

Interferencja RNA: możliwości terapeutyczne

RNA interference: therapeutic options

Artur Cieślewicz¹, Hanna Kijak², Katarzyna Korzeniowska¹, Anna Jablecka¹

¹ Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

² Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie

Interferencja RNA (RNAi) jest naturalnym procesem polegającym na degradacji lub zahamowaniu ekspresji docelowego transkryptu przez specyficzne krótkie cząsteczki RNA (siRNA lub miRNA). Chroni ona genom przed wirusami oraz reguluje ekspresję genów. Z uwagi na wysoką specyficzność, mechanizm RNAi może znaleźć również zastosowanie w leczeniu chorób. Terapeutyczny efekt RNAi zaobserwowano zarówno w przypadku infekcji wirusowych, jak i chorób genetycznych i nowotworów. Coraz większa liczba badań klinicznych wykorzystujących RNAi sugeruje, że mechanizm ten będzie odgrywał coraz istotniejszą rolę w poprawie skuteczności terapii. (*Farm Współ 2013; 6: 89-93*)

Słowa kluczowe: interferencja RNA, RNAi, siRNA, miRNA, terapia

Summary

RNA interference (RNAi) is a natural process of degradation or expression inhibition of target transcript by specific short RNA molecules (siRNA or miRNA). It protects the genome from viruses and regulates the expression of genes. Due to high specificity, the mechanism of RNAi may also find use in the treatment of diseases. RNAi therapeutic effect was observed in case of viral infections, genetic diseases and cancer. Increasing number of clinical trials using RNAi suggests that this mechanism will play an increasingly important role in improving the effectiveness of therapy. (*Farm Współ 2013; 6: 89-93*)

Keywords: RNA interference, RNAi, siRNA, miRNA, therapy

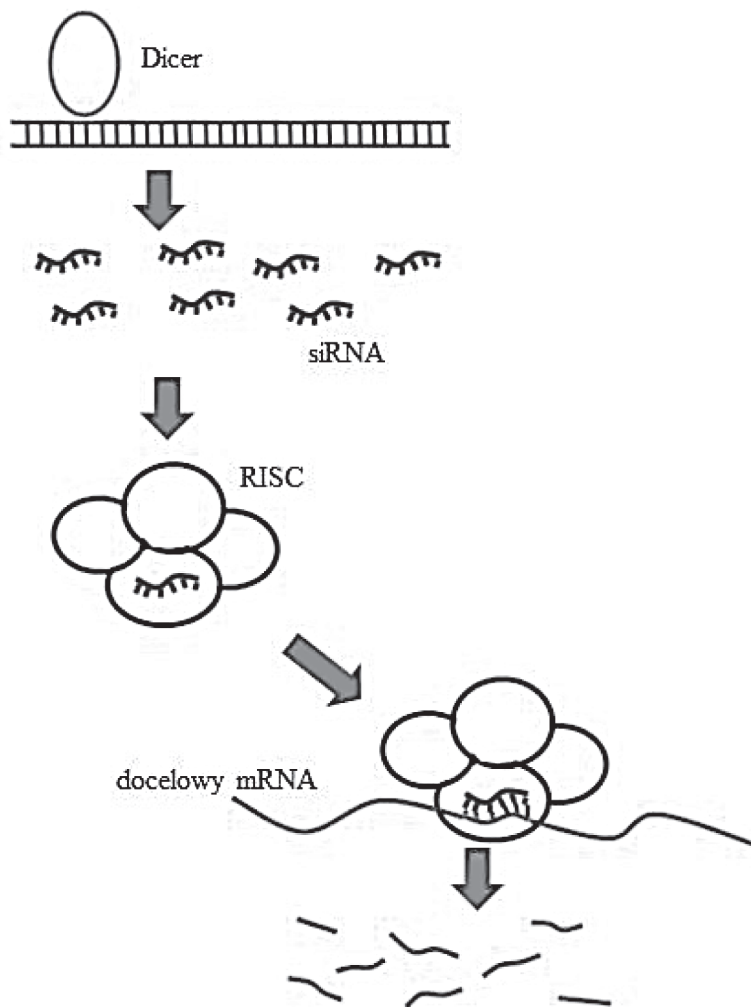
Mechanizm interferencji RNA

Interferencja RNA to naturalny proces, którego podstawową funkcją jest najprawdopodobniej ochrona genomu przed wirusami i transpozonami. Polega ona na degradacji lub zahamowaniu ekspresji docelowego transkryptu przez egzogenne wprowadzenie lub endogenną syntezę dwuniciowego RNA (dsRNA) o homologicznej sekwencji [1]. W zależności od tego, czy mamy do czynienia z egzo- czy endogennym dsRNA, wyciszanie genów realizowane jest przez cząsteczki siRNA (krótki interferujący RNA – ang. *short interfering RNA*) lub miRNA (mikro RNA).

Cząsteczki siRNA powstają przez pocięcie dsRNA (zazwyczaj genomu wirusa atakującego komórkę) przez

nukleazę Dicer na krótkie (ok. 21-nukleotydowe) jednoniciowe fragmenty. Powstały siRNA, przy udziale enzymu Dicer wiąże się z kompleksem efektorowym RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), mającym aktywność endonukleazy. Związany siRNA służy następnie do rozpoznania posiadających komplementarne sekwencje mRNA, które są przecinane przez RISC a następnie degradowane przez 5' i 3'-egzonukleazy [2]. Opisany powyżej mechanizm interferencji RNA z udziałem siRNA przedstawiono na rycinie 1.

miRNA to krótkie (ok. 22-nukleotydowe) cząsteczki jednoniciowego RNA powstające z dłuższych prekursorów w procesie dojrzewania [3,4]. Geny kodujące miRNA mogą stanowić ok. 1% wszystkich



Rycina 1. Mechanizm interferencji RNA z udziałem siRNA. Opis w tekście (Za: [2] zmienione)
 Figure 1. RNA interference mechanism involving siRNA. The description in the text ([2], modified)

sekwencji kodujących i w większości znajdują się w rejonach międzygenowych. Dość często są one także znajdowane w egzonach innych genów. Sekwencje genów miRNA mogą tworzyć zespoły, powstały RNA jest wtedy prekursorem dla wielu cząsteczek. Prekursor miRNA (pri-miRNA: ang. *primary micro RNA*) tworzy drugorzędową strukturę spinki do włosów, z której miRNA jest uwalniany przez kompleks zawierający m.in. białko wiążące dsRNA DGCR8 oraz enzym Drosha o aktywności RNazy.

Regulacja ekspresji genów przez miRNA może zachodzić poprzez degradację docelowej cząsteczki mRNA w podobny sposób jak ma to miejsce w przy-

padku siRNA, z tym, że w przypadku miRNA komplementarność do docelowego RNA nie jest całkowita. Innym sposobem jest represja translacyjna: przyłączenie miRNA do rejonu 3'UTR docelowego mRNA blokuje proces translacji białka oraz przyspiesza deadenylicację (degradacja łańcucha poliA na końcu 3' mRNA), powodując szybszą degradację mRNA [3-5].

Interferencja RNA, oprócz chronienia genomu przed wirusami, bierze również udział w regulacji ekspresji genów – wykazano m.in., że cząsteczki miRNA zaangażowane są w odpowiedź na stres oraz regulację szlaków metabolicznych. Ponadto, cząsteczki miRNA zlokalizowano także w rejonach związanych z nowo-

tworzeniem komórek, co może znaleźć zastosowanie w diagnostyce i terapii [4,6].

Projektowanie terapeutycznych RNA

Projektując RNA do celów terapeutycznych należy pamiętać, że cząsteczki dsRNA dłuższe niż 30 nukleotydów będą wywoływały silną reakcję immunologiczną, związaną z aktywnością RNA-zależnej kinazy białkowej (PKR), która aktywuje syntezę interferonu. Z kolei zachowanie specyficzności przyłączenia siRNA do konkretnego mRNA wymaga zaprojektowania cząsteczki o długości co najmniej 19 nukleotydów [7].

Terapeutyczne wykorzystanie mechanizmu interferencji RNA wymaga również efektywnego dostarczenia cząsteczek siRNA do docelowych komórek i tkanek. Wykazano, że dożylne podawanie nagich siRNA powoduje ich szybką degradację w narządach z rozwiniętym układem siateczkowo-śródbłonkowym, a także filtrację w kłębuszkach nerkowych i wydalenie z moczem [8]. Problem ten można rozwiązać, kompleksując siRNA ze specjalnymi nośnikami, takimi jak kationowe polimery i liposomy. Np. koniugowane z cholesterolem siRNA są lepiej przyswajalne przez wątrobę, ponieważ wiążą się z lipoproteinami o niskiej gęstości (LDL) [9,10]. Alternatywą jest użycie wektorów wirusowych, z których najbardziej godne uwagi wydają się być lentiwirusy (infekują komórki dzielące się, integrują z genomem gospodarza najczęściej w obrębie intronów, co ogranicza onkogenność). Zastosowanie wektorów wirusowych jest efektywniejsze od metod niewirusowych, jednakże problemem może być tutaj aktywacja odpowiedzi immunologicznej organizmu [9].

Wykorzystanie RNAi w terapii

Jednym z pierwszych badań klinicznych wykorzystujących mechanizm interferencji RNA było użycie siRNA przeciwko mRNA VEGF (czynnik wzrostu śródbłonka naczyń; ang. *vascular endothelial growth factor*) u chorych na zwyrodnienie plamki żółtej związane z wiekiem (AMD; ang. *age-related macular degeneration*). AMD jest przewlekłą postępującą chorobą, występującą u osób po 50 roku życia, której bezpośrednią przyczyną jest neowaskularyzacja siatekówki w wyniku działania VEGF. Po wstrzyknięciu zaprojektowanego siRNA do oczu pacjentów chorych na AMD zaobserwowano znaczącą poprawę lub stabilizację ostrości widzenia u większości badanych pacjentów. Jednakże późniejsze badania wykazały, że

efekt terapeutyczny nie był wynikiem specyficznego wyciszenia genu VEGF przez siRNA, lecz niespecyficznej aktywacji szlaku TLR-3, co spowodowało m.in. aktywację syntezy interferonu γ i interleukiny 12, które poprzez negatywną regulację VEGFu hamują angiogenezę [2,7,11].

Zmiany w ekspresji genów w komórkach nabłonka dróg oddechowych przyczyniają się do patogenezy wielu chorób, m.in. astmy, POChP (przewlekła obturacyjna choroba płuc), czy mukowiscydozy. Ponadto, komórki te są kluczowym miejscem interakcji pomiędzy organizmem a środowiskiem i wiele patogenów wirusowych w początkowym etapie cyklu życiowego replikuje właśnie w tych komórkach. Możliwość wyciszenia wirusowych genów w połączeniu z łatwym dostępem do dróg oddechowych (inhalacje) sprawia, że nabłonek dróg oddechowych stanowi atrakcyjny cel dla terapii wykorzystujących interferencję RNA. Badania na modelach zwierzęcych wykazały skuteczność terapii wykorzystującej RNAi w przypadku infekcji wirusem grypy, SARS, RSV i paragrypy [10,12-15]. W przypadku mukowiscydozy, najczęstszą przyczyną są mutacje genu CFTR (ang. *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator* – przezbłonowy regulator przewodnictwa), kodującego białko tworzące kanał chlorkowy. Badania wykazały także kluczową rolę nadaktywnego białka VCP/pr97, indukującego niszczenie kanałów chlorkowych. Eksperymenty na liniach komórkowych uzyskanych z nabłonka tchawicy chorych na mukowiscydozę wykazały, że wyciszenie ekspresji genu VCP/pr97 z użyciem siRNA przywraca komórkom zdolność transportowania jonów chlorkowych [7,16].

Podjęmowane są również próby wykorzystania interferencji RNA w leczeniu infekcji wirusowych, których terapia metodami konwencjonalnymi jest często nieskuteczna. Wiele takich badań skupia się na wirusie HIV – projektowane są siRNA skierowane przeciwko receptorowi wirusa oraz poszczególnym białkom wirusa. Z uwagi na wysokie tempo mutacji genomu HIV, razem z RNAi stosuje się też inne metody wyciszania wirusowych genów – np. opracowano wektor lentiwirusowy zawierający siRNA skierowany przeciwko transkryptowi genów *tat* (trans-aktywator transkrypcji) i *rev* (regulator ekspresji białek wirusowych) wirusa oraz dwa inhibitory bazujące na RNA (wabik TAR RNA oraz rybozym typu hammerhead skierowany przeciwko receptorowi CCR5). Podanie pacjentom komórek krwiotwórczych zmodyfikowanych przy użyciu tak przygotowanego wektora pozwo-

liło uzyskać dwuletnią ekspresję terapeutycznych RNA. Podobne badania przeprowadzono dla wirusa Ebola (siRNA przeciwko wirusowej polimerazie oraz białkom VP24 i VP35), wirusa zapalenia wątroby typu B i C (siRNA przeciwko wirusowej polimerazie oraz antygenom), a także wirusa opryszki (siRNA przeciwko wirusowemu genom UL27 i UL29 oraz receptorowi PVRL1 gospodarza) [10,17-21].

Interferencja RNA znajduje także zastosowanie w terapii zaburzeń neurologicznych. Badania na zwierzętach potwierdziły skuteczność siRNA w przypadku chorób związanych z ekspansją powtórzeń CAG, stwardnienia zanikowego bocznego, choroby Parkinsona i choroby Alzheimera. Z uwagi na utrudniony dostęp do komórek ośrodkowego układu nerwowego (bariera krew-mózg), najpraktyczniejszą metodą wyciszania docelowych komórek nerwowych jest bezpośrednie wstrzyknięcie siRNA [10,22-25].

Prowadzone są również badania dotyczące wykorzystania mechanizmu RNAi w terapii zaburzeń metabolicznych – m.in. poprzez zastosowanie siRNA wyciszających ekspresję genów apolipoproteiny B (APOB) oraz probiałkowej konwertazy subtylizyny/keksyny typu 9 (PCSK9). Eksperymenty na zwierzętach wykazały znaczące obniżenie poziomu LDL w surowicy, zaś pierwsze testy na ludziach pokazały, że zastosowany siRNA jest dobrze tolerowany [10,26,27].

Interferencja RNA może także znaleźć zastosowanie w terapii nowotworów (wyciszanie onkogenów). Mutacje genu k-ras znajdujące się w 90% przypadków raka trzustki i odgrywają kluczową rolę w jego zło-

śliwości. Badania na myszach wykazały pozytywny wpływ siRNA skierowanego przeciwko genowi k-ras (ang. *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) (zmniejszanie masy guza). Podobny efekt zaobserwowano wyciszając ekspresję genów PLK1 (ang. *polo-like kinase 1*) oraz KSP (ang. *kinesin spindle protein*) w przypadku raka wątroby [28,29].

Podsumowanie

Interferencja RNA jest nowym odkryciem, dlatego też dopiero poznawane są możliwości terapeutycznego wykorzystania tego mechanizmu. Możliwość precyzyjnego wyciszania specyficznych genów wywołujących choroby genetyczne lub onkogenów odpowiedzialnych za transformację nowotworową daje nadzieję wielu pacjentom, których schorzenia były dotychczas nieuleczalne. Coraz większa liczba badań klinicznych wykorzystujących RNAi sugeruje, że mechanizm ten będzie odgrywał coraz istotniejszą rolę w poprawie skuteczności terapii.

Konflikt interesów/Conflict of interest

Brak/None

Adres do korespondencji:

✉ Artur Cieślewicz
Zakład Farmakologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu
ul. Długa 1/2; 61-848 Poznań
☎ (+48 61) 854 92 16
✉ artcies@gmail.com

Piśmiennictwo

1. Józwiak P, Lipińska A. Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2010;64:504-12.
2. Fitzgerald-Hayes M, Reichsman F. *DNA and biotechnology*. Third Edition. Academic Press, Elsevier Inc., 2010.
3. Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci* 2003;28(10):534-40.
4. Zhu JY, Pfuhl T, Mutsch N, Barth S, Nicholls J, Grässer F, Meister G. Identification of Novel Epstein-Barr Virus MicroRNA Genes from Nasopharyngeal carcinomas. *Journal of Virology* 2009;83(7):3333-41.
5. Quintana ML, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA Society* 2003;9:175-9.
6. Gottesman S, McCullen CA, Guillier M, Vanderpoll CK, Majdalani N, Benhammou J, et al. Small RNA Regulators and the Bacterial Response to Stress. *Cold Spring Harb Symp Quant Bio* 2006;71:1-11.
7. Pitrowska A, Rybarczyk A, Wierzbicki P, Kotwas M, Wrońska A, Kmiec Z. Interferencja RNA – mechanizm i możliwości terapeutycznego wykorzystania. *Pol Ann Med* 2009;16(1):138-47.
8. Akhtar S, Benter IF. Nonviral delivery of synthetic siRNAs in vivo. *J Clin Invest* 2007;117:3623-32.

9. Józwiak P, Lipińska A. Zastosowanie interferencji RNA w diagnostyce i terapii niektórych chorób człowieka. *Postepy Hig Med Dosw (online)* 2010;64:504-12.
10. Davidson BL, McCray PB. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nature Review Genetics* 2011;12:29-40.
11. Kleinman ME, Yamada K, Takeda A, Chandrasekaran V, Nozaki M, Baffi JZ, et al. Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3. *Nature* 2008;452(7187):591-7.
12. Bitko V, Musiyenko A, Shulyayeva O, Barik S. Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nature Med* 2005;11:50-5.
13. Tompkins SM, Lo CY, Tumpey TM, Epstein SL. Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:8682-6.
14. Ge Q, Filip L, Bai A, Nguyen T, Eisen HN, Chen J. Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(23):8676-81.
15. Li BJ, Tang Q, Cheng D, Qin C, Xie FY, Wei Q, et al. Using siRNA in prophylactic and therapeutic regimens against SARS coronavirus in Rhesus macaque. *Nat Med* 2005;11(9):944-51.
16. Vij N, Fang S, Zeitlin PL. Selective inhibition of endoplasmic reticulum-associated degradation rescues DeltaF508-cystic fibrosis transmembrane regulator and suppresses interleukin-8 levels: therapeutic implications. *J Biol Chem* 2006;281:17369-78.
17. DiGiusto DL, Krishnan A, Li L, Li H, Li S, Rao A, et al. RNA-based gene therapy for HIV with lentiviral vector-modified CD34(+) cells in patients undergoing transplantation for AIDS-related lymphoma. *Sci Transl Med* 2010;2(36):36ra43.
18. Geisbert TW, Lee AC, Robbins M, Geisbert JB, Honko AN, Sood V, et al. Postexposure protection of non-human primates against a lethal Ebola virus challenge with RNA interference: a proof-of-concept study. *Lancet* 2010;375(9729):1896-905.
19. McCaffrey AP, Nakai H, Pandey K, Huang Z, Salazar FH, Xu H, et al. Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol* 2003;21(6):639-44.
20. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100(4):2014-8.
21. Wu Y, Navarro F, Lal A, Basar E, Pandey RK, Manoharan M, et al. Durable protection from Herpes Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe* 2009;5(1):84-94.
22. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004;10(8):816-20.
23. Ralph GS, Radcliffe PA, Day DM, Carthy JM, Leroux MA, Lee DC, et al. Silencing mutant SOD1 using RNAi protects against neurodegeneration and extends survival in an ALS model. *Nat Med* 2005;11(4):429-33.
24. Sapru MK, Yates JW, Hogan S, Jiang L, Halter J, Bohn MC. Silencing of human alpha-synuclein in vitro and in rat brain using lentiviral-mediated RNAi. *Exp Neurol* 2006;198(2):382-90.
25. Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, et al. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 2005;8(10):1343-9.
26. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006;441(7089):111-4.
27. Frank-Kamenetsky M, Grefhorst A, Anderson NN, Racie TS, Bramlage B, Akinc A, et al. Therapeutic RNAi targeting PCSK9 acutely lowers plasma cholesterol in rodents and LDL cholesterol in nonhuman primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(33):11915-20.
28. Réjiba S, Wack S, Aprahamian M, Hajri A. K-ras oncogene silencing strategy reduces tumor growth and enhances gemcitabine chemotherapy efficacy for pancreatic cancer treatment. *Cancer Sci* 2007;98(7):1128-36.
29. Judge AD, Robbins M, Tavakoli I, Levi J, Hu L, Fronda A, et al. Confirming the RNAi-mediated mechanism of action of siRNA-based cancer therapeutics in mice. *J Clin Invest* 2009;119(3):661-73.