visoka specifičnost; dobra stabilnost i niska cijena sinteze siRNA

Nekoliko large-scale RNAi pretraživanja bilo je primijenjeno u kulturama tkiva sisavaca, te su otkriveni geni uključeni u apoptozu, signalizaciju, regulaciju proteinske stabilnosti i odgovor na oštećenja UV zračenjem

Potencijal pretraživanja genoma (genome-wide screening) sa siRNA u sisavaca za identificiranje novih terapijskih meta je limitiran na one kulture tkiva koje postoje, koje se lako transfektiraju, brzo rastu i prijanjaju za podlogu

RNAi se pokazala djelotvorna pri potvrđivanju potencijalnih meta za lijekove koje su identificirane pomoću cDNA "microarrays"

Terapeutici bazirani na siRNA

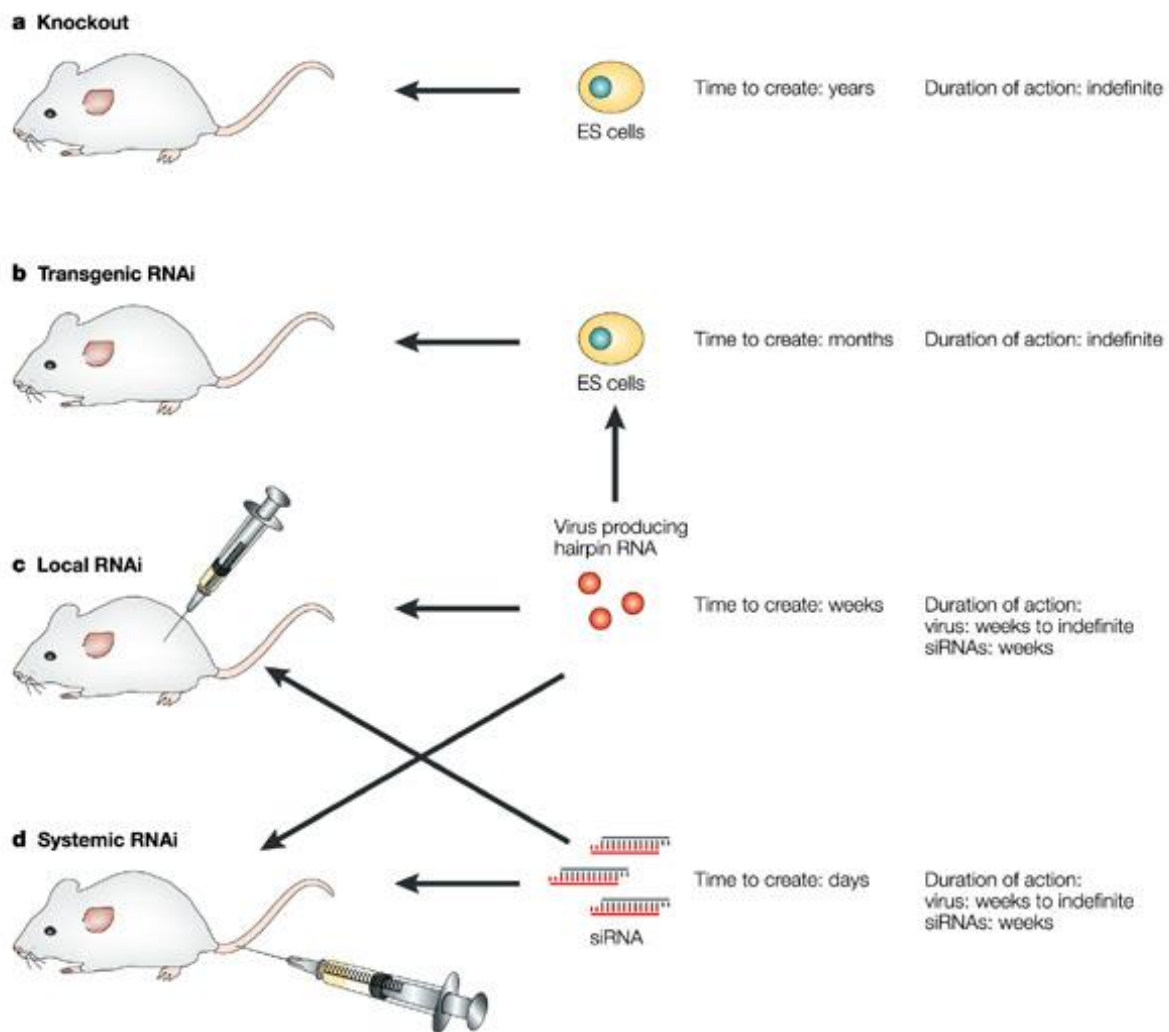
Utišavajuće molekule moraju biti stabilne u cirkulatornom sustavu kao i u tkivima, trebaju vezati krvne proteine kako bi se spriječilo gubitak molekule tijekom ekskrecije

siRNA duplexi su zaštićeni od "single-strand-specific" endonukleaza, pa su time stabilnije od oligodeoksiribonukleinskih kiselina (ODN) i ribozima u serumu

Nemodificirana siRNA nema dovoljni afinitet za krvne proteine, stoga i siRNA mora biti modificirana ukoliko se za terapijske svrhe ne koristi siRNA producirajući virus

Modifikacija siRNA može interferirati s ugradnjom siRNA u RISC

In vivo „utišavanje gena” sisavaca



Nature Reviews | Drug Discovery

Slika 4. Shematski prikaz *in vivo* „utišavanje gena” sisavaca (mouse and rat gene function analysis, vs. classical method of homologous recombination)

Klinička primijena mikroRNA molekula

Tablica 1. Primjena *in vivo* različitih miRNA (F1000Research 2013, 2:136)

