

7. Interferující RNA

7.1. Úvodní slovo

V roce 1996 byl objeven endogenní mechanismus regulace genové exprese na bázi **interferenční RNA (RNAi)**. Existují dva základní typy těchto malých RNA, tzv. **mikroRNA (miRNA)** a **malé interferující RNA (siRNA)**. MiRNA jsou molekuly RNA o velikosti 20-22 nukleotidů. Jedná se o produkty regulačních genů, které nekódují žádný protein. Na regulaci genové exprese se podílejí na posttranskripční úrovni, kdy se svým 5' koncem („tzv. seed region“) vážou na základě komplementarity ke 3' UTR (nepřekládaná oblast, untranslated region) oblasti cílové mRNA a inhibují tak její translaci nebo způsobují její degradaci. Molekuly miRNA hrají rozhodující roli prakticky ve všech oblastech života eukaryotické buňky, a to v buněčné proliferaci, diferenciaci, embryogenezi, v řízení buněčného cyklu a programované buněčné smrti, atd. Předpokládá se, že regulují více než třetinu genů lidského genomu, ale s rostoucími znalostmi podíl regulovaných genů roste.

V rostlinách byl účinek dvoušroubovicové RNA, nazývané „antisense mRNA“ (antimediatorová RNA), na redukci genové exprese známý již mnoho let. Teprve popsání fenoménu RNAi u hlístice *Caenorhabditis elegans* roku 1998 ovšem znamenalo skutečnou revoluci v molekulární biologii. V roce 2006 získali Andrew Z. Fire a Craig C. Mello za tento objev Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství.

První miRNA, označená lin-4 byla objevena už v roce 1993 u hlístice *Caenorhabditis elegans* [6]. Lin-4 se specificky váže na 3' UTR mRNA lin-14, která kóduje jaderný protein. Inhibice translace této mRNA umožňuje přechod z prvního do druhého larválního stádia. O sedm let později, v roce 2000, byla objevena druhá miRNA, let-7, která kontroluje přechod z posledního larválního stádia u *C. elegans* do stádia dospělého jedince. Jejím cílem je 3' UTR mRNA lin-41 a hbl-1. Pro správný vývoj jsou důležité mechanismy miRNA let-7 i miRNA lin-41, protože mutace v let-7 a delece v 3' UTR oblasti lin-41 způsobují sníženou expresi lin-41. Let-7 je tvořena více molekulami miRNA, přičemž některé z nich už byly u *C. elegans* blíže identifikovány a funkčně analyzovány; ty co již byly identifikovány, se dnes nově značí miR-48, miR-84 a miR-241.

Let-7 je evolučně konzervativní, nachází se jak u obratlovců, tak i u kroužkovců, členovců, polostrunatců a měkkýšů. U rostlin a mikroorganismů detekována nebyla. Přesto její objevení spustilo revoluci v nalézání nových tříd miRNA. U člověka se nachází v různých expresních stádiích ve tkáních mozku, srdce, ledvin, plic, žaludku a thymu. Současné studie uvádějí, že let-7 je supresorem nádorů.

Termín miRNA byl poprvé použit v časopise *Science* v roce 2001 v článku Lagos-Quintana et al. 2001, kteří dokázali přítomnost miRNA u mnoha organismů.

7.2. Nomenklatura interferujících RNA

Intenzivní výzkum interferujících RNAi v posledních letech si vynutil volbu jednotného a jedinečného označování a vytvoření databáze existujících interferujících RNAi. Příkladem takové, mezinárodně uznávané, databáze je <http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>. V databázích jsou zralé interferující RNA označovány „miR“. Pro prekurzory těchto molekul se používá zkratka „mir“. Interferující RNAi, které jsou charakteristické pro určitý druh organismu, jsou označeny 3–4 písmennými prefixy. Označení „hsa-miR-101“ a „mmu-miR-101“ pak znamenají totožnou mikroRNA

lišící se pouze svým druhovým původem- „hsa“ u Homo sapiens a „mmu“ je molekula původem z *Mus musculus*. Nově identifikovaným miRNA jsou na základě podobnosti s již existujícími sekvencemi přiřazována pořadová čísla. To znamená, že pokud by byla v současné době poslední identifikovaná miRNA v *Drosophilla melanogaster* miR-318, tak další ponese po svém objevu označení miR-319.

Jelikož jedna miRNA může být kódována více geny, bylo nutné pomocí dalších numerických sufixů odlišit sekvencně identické miRNA, které pochází z různých oblastí genomu. Označení mir-6-1 a mir-6-2 u *Drosophilla melanogaster* tudíž znamená identické miRNA, které pochází z různých lokusů (8).

Pomocí sufixů „3p“ a „5p“ lze rozeznat, zda maturovaná miRNA pochází z 3' konce nebo 5' konce prekurzorové molekuly (prekurzoru). Písmennými sufixy jsou označovány miRNA, které se v sekvencích liší pouze 1 nebo 2 nukleotidy, např. miR-181a, miR-181b.

7.3. Biogeneze RNAi

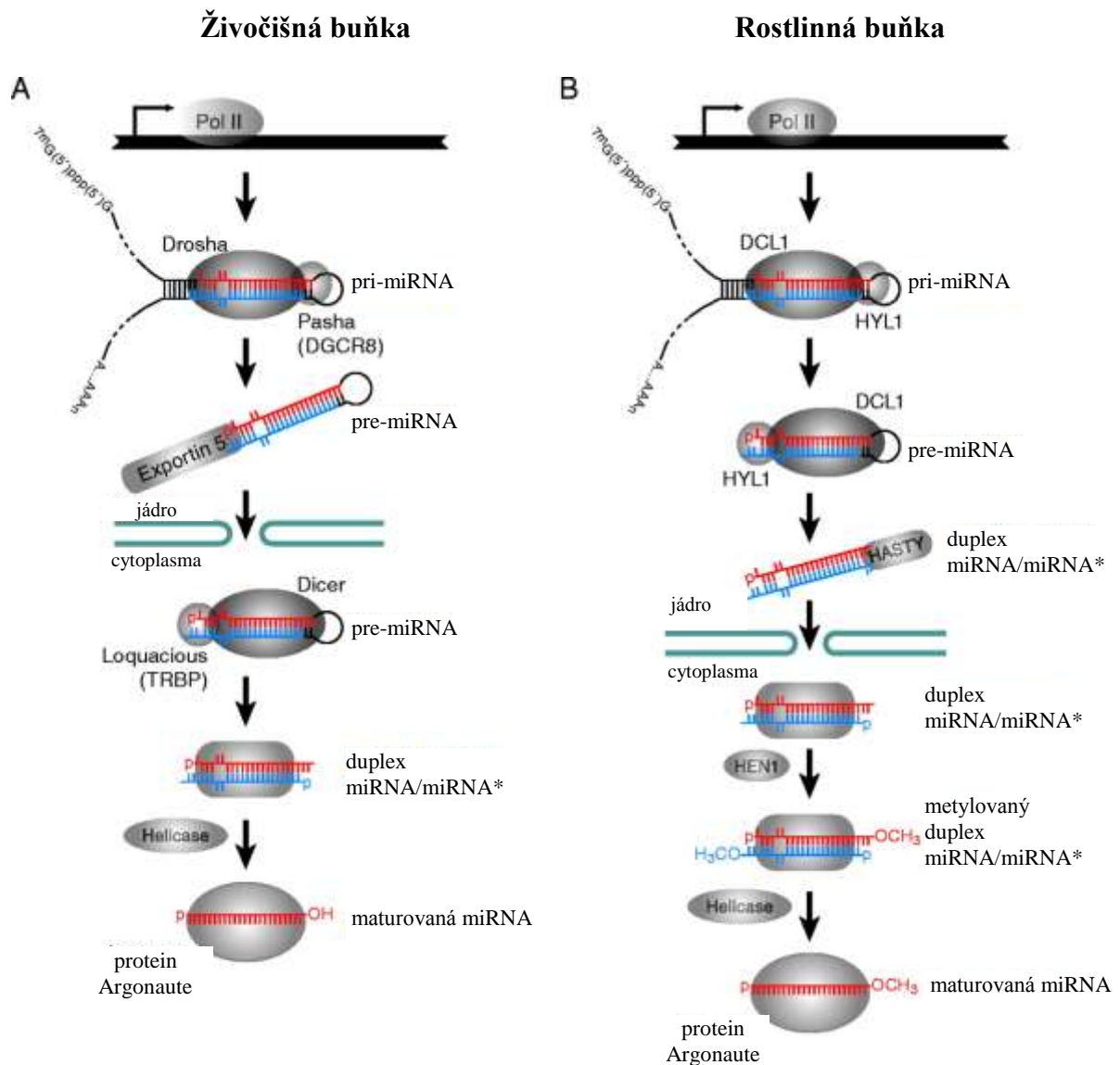
Molekuly miRNA vznikají složitou kaskádou z delšího prekurzoru jednořetězcové molekuly, který vytváří vlásenku se smyčkou (Obr. 7.1 a 7.2). Přitom obrácené repetice, které jsou základem vlásenky, nejsou úplně komplementární.

Geny pro miRNA jsou přepisovány RNA polymerázou II nebo RNA polymerázou III do primárních transkriptů tzv. pri-miRNA, které jsou dlouhé přibližně 500-3000 nukleotidů. Pri-miRNA je na svém 3'konci polyadenylována a na 5'konci obsahuje čepičku. V případě, že je gen přepisován RNA polymerázou III, obsahuje pri-miRNA repetitivní sekvenci Alu. Pri-miRNA je komplexem Drosha-DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*, u *Drosophily* a *C. elegans* se nazývá Pasha), sestřižena do struktury vlásenky o délce 60-70 nukleotidů označovanou jako prekurzorová miRNA (*precursor-miRNA* = *pre-miRNA*). Ta je transportována přes jaderné póry z jádra do cytoplazmy pomocí transportního receptoru exportinu-5. Transport je spřažen s Ran/GTPázou. RNA endonukleáza typu III nazývaná *Dicer* ve spolupráci s transaktivním na RNA se vázajícím proteinem (*trans-activator RNA binding protein*, TRBP) štěpí *pre-miRNA* na krátkou dsRNA. Působením helikázy dochází k oddělení obou řetězců a k inkorporaci zralé molekuly miRNA do komplexu zvaného „**RNA indukovaný uspávací komplex**“ („RNA-induced silencing complex“, RISC). Nejdůležitějšími složkami tohoto komplexu jsou proteiny rodiny Argonaute. Jeden z členů této rodiny, protein Argonaute 2, má katalytickou doménu, která štěpí jeden z řetězců dsRNA, což vede k funkční destrukci rozštěpeného řetězce. Další zástupci této rodiny katalytickou doménu nemají, ale podílejí se na inhibici procesu translace, pravděpodobně její první fáze, tzv. iniciace.

Molekuly siRNA naproti tomu vznikají štěpením prekurzorové dvouřetězcové RNA o původní délce až několik tisíc bp RNázou III nazvanou *Dicer*. Štěpení probíhá podobně jako u miRNA v komplexu RISC. Dvouřetězcová RNA v normálním procesu exprese genetické informace nevzniká, ale často bývá meziproduktem při replikaci virů. Všechny eukaryotické buňky tudíž na přítomnost dvouřetězcové RNA reagují obrannými mechanismy. Předpokládá se, že primární funkcí RNA interference u rostlin a bezobratlých je obrana proti aktivitě virů, ale také transposonů.

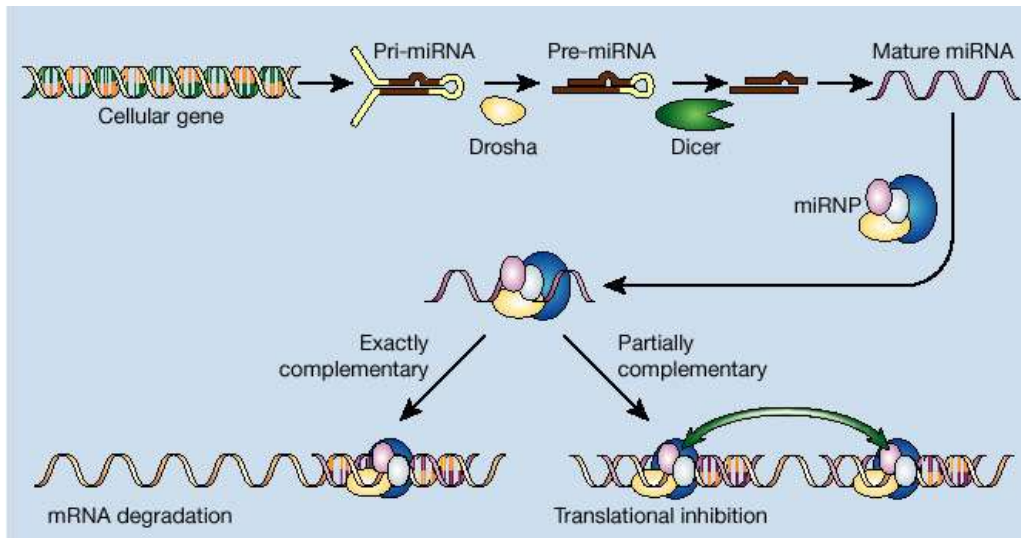
Porovnání mechanismů biogeneze je shrnuto na obr. 7.2.

Obr. 7.1: Mechanismus vzniku miRNA u živočišné a rostlinné buňky (zkratky označují zúčastněné enzymy)

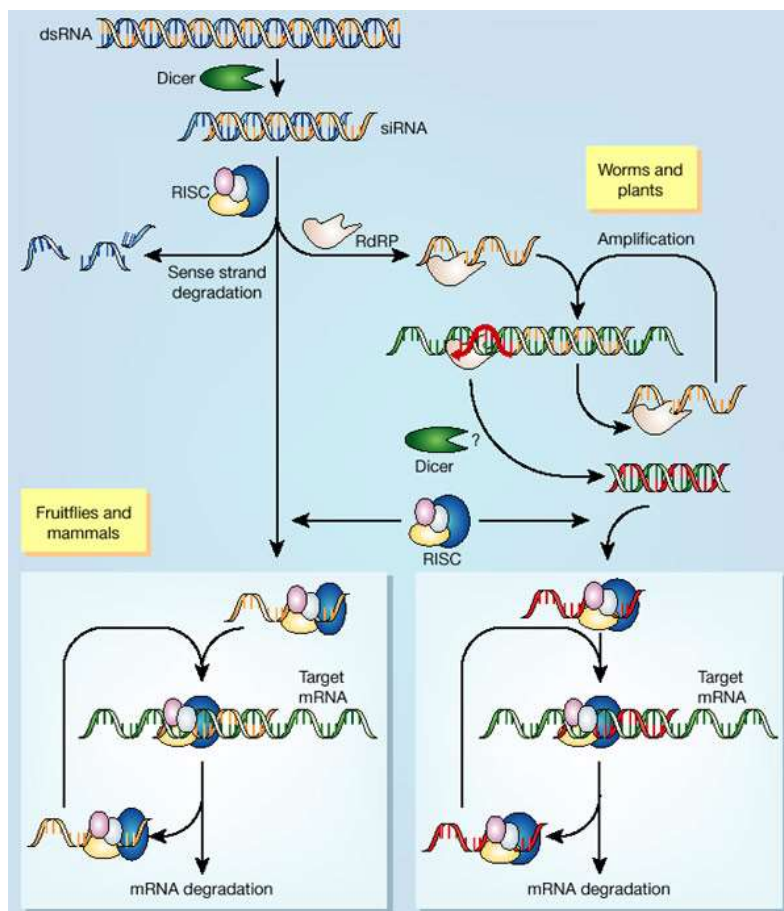


Obr. 7.2: Biogeneze miRNA a siRNA, převzato z Novina a Sharp (2004).

A) Biogeneze miRNA



B) Biogeneze siRNA



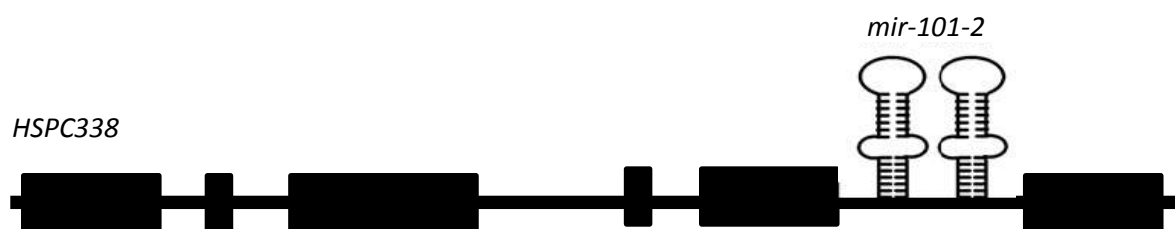
7.4. Geny kódující miRNA

Odhaduje se, že geny pro miRNA představují u člověka přibližně 2-3 % všech genů. Předpokládá se, že tyto malé RNA regulují více než třetinu lidského genomu. U člověka jsou miRNA geny lokalizovány na všech chromozomech, kromě chromozomu Y, a v genomu nejsou distribuovány náhodně. Velká část těchto genů se nachází v tzv. fragilních oblastech, což jsou místa, kde dochází preferenčně k translokacím, výměně sesterských chromatid, delecím, amplifikacím či integraci plazmidové DNA. Přibližně polovina ze všech známých genů pro miRNA se u lidí nachází ve shlcích a tyto shluky jsou exprimovány jako polycistronní transkripční jednotky, tedy transkripční jednotky prokaryotického typu. Shluk může být tvořen dvěma až třemi geny, přičemž nejrozsáhlejší doposud popsany je tvořen sedmi geny. Ty geny, které nejsou součástí shluků, jsou přepisovány ve formě monocistronních primárních transkriptů.

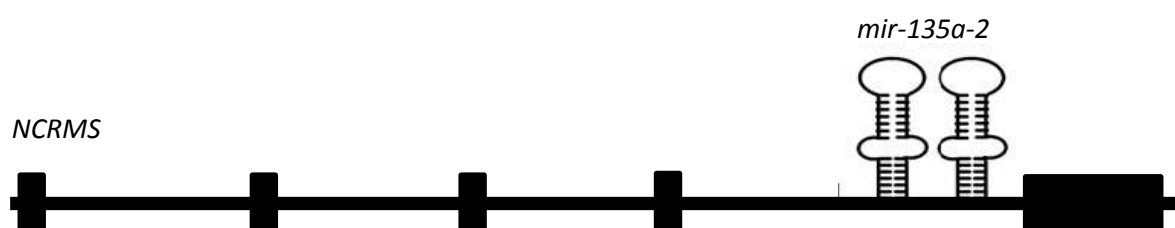
Původně se vědci domnívali, že převážné množství genů pro miRNA je umístěno v intergenových oblastech. Současné analýzy ukázaly, že majoritní část, asi 70 % savčích genů pro miRNA, je lokalizováno v transkripčních jednotkách. Geny se nachází v exonech nebo v intronech a mohou být rozděleny v závislosti na jejich lokalizaci v genomu do čtyř kategorií, viz obr. 7.3.

Obr. 7.3: Organizace genomu a struktura miRNA genů, podle Wahid, et al. (2010).

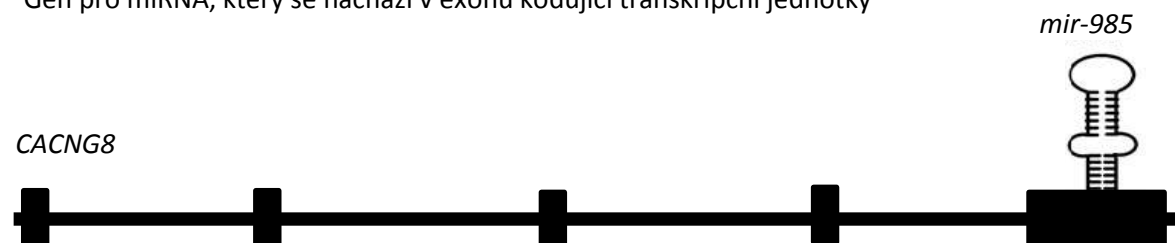
Gen pro miRNA, který se nachází v intronu kódující transkripční jednotky



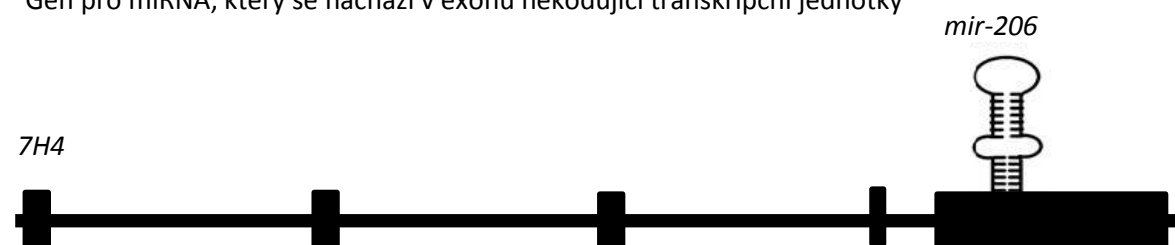
Gen pro miRNA, který se nachází v nekódující transkripční jednotce



Gen pro miRNA, který se nachází v exonu kódující transkripční jednotky



Gen pro miRNA, který se nachází v exonu nekódující transkripční jednotky



7.5. Mechanismy regulace genové exprese prostřednictvím miRNA a siRNA

Funkční molekuly miRNA a siRNA inhibují expresi genů různými mechanismy. miRNA se váže k cílovým transkriptům v nepřekládané oblasti na 3'-konci. Rozpoznání nemusí být absolutní, výsledkem je inhibice translace. Naproti tomu siRNA vytváří homologické nebo téměř homologické dvouřetězcové úseky na více místech cílové struktury. Oblast, kde vznikne dsRNA, je následně degradována. Je třeba si všimnout, že miRNA a siRNA jsou ve svých účincích vzájemně zaměnitelné, rozdíl je v rozsahu párování s cílovou sekvencí. Třetí funkcí malých RNA je „uspávání“ genové exprese na úrovni transkripce mechanismem tvorby oblastí heterochromatinu. Tento mechanismus se označuje jako „**transkripční uspání genu**“ (transcriptional gene silencing, TGS). Poprvé byl popsán u tabáku. Spočívá v metylaci histonů, na kterém se podílejí molekuly dsRNA. Metylace vede k sérii strukturních změn v chromatinu a v konečném důsledku k uspání genů. Rozhodující roli hraje u vláknitých kvasinek, např. *Schizosaccharomyces pombe*, kde se podílí na udržování oblastí v okolí centromér ve stavu heterochromatinu. U rostlin druhu *Arabidopsis thaliana* hraje hlavní roli v mechanismu obrany proti virům. Nedávno byl TGS popsán i u savčích buněk, ale jeho význam doposud nebyl odhalen. Bližší podrobnosti k jednotlivým mechanismům jsou popsány v následujících odstavcích.

7.5.1. Inhibice translace a indukce degradace mRNA

MiRNA regulují genovou expresi na posttranskripční úrovni vazbou na 3' UTR oblast cílové mRNA. Inhibují její translaci nebo indukují degradaci mRNA, a to v závislosti na stupni komplementarity mezi miRNA a její cílovou oblastí 3' UTR mRNA. Navození degradace mRNA je podmíněno vysokým stupněm sekvenční komplementarity. Tento mechanismus je primárně využíván u rostlin. Degradace mRNA je důsledek aktivity Argonaute proteinů RISC komplexu. Za degradací mohou být i mechanismy deadenylace, odstranění čepičky a štěpení mRNA exonukleázami.

Prvotní studie byly zaměřeny na interakce miRNA v 3' UTR oblasti mRNA. V roce 2007 byla vyslovena hypotéza o tom, že se miRNA může vázat i v jiném místě cílové mRNA. Následně bylo potvrzeno, že miRNA jsou schopné utvořit tzv. „seed duplex“ tvořený 6-8 bp a úspěšně tlumit translaci také vazbou v 5' UTR oblasti mRNA.

Jednotlivé miRNA mohou interferovat s funkcemi samotných regulačních proteinů. Např. miR-328 se váže k částicím hnRNP E2 nezávisle na „seed regionu“ a zabraňuje tak jeho interakci s mRNA pro transkripční faktor CEBPA (*CCAAT/enhancer binding protein alpha*). Další možností tedy je, že miRNA pracují jako jakési molekulární „návnady“ pro proteiny vázající se na RNA.

7.5.2. miRNA jako induktory translace

Na druhou stranu mohou miRNA vyvolat translaci cílových mRNA. Posttranskripční modulace genové exprese v cytoplazmě je totiž řízena sekvencemi ribonukleové kyseliny, které ovlivňují lokalizaci, translaci a stabilitu mRNA. Tyto řídicí sekvence, tzv. **elementy ARE** (*AU-rich elements*) jsou přítomny v 3' UTR mRNA např. u cytokinů, onkogenů a růstových faktorů. Jejich deregulace může vést k imunitním onemocněním a vývoji malignit. Nejdůležitějším cytokinem, který je běžně produkován po stimulaci lymfocytů, je *tumor necrosis factor alpha* (TNF α). *In vivo* byla provedena izolace elementů ARE za bazálních podmínek a za podmínek aktivované translace. Z pokusu

vyplývalo, že dva proteiny, *fragile X mental retardation protein* (FXR1) a *Argonaute2* (AGO2), asociují s elementy ARE, což vede k aktivaci translace.

7.5.3. Promotor jako cílové místo pro miRNA

V roce 2005 bylo prokázáno, že se miRNA mohou vázat přímo na promotory. Například miR-373 je schopná zacílit genový promotor E-cadherinu a proteinu CSDC2 (*cold-shock domain-containing protein C2*) a indukovat tak jejich expresi.

Na druhé straně je nádorovými kmenovými buňkami vyžadována interakce mezi rodinou miRNA miR-200 a Suz12, podjednotkou komplexu PRC2 (*polycomb repressor complex 2*). Snížení exprese miR-200 vede ke vzrůstu exprese Suz12; Suz 12 se váže k promotoru *cadherin-1* (CDH1). Dochází k trimetylaci histonu H3-K27 a umlčení exprese E-cadherinu. Ztráta funkce CDH1 je důležitou v rozvoji tumorigeneze a metastáz. MiR-200 blokuje tvorbu nádoru inhibicí PRC2, což brání umlčení CDH1 a díky tomuto chování je označována jako tumor supresor.

7.5.4. Funkce miRNA při ontogenetickém vývoji

Obecně se předpokládá, že molekuly miRNA zeslabují expresi mRNA na nevýznamnou hladinu v těch buňkách, které již dále nejsou v organismu zapotřebí nebo tam, kde by exprese takových mRNA mohla mít škodlivé účinky.

V průběhu zrání vaječných buněk ve vaječníku matky se v oocytech hromadí živiny, proteiny a mRNA. Tyto tzv. „mateřské mRNA“ kódují proteiny, které jsou nezbytné pro vývoj embrya v jeho počátečních fázích po oplodnění. Jejich funkce trvá do té doby, než je v embryu zahájena syntéza nových molekul mRNA, které jsou kódovány už vlastním genomem embrya. K přesmyku exprese z mateřské mRNA do mRNA zygotického původu dochází už záhy po fertilizaci (Obr. 7.4 a). Na tomto přesmyku se podílí skupina sekvencně příbuzných miRNA. Mechanismus účinku spočívá v tom, že miRNA vyvolává obrat („turnover“) molekul mateřské mRNA.

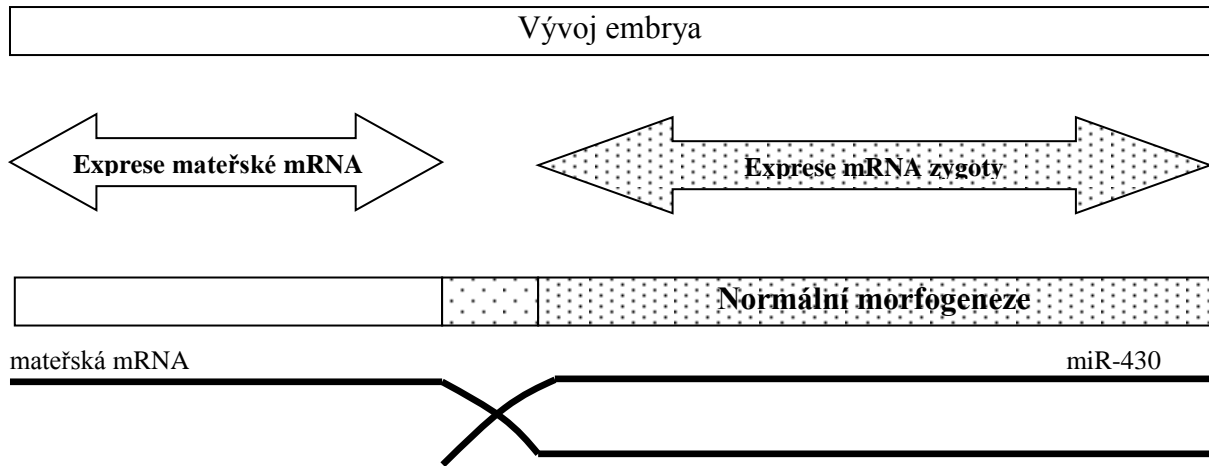
Funkce miRNA v ontogenetickém vývoji byla popsána u akvariálních ryb zebříček, a to na příkladu miR-430. U těchto ryb je miR-430 exprimována v nadbytečném množství jen v prvních 4 až 8 hodinách vývoje zygoty. Je kódována velkou genovou rodinou, do které patří více než 90 genů. MiR-430 je tvořena několika minimálně odlišnými formami miRNA. Protože jsou tyto miRNA exprimovány ve stejném čase na stejném místě a mají podobnou sekvenci, předpokládá se, že mají podobná místa účinku. Exprese miR-430 začíná v okamžiku přesmyku genové exprese z mateřské do zygotické a počet zralých molekul miR-430 rychle vzrůstá.

Zralé molekuly miRNA vznikají posttranskripční úpravou prekurzorových molekul, jejich štěpením ribonukleázou III Dicer. Tato ribonukleáza se dostává do vajíčka jako mateřská mRNA, ale exprimuje se i v zygotě. Modifikovaná embrya, která ztratila funkci této ribonukleázy, nedokáží prekurzorové miRNA upravovat. Proto nemají funkční molekuly miRNA a vykazují defekty v gastrulaci a morfogenezi mozkové tkáně. Injekce zralých miRNA do embrya tyto defekty většinou odstraní.

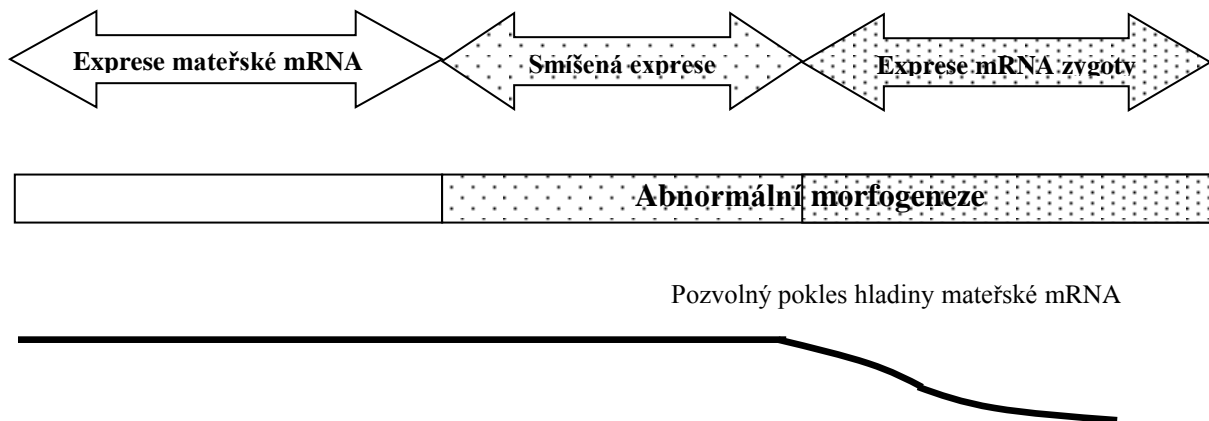
Odstranění miRNA aktivity z embrya brání přesmyku exprese mateřské mRNA do mRNA zygotického původu (Obr. 7.4 b). Výsledkem je abnormální morfogeneze. Mateřská mRNA se po čase vyředí, ale tento proces je pomalejší než u embrya s miRNA. Funkce miRNA není tedy v tom, že by působily jako spouštěcí faktor vývoje, ale vývoj „pouze“ jemně doladují a zajišťují jeho robustnost.

Obr. 7.4: Činnost miRNA na počátku embryogeneze

a) V průběhu normální embryogeneze reguluje miRNA přesmyk exprese genů z mateřské mRNA do mRNA zygoty.



b) Je-li miRNA nepřítomna, mateřská mRNA se nerozpadá a interferuje s morfogenezí.



7.6. Využití interferujících RNAi v terapii

Základní možnosti terapeutických aplikací RNAi lze nalézt v následujících oblastech:

- 1) Kontrola genové exprese ovlivňováním epigenetických změn v lokální struktuře chromatinu.
- 2) Předpokládá se, že 35% až 70% lidských genů je přepisováno do transkriptů hnRNA, které podléhají alternativnímu sestřihu. Defekty v procesu alternativního sestřihu vedou k řadě onemocnění. RNAi by mohla být použita k zablokování defektně sestřižených struktur a v důsledku toho k inhibici exprese defektního genu.
- 3) Primárně se předpokládá, že RNAi mohou být využity jako antivirové látky, které blokují replikaci virového genomu a expresi virových genů. Nejčastěji uvažovaným cílem RNAi terapie je virus HIV.
- 4) RNAi mohou být zacíleny proti genům, které jsou spojeny s metabolickými poruchami. Například v léčbě *diabetes mellitus* typu II, kde centrální roli v rezistenci k inzulínu hrají poruchy signalizace v důsledku změn v expresi genů.
- 5) Vyřazení genů (genový „knock-out“) v genomu původce malárie, *Plasmodium falciparum*, mohou sloužit ke studiu životního cyklu a k vyhledávání nových terapeutických cílů. Terapeutikem by mohly být samotné RNAi.

7.6.1. Příklady aplikací siRNA

siRNA v terapii virových onemocnění

Jako antivirové látky blokují siRNA replikaci virového genomu nebo expresi virových genů. Nejčastěji uvažovaným cílem je virus HIV, virus hepatitidy B a C, lidský papilomární virus, adenovirus a SARS asociovaný koronavirus. Kromě toho jsou siRNA schopné inhibovat funkce povrchových receptorů a ko-receptorů CD4, CCR5 nebo blokovat vstup viru do hostitelských buněk.

siRNA terapie onemocnění imunitního systému

siRNA lze terapeuticky využít i pro zlepšení funkcí imunitního systému. Bylo prokázáno, že exprese ligandů pro Notch receptory v T-lymfocytech CD4+ a dendritických buňkách pomocí malých RNA způsobuje změny v intracelulárních signálních drahách, čímž je dále ovlivněna i produkce jednotlivých cytokinů.

Kancerogeneze a siRNA

V případě kancerogeneze byly siRNA konstruovány s cílem inhibovat jednak známé onkogeny, fúzní a virové onkogeny a onkogeny mutantní (např. Ras), které se vyskytují pouze v určitých typech nádorových buněk. Dalšími cíli jsou inhibitory apoptózy Bcl-2 a regulátory buněčného cyklu (např. polo-like kinas). Malé siRNA byly úspěšně využity k omezení počtu i proliferace metastáz u karcinomu prostaty a hepatocelulárního karcinomu. Účinek siRNA v tomto případě spočívá v inhibici plazminogenového aktivátoru urokinázového typu (u-PA), což je jedna z proteáz umožňující

invazivní růst a tvorbu metastáz. Podobně tomu bylo v případě invazí rakoviny prsu, kdy byly siRNA využity k inhibici integrinů. Vaskulární endoteliální růstový faktor (VEGF) je dalším potenciálním cílem při léčbě karcinomů, jelikož jehož zvýšená exprese je asociována s celou řadou nádorových onemocnění (karcinom prsu, kolorektální karcinom) i metastáz. Malými siRNA je také možné zlepšit efektivitu chemoterapie, a to inhibicí genu MDR1, jehož produktem je membránový P-glykoprotein exportující z buňky toxické látky, a to včetně cytostatik.

siRNA terapie neurodegenerativních onemocnění

Malými RNA bylo na modelu *Caenorhabditis elegans* prokázáno, že jsou schopné oddálit nástup některých neurodegenerativních chorob (Parkinsonova, Alzheimerova choroba a amyotrofní laterální skleróza), které jsou vyvolané nesprávnou proteostázou a nadměrným množstvím toxicky působícího proteinu. Malé RNA ovlivňují progresi těchto chorob působením na „heat shock response proteiny“

(HSR), které kontrolou exprese heat shock proteinů zajišťují správný průběh proteostázy a degradaci toxického proteinu. Dalšími cílovými proteiny pro siRNA jsou „unfolded protein response“ proteiny (UPR). Dále bylo prokázáno, že malé RNA jsou schopné inhibovat expresi dominantní toxické alely i alely s jednoduchými nukleotidovými polymorfismy, jež jsou zodpovědné za vznik Huntingtonovy chorey a Kennedyho choroby, které jsou způsobené expanzí CAG repeticí.

siRNA a terapie diabetes mellitus

RNAi mohou být zacíleny proti genům, které jsou spojeny s metabolickými poruchami (například v léčbě diabetes mellitus I. a II. typu. Diabetes mellitus typu I může být způsoben autoimunitní destrukcí β buněk pankreatu, která je iniciována translokací intracelulárních ligandů Fas/FasL po stimulaci cytokiny. Malými miRNA byly experimentálně inhibovány geny pro intracelulární ligandy Fas/FasL, čímž byly β buňky chráněny před působením cytokinů.

Experimentálně byly testovány mechanismy diabetes mellitus typu II. Malými RNA byla v myších i lidských buňkách cíleně inhibována exprese fosfoenolpyruvat-karboxykinázy (PEPCK), což je jeden z klíčových enzymů glukoneogeneze (GNG). Výsledkem inhibice PEPCK bylo snížení plazmatické hladiny glukózy a zlepšení glukózové tolerance. MicroRNA byly využity také k zablokování exprese jaderného transkripčního koaktivátoru PPAR- γ (PGC-1), jehož množství je zvýšené u diabetických pacientů a přispívá k rozvoji inzulínové rezistence. Inhibicí PGC-1 došlo ke snížení množství krevní glukózy i enzymů GNG (PEPCK, glukóza-6-fosfatáza) a β -oxidace. Dalšími klíčovými místy ovlivňující působení inzulínu jsou inzulínové receptory (IR) a jejich substráty (IRS). Ke vzniku diabetes mellitus II. typu dochází, pokud jsou IR nebo IRS poškozené, a není tudíž umožněn vstup glukózy do buněk. Po inhibici jaterní exprese obou izoform (IRS-1 a IRS-2) malými RNA došlo k hyperinzulinémii, systémové inzulínové rezistenci, glukózové intoleranci a jaterní steatóze. IR i IRS jsou za fyziologických podmínek deaktivovány tyrosinovými fosfatázami (PTP1B, TCPTP), které jsou negativními regulátory inzulínového signálu. Inhibicí exprese jednotlivých fosfatáz malými RNA došlo ke zlepšení inzulínové signalizace. Molekuly siRNA lze potenciálně využít v léčbě diabetické nefropatie, která je způsobená nadměrnou akumulací proteinů extracelulární matrix. Malými siRNA byla inhibována exprese transformujícího růstového faktoru (TGF- β 1), který je schopen stimulovat syntézu proteinů extracelulární matrix. Důsledkem této inhibice byla inhibice exprese proteinů ECM.

Za další potenciální cíl při léčbě diabetické nefropatie je možno považovat miR-192, jejíž hladina se přítomností TGF- β 1 zvyšuje.

7.6.2. Příklady aplikací miRNA

miRNA jako klinické biomarkery

MiRNA jsou z klinického hlediska vysoce užitečné markery pro stanovení diagnózy nemoci, její prognózy a určení nejlepší léčebné strategie. Vykazují vysokou tkáňovou specifitu a je pomocí nich možné rozlišit zdravou tkáň od metastázovaného tumoru u pacientů s neznámými primárními tumory. V roce 2004 bylo dokázáno, že exprese miRNA let-7 je snížena u lidí s rakovinou plic. Tito pacienti měli výrazně krátký interval přežití po kurativní resekci plic. První studie poukazující na diagnostickou a prognostickou důležitost miRNA byla publikována v roce 2005.

Ačkoliv se miRNA většinou nachází v intracelulárním prostředí, významný počet jich byl nalezen v tělních tekutinách mimo buňky. Většina molekul mRNA je v extracelulárním prostředí nestabilní z důvodu přítomnosti ribonukleáz, které mRNA rychle degradují. Ovšem miRNA jsou v tomto prostředí stabilní. Sekvence většiny miRNA jsou konzervativní napříč druhy, ale exprese některých miRNA je pro určitou tkáň specifická a hladina miRNA je snadno detekovatelná různými metodami. Změny koncentrací v plazmě, séru, moči a slinách jsou spojovány s různými nemocemi.

miRNA a onemocnění nervové soustavy

První souvislost mezi lidskými chorobami a malými RNA byla objevena u *Drosophilla melanogaster*, jejíž protein dFMR1 je homologní k lidskému fragile X mental retardation proteinu (FMRP). Tento protein je zodpovědný za vznik syndromu fragilního X-chromozomu spočívajícího v expanzi repetitivní sekvence CGG, která se nachází v 5' UTR oblasti genu FMRP/FMR1. Pokud se tato repetice opakuje více než 200 \times , dochází následně k metylaci přilehlého ostrůvku CpG i repetice samotných, čímž je znemožněna transkripce genu FMRP/FMR1. Prozatím bylo několika autory prokázáno, že protein FMRP/FMR1 je jedním z mnoha vázajících se na podjednotku RISC komplexu a řídící translaci ostatních proteinů. Jakékoliv narušení FMRP jako podjednotky RISC může tedy vést ke vzniku této choroby. Zatím není známo, které miRNA řídí expresi mRNA právě pomocí FMRP/FMR1 proteinu.

V mozkových buňkách se vyskytuje velké množství miRNA (např. miR-124a, miR-134, miR-133b). U obratlovců mají miRNA, které se nachází v mozku, vysokou specifitu a hrají významnou roli v neuronálním vývoji. MiRNA mají v zárodečných buňkách, nervových kmenových buňkách a fetálním mozku odlišné expresní profily. miRNA ovlivňují buněčnou diferenciaci a/nebo buněčný cyklus během vývoje centrální nervové soustavy a mohou přispívat k rozvoji nemocí centrální nervové soustavy, např. schizofrenie, autismu, epilepsie, mozkové obrny, mentální retardace, Tourettova syndromu či ke vzniku a progresi Parkinsonovy choroby.

U schizofrenie a schizoafektivních pacientů je v prefrontálním kortexu dysregulována exprese miRNA. Mi-R181b ovlivňuje visinin-like 1 (gen pro senzor iontů Ca²⁺) a glutamátový receptor GRIA2. Množství těchto proteinů je u těchto onemocnění sníženo a nesprávná regulace prostřednictvím miR-181b je příčinou sluchových halucinací.

Syndrom fragilního chromozómu X patří mezi nejčastější příčiny mentální retardace. Jedná se o X-vázanou chorobu a za její vznik je zodpovědná mutace v genu FMR1 (*fragile X mental*

retardation 1), která vede k narušení jeho exprese. FMR1 protein interaguje u *Drosophily* a savčích buněk s komponenty RISC a DICER během biogeneze miRNA a může se přímo vázat na cílové místo mRNA a inhibovat translaci.

Tourettův syndrom je genetické neurologicko-psychiatrické onemocnění způsobené posunovou mutací v genu Slit and Trk-like 1 (SLITRK1), což vede ke změně vazby miR-189 k 3'UTR oblasti SLITRK1. Následkem mutace dochází ke zvýraznění represe miR-189.

Určit expresní profil miRNA u neurodegenerativních nemocí je obtížné hned ze dvou důvodů. Tím prvním je ten, že některé miRNA jsou specificky exprimovány jen v některých částech mozku nebo určitých neuronech, tím druhým je skutečnost, že je velmi těžké rozlišit zdravou tkáň od tkáně postižené nemocí. Od roku 2007 se vědecké studie zaměřují na úlohu miRNA v regulaci proteinů zahrnutých v neurodegenerativních onemocněních jako je Alzheimerova choroba, Parkinsonova choroba a Huntingtonova choroba. Ačkoli výzkum ukazuje, že se miRNA mohou podílet na iniciaci nebo progresi neurodegenerativních onemocnění, je třeba dalšího výzkumu, aby bylo možné objasnit, jestli se změny v expresi miRNA podílejí na patogenezi neurodegenerativních onemocnění přímo nebo jestli se jedná o sekundární efekty vyvolané deregulačními dráhami. Např. miR-133b hraje důležitou roli pro zrání a správnou funkci dopaminergních neuronů a k její ztrátě dochází v nefunkčních tkáních mozku pacientů s Parkinsonovou chorobou.

Léky 1. volby v léčbě depresivní poruchy jsou inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI). Za normálních podmínek je serotonin vychytáván do presynaptického zakončení selektivním transportérem pro serotonin (SERT). Bylo zjištěno, že funkci tohoto transportéru ovlivňuje miR-16. Během chronické léčby fluoxetinem u myší vzrostla maturace miR-16 z jejích prekurzorů pre/pri-miR-16, přičemž byla snížena exprese SERT. Fluoxetin zároveň uvolňuje neurotropní faktor S100 β , který patří do skupiny proteinů vázajících vápník a stimuluje expresi noadrenergických neuronů.

miRNA a kardiovaskulární onemocnění

Pomocí „microarray“ analýzy miRNA bylo identifikováno více než dvanáct miRNA zapojených do rozvoje srdečního selhání a srdeční hypertrofie. Např. exprese miR-195 v nadměrném množství vede na myších modelech k srdečnímu selhání a nadměrnému růstu kardiomyocytů. MiR-1-1 a miR-1-2 jsou specificky exprimovány v prekurzorových buňkách příčně pruhované svaloviny srdce a svalů. miR-1 reguluje ventrikulární kardiomyocyty a u *Drosophily* moduluje kardiogenezi. Zatímco samotná miR-1 spouští myogenezi, pak klastr vzniklý spojením miR-133 a miR-1 na chromozomu 2 myší stimuluje proliferaci myoblastů.

miRNA a autoimunitní onemocnění

Změny miRNA jsou nalézány u psoriázy, revmatoidní artritidy i systémového lupusu erythematosu. Mezi miRNA účastníci se těchto chronických zánětlivých onemocnění patří miR-203, miR-146, miR-125b. NF- κ B up-reguluje transkripci miR-155, miR-146 a miR-9 společně s dalšími za zánět odpovídajícími geny přes signalizační kaskádu v makrofázích.

miRNA a metabolická onemocnění

Některé miRNA jsou exprimovány pouze v určitých tkáních anebo pouze v jejich určitém vývojovém stadiu. Je tomu tak i v případě β -buněk pankreatu, ve kterých bylo identifikováno několik miRNA podílejících se na regulaci hladiny krevní glukózy a sekreci inzulínu (miR-375, miR-376, miR-9, miR-124-a2). Nejvíce zastoupena je miR-375. miR-375, pokud je exprimována v nadměrném množství, inhibuje glukózou stimulovanou sekreci inzulínu. A naopak, pokud je inhibována sama miR-375, je sekrece inzulínu zvýšena. Mechanismus, kterým je sekrece inzulínu modifikována, není závislý na změnách metabolismu glukózy nebo intracelulárních hladinách Ca^{2+} , ale má přímý efekt na exocytózu inzulínu. miR-375 inhibuje v β -buňkách pankreatu expresi myotrofinu, a ovlivňuje tak poslední stádia exocytózy.

Výstup a vstup cholesterolu z a do buněk je regulován stejnými geny, které řídí SREBP proteiny vázající se v membráně. Obratlovci mají dva geny SREBP. SREBP-2 aktivuje syntézu a absorpci cholesterolu, zatímco SREBP-1 preferenčně aktivuje syntézu mastných kyselin. Oba geny kódují uvnitř intronů miR-33, která se nachází ve dvou izoformách (miR-33a a miR-33b) lišících se od sebe dvěma nukleotidy. MiR-33 blokuje vypadávání cholesterolu z buněk snížením množství mRNA a množství proteinů pro ABCA1, membránový transportér, který vylučuje cholesterol z buněk. ABCA1 jsou transportéry fungující u makrofágů a hepatocytů. V jaterních buňkách je ABCA1 nezbytný pro produkci prekurzorové formy HDL (high-density lipoprotein). Bylo pozorováno, že dodání antagonisty miR-33 vedlo k významnému zvýšení HDL v plazmě. Okolnosti regulace transkripce genu SREBP (*sterol regulatory element-binding protein*) *in vivo* jsou důležité z klinického hlediska. Hepatocyty produkují dvě alternativy SREBP-1a, která se nachází v nehepatálních tkáních, a SREBP-1c. Obě alternativy se od sebe liší promotorem a prvním exonem.

Transkripce SREBP-1c je posílena inzulinem. Pokud je inzulin ve vysoké koncentraci, SREBP-1c je transkribován na extrémně vysoké úrovni, což aktivuje geny nezbytné pro produkci mastných kyselin, které jsou inkorporovány do triglyceridů. Obvyklou příčinou hyperinzulinémie je periferní inzulínová rezistence. Hyperinzulinémie vede k hypertriglyceridémii a zvýšené sekreci inzulínu. Periferní inzulínová rezistence je jedním z parametrů metabolického syndromu.

miRNA a nádorová onemocnění

Bylo popsáno mnoho potenciálních terapeutických cílů regulujících apoptózu, proliferaci a buněčnou signalizaci. Molekuly schopné inhibovat expresi těchto genů jsou v dnešní době hlavními nástroji ve výzkumu kancerogeneze. V buňkách není kontrolována exprese pouze strukturních genů, ale i transkripce a úpravy miRNA samotných.

Aktivita genů pro miRNA může být ovlivněna třemi způsoby

- přemístěním genů vyskytujících se v blízkosti promotorů pro miRNA,
- translokací v regulačních oblastech,
- změnou v oblasti 3' UTR na mRNA

Ke vzniku nádorového onemocnění může dojít i mutací genů podílejících se na vzniku miRNA. Například u pacientů s Wilmsovým tumorem nejsou exprimovány AGO proteiny a u primitivních neuroektodermálních nádorů je změněna struktura AGO proteinů. Na post-transkripční úrovni mohou být dysregulovány i onkogeny, které jsou pod kontrolou určité miRNA. Ztráta represe řízené

molekulami miRNA je u některých onkogenů jedním ze způsobů, jakým jsou tyto geny aktivovány. Může docházet i k mutacím v sekvenci molekul miRNA kontrolujících expresi tumor-supresorového genu; to vede ke zvýhodnění nádorových buněk (obr. 7.5). Z terapeutického hlediska je nejdůležitější, že molekulami miRNA lze inhibovat expresi mutovaných genů. Molekuly miRNA se mohou v průběhu kancerogeneze chovat jednak jako onkogeny, jako je tomu v případě miR-155, jejíž hladina je několikanásobně zvýšená u pacientů s Burkittovým lymfomem. Naopak pacienti s chronickou lymfocytární leukémií (CLL) postrádají geny pro miR-15 a miR-16, které se v tomto případě chovají jako klasické tumor supresorové geny. Expres některých proteinů (RAF1 kináza, G-protein $\gamma 7$ a tumor-suppressing subfragment candidate 1) účastnících se transdukce signálu, genové exprese a onkogeneze je řízená miR-143 a miR-145. Hladiny těchto miRNA jsou sniženy u nádorů prostaty, prsu, děložního čípku a kolorektálního karcinomu.

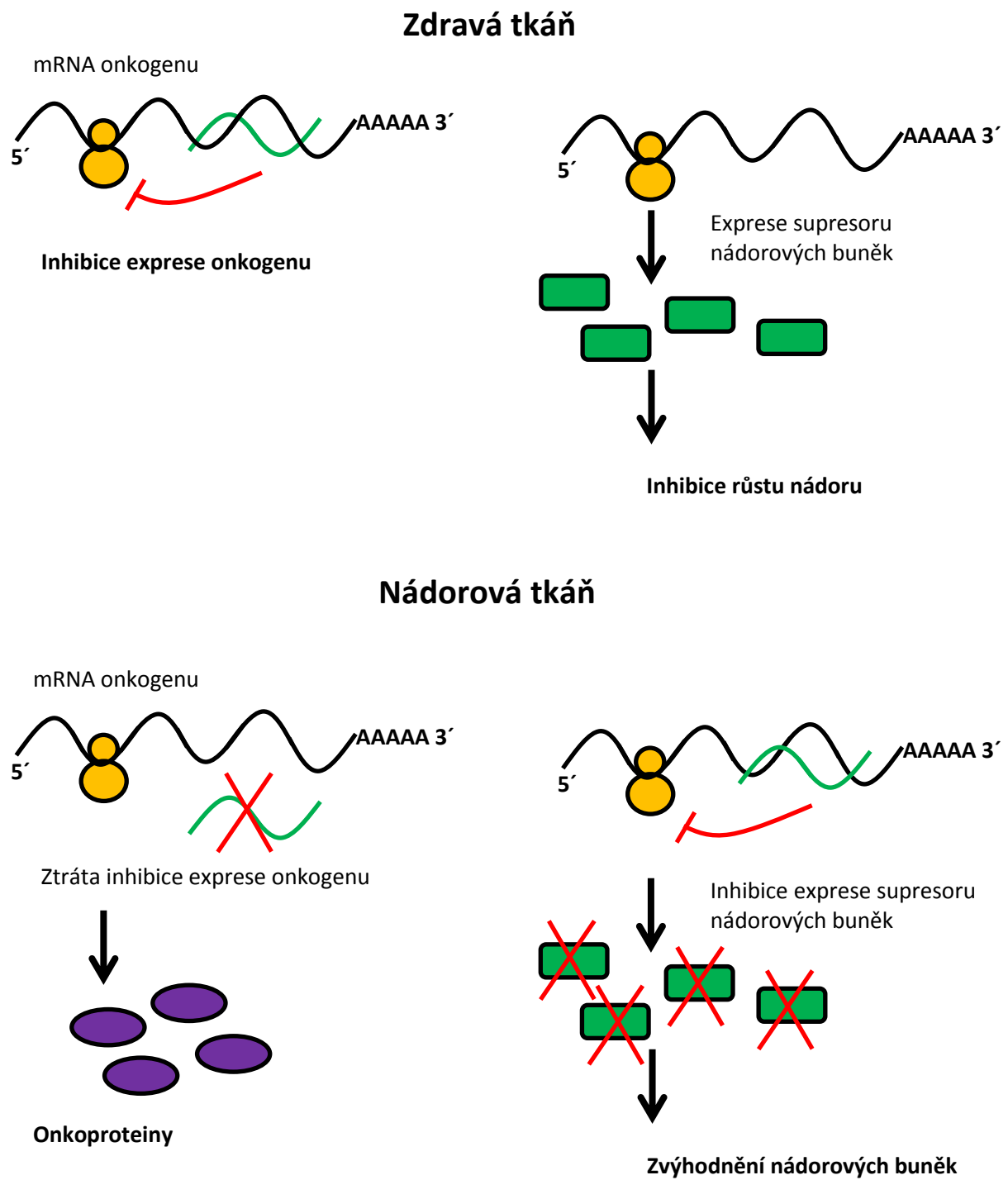
miRNA mohou fungovat jako onkogeny. Jsou to takové miRNA, které jsou v nádorových buňkách amplifikovány nebo vysoce exprimovány. Příkladem je miR-155 či shluk miR-17~92. MiR-155 se exprimuje v nadměrném množství v buňkách imunitního systému (v aktivovaných B- a T-lymfocytech, v makrofázích a v dendritických buňkách). Je tedy nezbytná k udržení homeostázy imunitního systému, pro správnou funkci B- a T-lymfocytů a následnou produkci cytokinů. MiR-155 je up-regulována v mnohých hematopoetických malignancích a nádorech prsu, plic a pankreatu.

Inhibicí exprese miR-155 bylo prokázáno, že je nezbytná pro udržení homeostázy imunitního systému, jelikož řídí expresi několika genů (cytokiny, chemokiny a transkripční faktory). Dále je naprosto nezbytná pro správnou funkci B- a T-lymfocytů a následnou produkci cytokinů. Jelikož byla prokázána komplementarita mezi sekvencemi miR-155 a oblastmi na chromozomu, která souvisí s výskytem asthma bronchiale, atopické dermatitidy a pylové alergie, předpokládá se, že miR-155 určitým způsobem souvisí s uvedenými chorobami.

miRNA mohou zastávat funkci tumor supresorových genů. Expres tumor supresorů v nadměrném množství limituje buněčný růst nádorových buněk a je schopná navodit programovanou buněčnou smrt. Doposud bylo popsáno přinejmenším tucet miRNA a shluků miRNA působících jako tumor-supresory, např. shluk miR-15a~16-1 nebo shluk let-7. MiR-15a~16-1 je lokalizována na chromozomálním regionu 13q14, který chybí u chronické myeloidní leukémie, buněčných lymfomů a rakoviny prostaty.

Let-7 je složen z tuctu miRNA, které jsou organizovány v osmi různých lokusech. U *C. elegans* navozuje let-7 zastavení buněčného cyklu a terminální diferenciaci buněk na přechodu z larválního stádia do stádia dospělého jedince. U lidí je snížená exprese dávana do souvislosti s rakovinou plic. Geny pro let-7 mohou být přímo potlačeny onkoproteinem c-Myc. Let-7 působí na onkogeny Ras a proteiny HMGA2 (*High Mobility Group A2*) a dokonce i na samotný c-Myc. Proteiny HMGA2 svou translokací a strukturními změnami chromatinu ovlivňují transkripci některých genů. Jsou exprimovány nejen v embryonálních nediferencovaných proliferativních buňkách, ale také v buňkách maligních. Ke vzniku nádorového bujení může dojít při poškození v oblasti 3' UTR v důsledku translokace chromozomů a zkrácení ORF pro HMGA2. Hlavním mechanismem translokací onkogenního HMGA2, který je asociovaný s některými lidskými tumory, je tedy ztráta represe pomocí let-7 miRNA. Expres let-7 v nadměrném množství ve studiích na myších prokázala zastavení nádorového vývoje u rakoviny prsu a plic.

Obr. 7.5: Obecné schéma kontroly nádorového bujení molekulami miRNA, podle Lochmanová a Bartoš (2008).



Řada studií se zaměřuje na tumor supresorové geny, které ovlivňují miRNA. Jedním z nich je p53, který reguluje expresi specifických miRNA na dvou rozdílných úrovních, na úrovni transkripce a posttranskripčních úprav. Tento gen je aktivován po poškození DNA, při kterém p53 mimo jiné indukuje transkripci primárních transkriptů miR-34. MiR-34 sestává ze tří velmi příbuzných miRNA exprimovaných ve dvou oddělených lokusech: miR-34a na chromozomu 1p36, oblasti četných hemizygotních delecí u neuroblastomy a dalších typů rakoviny; tento region zahrnuje i další kandidáty tumor supresorových genů, např. *cadherin 5* (CDH5), který navozuje expresi p53 pomocí alternativně čteného proteinu (*alternate reading frame protein*, p19Arf). Shluk miR-34b/miR-34c se nachází v oblasti chromozómu 11q23. Exprese miR-34 navozuje zastavení buněčného cyklu nebo apoptózu. Snížená exprese miR-34b/miR-34c byla pozorována u rakoviny prsu a nemalobuněčného karcinomu plic. p53 ovlivňuje také zpracování některých miRNA. Exprese miR-16, miR-103, miR-143, miR-145, miR-261 a miR-26 v nadměrném množství vede ke snížení rychlosti buněčné proliferace.

Aby mohla buňka reagovat na masivní poškození DNA, musí být exprese p53 pevně regulována, což je částečně zprostředkováno na ubiquitin založené degradaci p53 a miR-125b. Pokles hladiny miR-125b zvyšuje prahovou hodnotu pro aktivaci p53.

miRNA stojí za progresí nádoru a rozvojem metastáz, protože ovlivňují progresi nádorů včetně letální metastázové fáze. Pomáhají regulovat biologické procesy spojené s tvorbou nádoru, včetně kontroly adheze, migrace a invaze buněk a umožňují tak rakovinovým buňkám vycestovat z primární nádorové tkáně a potencovat vznik metastáz.

Mezi miRNA, které jsou schopné navodit vznik druhotných nádorových tkání, patří miR-10b, miR-373, miR-21, členové rodiny let-7, miR-335 a miR-126. Na druhé straně byly objeveny mnohé miRNA, které buněčnou migraci a vznik metastáz inhibují. Členové rodiny miR-200 cílí transkripční faktor ZEB, který indukuje přechod epitelu na mezenchym (*epithelial-to-mesenchymal transition*, EMT), což vede ke snížené migraci a invazi buněk. Příklady miRNA, které souvisí se vznikem metastáz jsou uvedeny v Tabulce 7.1.

miRNA a viry

Viry jsou schopné produkovat vlastní miRNA, které se přepisují převážně z dsDNA virových genomů. Jejich funkce jsou doposud vysvětleny jen na několika příkladech, například u herpesvirů, polyomavirů a retrovirů. U savčích virů bylo identifikováno přibližně 40 miRNA a 10 supresorových RNAi.

Díky vlastním miRNA mají viry vyšší schopnost napadat zdravé buňky a infikovat je. Epstein-Barr virus z rodiny Herpesviridae preferenčně napadá lidské B buňky a exprimuje mnohé geny pro miRNA. Represi využívá jako metodu regulace hostitelských a virových genů neimunogenetickým způsobem. Lidský cytomegalovirus exprimuje miRNA během lýze lidských buněk. Simian virus 40 (SV40) kóduje miRNA, které se akumulují v posledním stádiu infekce, jsou perfektně komplementární k dřívějším mRNA a jejich cílem jsou tytéž mRNA. RNA interferencí dochází k redukci exprese virových T antigenů.

První známý produkt virového genu, který byl schopen inhibovat RNAi v lidských buňkách, byla vysoce strukturovaná asi 160 nukleotidová dlouhá nekódující RNA adenoviru VA1. Mechanismus jejího účinku spočíval v inhibici jaderného exportu prekurzorů shRNA nebo pre-miRNA prostřednictvím soupeření o exportin-5 a v inhibici funkce ribonukleázy Diceru přímou vazbou na ni.

Tabulka 7.1: Některé miRNA související se vznikem metastáz, podle Ma, L. a R.A. Weinberg (2008).

miRNA	Vliv na expresi	Princip účinku	Cílový gen
miR-10b	Vysoká exprese u glioblastomy multiforme (primární mozkový nádor), karcinomu pankreatu a u metastáz rakoviny prsu	metastázový promotor	HOXD10
miR-373	Up-regulována v zárodečných buňkách rakoviny varlete, u metastáz rakoviny prsu a u primární rakoviny prsu asociovaných s lymfatickými metastázemi	onkogen, metastázový promotor	LATS2, CD44
miR-21	Zvýšená regulace v mnoha solidních nádorech	onkogen, metastázový promotor	PTEN, TPM1, PDCD4
členové rodiny let-7	Snížená regulace v mnoha tumorech, mírně exprimovány v buňkách iniciujících rakovinu prsu a zvýšená regulace během diferenciaci	tumor supresor, metastázový supresor	RAS, HMGA2
miR-335	Snížená exprese u rakoviny prsu předchází relapsu z důvodu metastáz	metastázový supresor	SOX4, TNC
miR-126	Snížená exprese u rakoviny prsu předchází relapsu z důvodu metastáz	tumor supresor, metastázový supresor	Neznámý

7.6.3. Terapeutika založená na RNA

V současné době je klinicky hodnoceno nemalé množství léčiv založených na RNA. Mezi tato „nová“ léčiva patří např. ribozymy, aptamery a siRNA. Molekuly RNA jsou samy o sobě nestabilní, potencionálně imunogenní a pro účinný transport do cílových buněk vyžadují specifický transportér. Kvůli těmto vlastnostem docházelo dříve u klinických zkoušek ke smíšeným výsledkům, což bránilo pokroku v uvádění některých léčiv založených na RNA do klinické praxe. Díky zlepšujícím se syntetickým transportérům a chemickým modifikacím terapeutik RNA byla tato bariéra překonána.

Léčiva na bázi RNA mohou být klasifikována dle mechanismu působení na

- inhibitory translace mRNA (tzv. mechanismus antimediatorové RNA – antisense RNA),
- zprostředkovatele RNA interference,
- katalyticky aktivní molekuly RNA molekuly (ribozymy),
- molekuly RNA, které vážou proteiny a další molekulární ligandy (aptamery)

Největším dosavadním úspěchem léčiv založených na RNA je ten, že Agentura pro kontrolu potravin a léků (FDA) schválila chemicky modifikovaný a vysoce specifický aptamer Macugen k léčbě makulární degenerace.

I přes výrazné množství překážek, se kterými se vědci po celou dobu setkávali, dostalo se do stádia klinického testování více než 50 molekul RNA nebo léčiv založených na RNA. Díky zlepšení syntetických a přirozených transportérů nukleových kyselin a také díky vývoji chemicky modifikovaných nukleotidů došlo ke zdokonalení transportu RNA léčiv do místa jejich působení, především díky změnám v jejich specifitě, stabilitě a aktivitě.

In vivo jsou RNA molekuly nestabilní díky přítomnosti ribonukleáz v séru a buňkách. Chemické modifikace molekuly mohou její vlastnosti vylepšit, aniž by došlo ke snížení cílové aktivity. Chemické úpravy siRNA, aptamerů, ribozymů, antimediátorových nukleotidů (antisense oligonucleotides) a miRNA zkvalitňují farmakokinetické a farmakodynamické vlastnosti a snižují imunogenicitu. Právě modifikace krátkých syntetických oligonukleotidů, mezi které patří změny ve struktuře cukru, báze a samotné kostry nukleotidů, zvyšují jejich cílovou afinitu a specifitu, snižují sklon k degradaci nukleázami, zlepšují farmakokinetické vlastnosti a také zvyšují účinnost umlčování RNAi. Současné postupy syntézy modifikovaných RNA a DNA molekul vedou k účinné a spolehlivé výrobě a snížení finančních nákladů.

První použitá miRNA

První použitou miRNA na myších modelech byla let-7 u nemalobuněčného karcinomu plic. Během léčby došlo jen k částečnému zmenšení a k inhibici růstu nádoru musela být použita více než jedna dávka let-7. Let-7 je schopná inhibovat progresi nádoru u nemalobuněčného karcinomu plic pomocí intranazální aplikace lentivirové let-7 nebo intravenózní aplikace v lipozomech. Regrese tumoru přispěla ke snížení buněčné proliferace a indukovala nekrózu.

Miravirsen

Miravirsen je jedno z aktuálně (duben 2012) klinicky testovaných léčiv, které využívá technologie antisense-miRNA k inhibici endogenní miRNA. Miravirsen (SPC3649) je oligonukleotid na bázi LNA, který inhibuje endogenní miR-122. MiR-122 se specificky nachází v játrech a je zapojená do replikace viru hepatitidy C (HCV). Tento virus rychle mutuje a Miravirsen zasahuje kritický faktor hostitele. Dvě ukončené první fáze klinického hodnocení naznačily, že pacienti léčivo dobře snáší. Miravirsen postoupil do druhé fáze klinického hodnocení, kde se sleduje jeho bezpečnost, tolerance a účinnost pro léčbu pacientů s chronickým genotypem HCV.

Další literatura

Lochmanová a Bartoš (2008): Interferující ribonukleové kyseliny a molekulární patofysiologie vybraných onemocnění. ČASOPIS LÉKAŘŮ ČESKÝCH, 147, č. 12, str. 607-614.

Lagos-Quintana, M., et al. (2001): Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294 (5543), s. 853-858.

Novina a Sharp (2004): The RNAi revolution. *Nature*, 2004, 430, s. 161–164.

Wahid, F., et al. (2010): MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1803 (11), s. 1231-1243.

Ma, L. a R.A. Weinberg (2008). Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in Genetics*, 24 (9), s. 448-456.

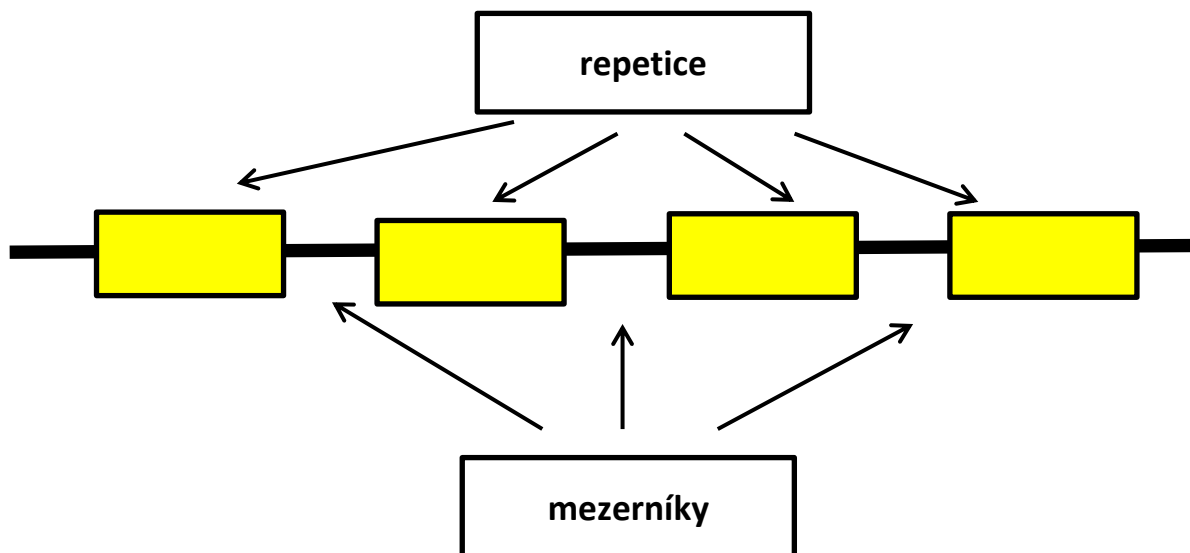
7.5. RNA interference u prokaryot

První zmínky o systému, který se podobá eukaryotické RNA interferenci, pocházejí z roku 1997, kdy byl popsán u *E. coli*, ale jeho význam byl rozpoznán a název byl přijat až v roce 2002, kdy byly podobné struktury odhaleny u různých bakterií a *Archae*. Posléze byly podrobně popsány v práci Sheilagh Molloy et al. 2007. V roce 2008 pak byl v práci Brouns (2008) systém pojmenován jako CRISPR („clustered regularly interspaced short palindromic repeats“), který je analogický siRNA a je určený k degradaci virových nebo plasmidových nukleových kyselin. Systém využívá interní „antivirové“ nebo „antiplasmidové“ sekvence začleněné v obrácených repeticích CRISPR, které jsou po transkripci postupně upravovány štěpení Cas proteiny. Výsledné produkty pak interferují s nukleovou kyselinou vstupujícího viru nebo plasmidu.

CRISPR je vlastně hypervariabilní lokus vytvořený z genetického materiálu invazivních elementů, který se časem rozvinul v primitivní dědičný imunitní systém kódovaný DNA. Viry proti tomuto systému vyvíjejí strategie, aby ho překonaly.

Ke konci roku 2008 byly CRISPR popsány u asi 40% sekvenovaných eubakterií a téměř všech archeí (90%). Všechny popsané CRISPR lokusy sestávají z několika vzájemně nesousedících přímých repeticí o délce 24 až 48 nukleotidů oddělených úseky variabilních sekvencí označovaných mezerníky, které většinou odpovídají segmentům buňkou pohlcených sekvencí virového nebo plasmidového původu. V sousedství se často nacházejí geny cas (CRISP-associated) – obr. 7.6.

Obr. 7.6: Struktura CRISPR

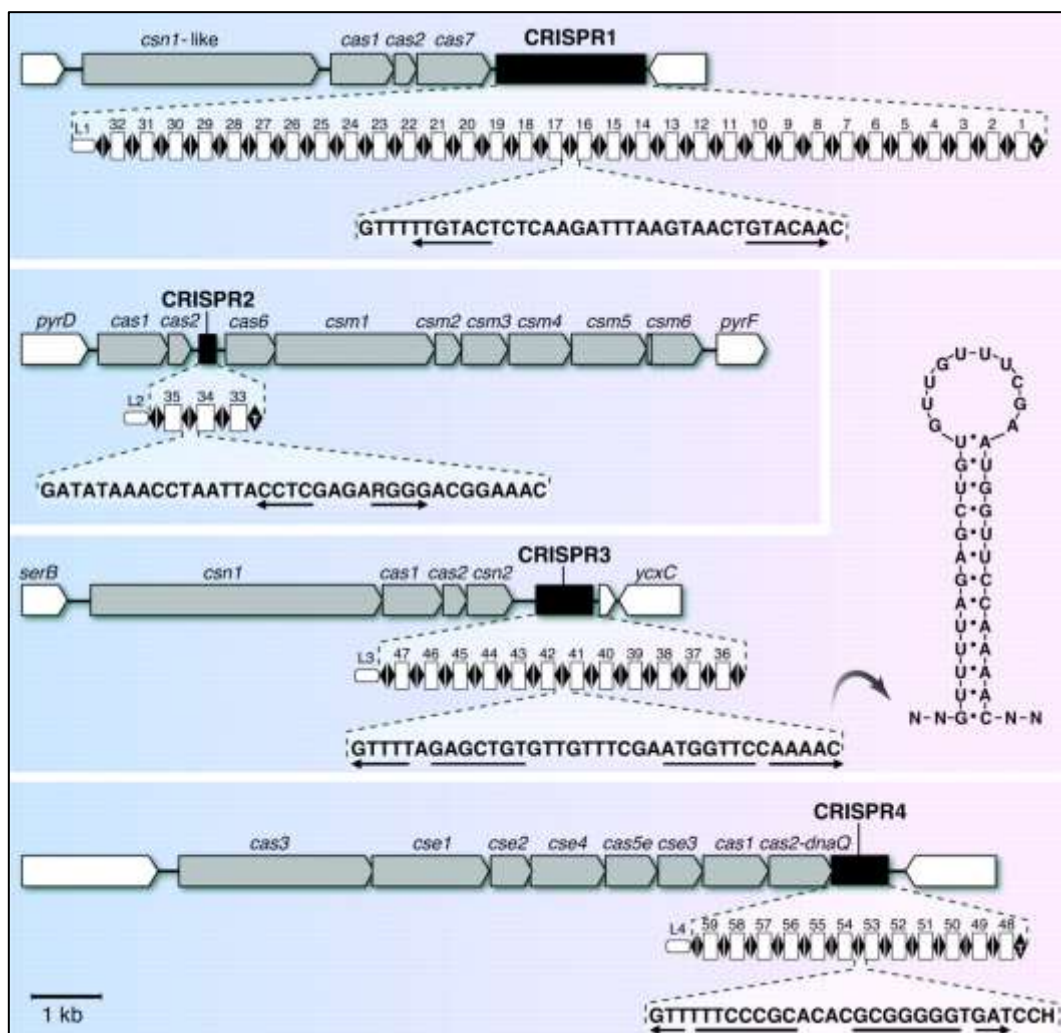


Podrobnější schémata několika systémů CRISP/cas jsou zachycena na obr. 7.7.

Obr. 7.7: Schéma čtyř systémů CRISPR/cas u *Streptococcus thermophilus* DGCC7710, převzato z Horvath a Barrangou (2010).

U každého systému je organizace genů popsána nad schématem, geny *cas* jsou vyznačeny šedivě, repetice spolu s mezerníkem černě. Pod schématem je detailní schéma genu: repetice jako černé kosočtverce, mezerníky jako bílé obdélníky, T = koncová repetice. V dolní řadě je uvedena konvenční sekvence, L1 až L4 = vedoucí sekvence. Předpokládaná sekundární struktura CRISPR3 je vyznačena napravo.

Systémy *S. thermophilus* CRISPR2, CRISPR3, and CRISPR4 systems jsou homologické se systémem CRISPR u *Staphylococcus epidermidis* (20), *Streptococcus mutans* (19), respektive *E. coli*.



Geny *cas* kódují velkou a heterogenní rodinu proteinů, které obsahují funkční domény typické pro nukleázy, helikázy, polymerázy a proteiny vázající se na polynukleotidy. Sekvence CRISPR v kombinaci s proteiny Cas tvoří systémy CRISPR/Cas. Bylo identifikováno celkem 6 genů *cas*, které jsou přítomny víceméně ve všech systémech. Kromě toho existují specifické geny, které se spojují se specifickými sekvencemi CRISPR. Délka repetic CRISPR se pohybuje mezi 23 až 47 bp, délka mezerníků mezi 21 až 72 bp. Obecně jsou repetice CRISPR uvnitř daného lokusu vysoce konzervativní. Mezi mikrobiálními druhy se ale vyskytují rozmanité kolekce repetic. Většina repetic tvoří

palindromy. Většina lokusů obsahuje kolem 50 jednotek, ale u *Chloroflexus sp.* bylo popsáno 375 jednotek repetice. U *Methanocaldococcus jannaschii* zabírají repetice CRISPR 1% genomu. Většinou jsou repetice CRIPR lokalizovány na chromozómu, ale byly nalezeny i na plasmidech. Mezerníky jsou hypervariabilní a to i u blízce příbuzných druhů.

Důkaz o tom, že sekvence CRISPR nesou rezistenci vůči infekci fágem, byl podán v roce 2007 u *Streptococcus thermophilus*.

7.5.1. Mechanismus působení CRISPR/Cas

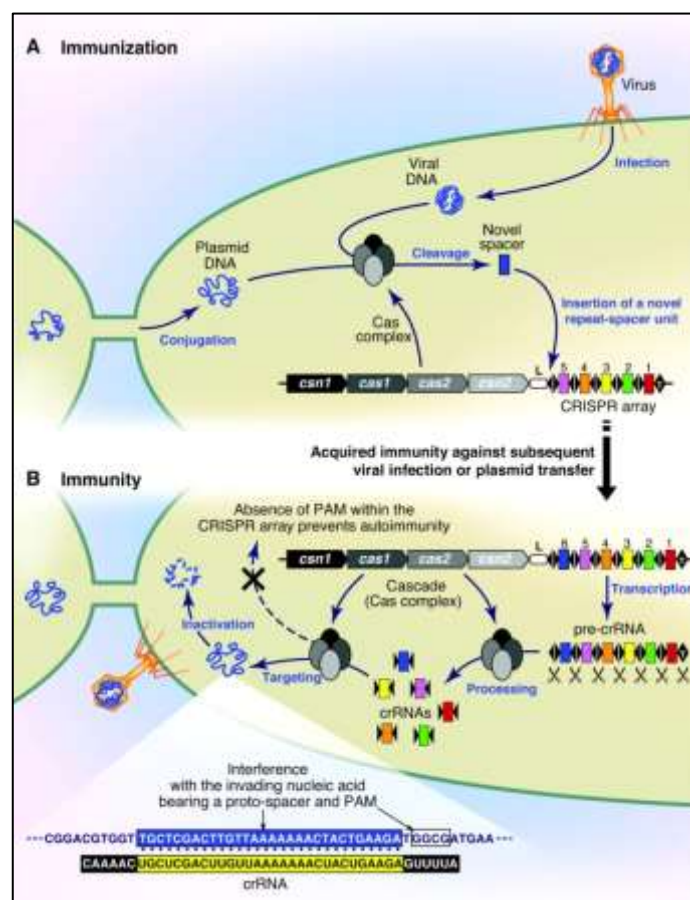
Mechanismus, kterým CRISPR zajišťuje svým hostitelům rezistenci je popsán jen částečně - obr. 7.8).

Obr. 7.8: Schéma působení CRISPR/cas, převzato z Horvath a Barrangou (2010).

A) Imunizace: po inzerci exogenní virové nebo plasmidové DNA rozpoznává komplex Cas cizorodou DNA a integruje novou jednotku repetice-mezerník k vedoucímu konci lokusu CRISPR.

B) Imunita: Struktura repetice-mezerník je přepsána do pre-crRNA, která je upravena do zralých molekul crRNA. Ty jsou následně využity k interferenci s invadující nukleovou kyselinou.

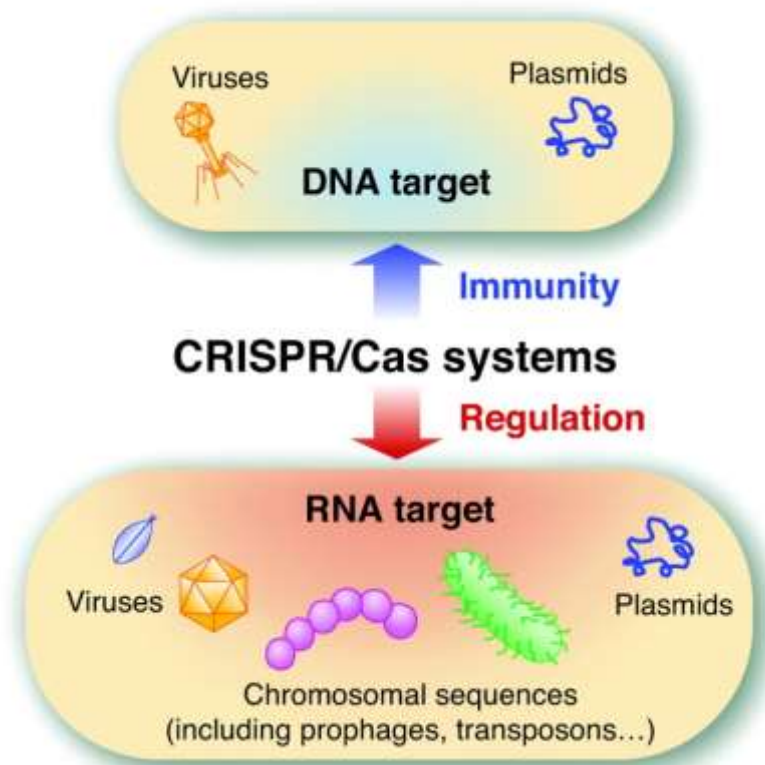
Repetice jsou znázorněny jako kosočtverce, mezerníky jako obdélníky a vedoucí sekvence CRISPR je označena L.



Je známo, že Cas1 je endonukleáza štěpící dsDNA, Cas2 je specifická endoribonukleáza, která štěpí ssRNA bohaté na uracil. Mechanismus rozpoznání invadujících elementů, tvorby nové repetice a výběr mezerníku a integrace do lokusu CRISPR zůstávají neobjasněny. Dá se představit, že oblast repetice a mezerníku, která je sekvenčně shodná s invazivním genetickým elementem, je přepisována proteiny Cas. Vedoucí sekvence v lokusu CRISPR je umístěna bezprostředně před první repeticí proti směru transkripce; pravděpodobně má funkci promotoru, který reguluje tvorbu pre-crRNA. Pre-crRNA je následně upravena do malých molekul RNA, crRNA, které obsahují sekvenci mezerníku ohraničenou dvěma částečnými repeticemi. U *E. coli* je úprava pre-crRNA prováděna multimerním komplexem proteinů Cas. Podobně je tomu u rodu *Pyrococcus*, kde se na úpravě podílí endoribonukleáza. Molekuly crRNA zavádějí komplex Cas k invadujícímu elementu. Systém CRIPR/Cas se váže jak k plus, tak k minus řetězci virové DNA a rozkládá ho. Není zatím potvrzeno, že by systém fungoval mechanismem RNA interference.

Systém CRISPR/Cas může působit jak na DNA, tak na RNA. V případě zacílení na RNA může ovlivnit stabilitu chromozómových elementů při transkripci (Obr. 7.9).

Obr. 7.9: Interference CRISPR/Cas, převzato z Horvath a Barrangou (2010).



Další literatura

L Sheilagh Molloy (2007): First evidence of prokaryotic RNAi? Nature Reviews Microbiology 5, 329.

Brouns et al. (2008): Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes, Science 321, 960-964.

Horvath, P. a Barrangou, R. (2010): CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea. Science 327, 167- 170