



Krótkie interferujące RNA jako narzędzia do sekwencyjno-specyficznego wyciszania ekspresji genów

Małgorzata Sierant, Barbara Nawrot

Centrum Badań Molekularnych i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk, Łódź

Short interfering RNAs as tools for sequence-specific gene silencing

Summary

In diverse eukaryotes, dsRNA triggers the destruction of mRNA sharing the same sequence as the dsRNA in the process called RNAi. The guides for sequence-specific degradation of mRNA are 21 nt short interfering RNAs (siRNAs). Synthetic siRNAs can efficiently mediate RNAi, but a drawback of RNAi is its transient nature as a result of the limited availability and stability of synthetic oligonucleotides. Recently, several groups reported the construction of expression plasmid vectors that mediate the production of siRNAs under control of Pol III promoters. These vectors allow the continued expression of siRNAs in the cells resulting in persistent and specific suppression of target genes. The retroviral siRNA expressing system allows for stable inactivation of the genes in primary cells or living organisms.

Key words:

RNA interference (RNAi), short interfering RNA (siRNA), sequence design of siRNA, RNA polymerase III promoter, siRNA expression vectors.

Adres do korespondencji

Małgorzata Sierant,
Centrum Badań
Molekularnych
i Makromolekularnych,
Polska Akademia Nauk,
ul. Sienkiewicza 112,
90-363 Łódź;
e-mail
msierant@bio.cbmm.lodz.pl

biotechnologia

2 (61) 84-103 2003

1. Wprowadzenie

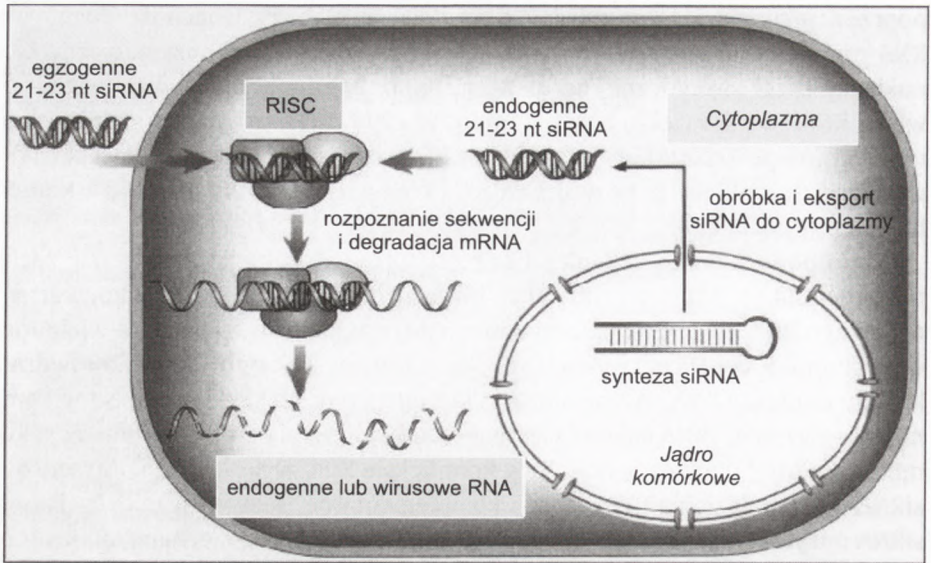
Komórki eukariotyczne wyposażone są w system zabezpieczający ich genom przed inwazją obcych elementów genetycznych, takich jak wirusy i transpozony. Pojawienie się dwuniciowego RNA jest interpretowane przez komórkę jako sygnał do aktywacji procesów hamowania ekspresji niepożądanego genu. Zjawisko interferencji RNA polega na wyciszaniu ekspresji genów

poprzez sekwencyjno-specyficzną degradację mRNA (1). Obecność dwuniciowego RNA powoduje uruchomienie komórkowych mechanizmów enzymatycznych: rybonukleazy Dicer specyficznej do dsRNA (2) i kompleksu nukleazowego RISC (3). Zjawisko RNAi, aczkolwiek odkryte dopiero w 1998 r. (1), uznano za stary mechanizm obronny, rozpowszechniony w wielu organizmach eukariotycznych: roślinach (PTGS), grzybach strzępkowych, bezkręgowcach i kręgowcach, w tym również w komórkach ludzkich (4,5).

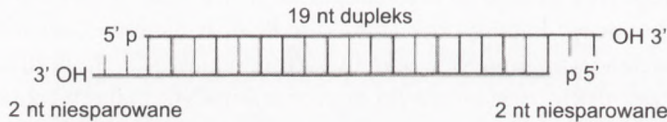
Zaproponowano co najmniej dwa mechanizmy, według których może zachodzić ten proces (4-6). W pierwszym z nich inicjacja RNAi następuje przez konwersję dwuniciowego RNA do 21-23-nukleotydowych (nt) fragmentów za pomocą wielodomenowej rybonukleazy Dicer, wywodzącej się z rodziny RNazy III. Produkty hydrolizy – krótkie dupлексы RNA, zwane siRNA (*short interfering RNA*), włączane są w kompleks nukleazowy RISC (*RNA-induced silencing complex*) i kierują go do docelowej sekwencji mRNA. Endorybonukleaza obecna w kompleksie RISC wykorzystuje antysensową nić siRNA do odnalezienia i degradacji komplementarnej sekwencji mRNA, dlatego też siRNA nazywany jest dupлексыem kierującym. Specyficzność mechanizmu RNAi opiera się na dokładnym sparowaniu antysensowej nici siRNA z docelowym mRNA (7). Drugi mechanizm działania RNAi, zaproponowany przez Lipardi i wsp. (8), Sijen i wsp. (9), Nishikura i wsp. (10), polega na tzw. „degradacyjnym PCR”. W mechanizmie tym próbuje się wytłumaczyć katalityczny charakter RNAi u nicienia *Caenorhabditis elegans*, jedną z najbardziej intrygujących właściwości tego zjawiska. Stwierdzono, że jedynie kilka cząsteczek dsRNA wystarcza do degradacji mRNA. Inaktywacja ekspresji danego genu u nicienia *C. elegans* utrzymuje się podczas podziałów komórkowych, przenoszona jest do nietransfekowanych komórek i tkanek, jak również pojawia się w następnym pokoleniu (1). Zaproponowano, że polimeraza RNA zależna od RNA (RdRp, *RNA-dependent RNA polymerase*) na matrycy mRNA syntetyzuje nić komplementarną, tworząc nowy dwuniciowy RNA, rozpoznawany i hydrolizowany przez rybonukleazę Dicer. W ten sposób tworzona jest nowa generacja siRNA. Starterem w reakcji polimeryzacji jest antysensowa nić siRNA. Grupa hydroksylowa, obecna na końcu 3' nici antysensowej siRNA jest bardzo istotna dla opisanego procesu polimeryzacji. Zablockowanie tej grupy poprzez wprowadzenie modyfikacji (np. poprzez jej fosforylację) całkowicie hamuje proces amplifikacji dsRNA u *C. elegans* (8). W badaniach przeprowadzonych w komórkach owadzi i ssaczy, polegających na zablockowaniu grupy 3'-hydroksylowej poprzez wprowadzanie różnych modyfikacji na końcach 3' siRNA (6,7,11), oraz transfekcji takich dupлексыów do komórek, nie wykazano wpływu tych modyfikacji na wydajność RNAi. Oznacza to, że w komórkach *Drosophila melanogaster* i komórkach ssaków proces RNAi nie zachodzi według mechanizmu „degradacyjnego PCR”. Ponadto, w komórkach ssaczy, jak dotąd, nie zidentyfikowano genu kodującego polimerazę RdRp. Pomiedzy różnymi gatunkami istnieją, jak się wydaje, zasadnicze różnice w mechanizmie wyciszania ekspresji genów.

U ssaków długi dwuniciowy RNA (>30 nt) wywołuje genowo-specyficzną interferencję w komórkach rozrodczych, wczesnych embrionach (komórki nowotworowe

A.



B.



Rys. 1. Mechanizm RNAi w komórkach ssaczych. A. siRNA mogą być wprowadzone do komórki egzogenicznie (siRNA syntetyzowane chemicznie, generowane w wyniku transkrypcji *in vitro* lub poprzez enzymatyczną hydrolizę długiego dsRNA) lub wytwarzane endogenicznie w jądrze komórkowym na matrycy kodujących je plazmidów. Egzogenne dupлексы natychmiast są włączane w proces RNAi, natomiast endogenne siRNA są eksportowane do cytoplazmy, gdzie ulegają obróbce (hybrydyzacja nici, hydroliza prekursorowych struktur shRNA) i wchodzą na szlak RNAi tzn. są włączane w kompleks nukleazowy RISC, rozpoznają sekwencję mRNA i prowadzą do jego degradacji. B. Schematyczne przedstawienie siRNA. Dwie nici dupлексу o długości 21-23 nt, tworzą 19 nt strukturę dwuniciową. Na końcu 3' obu nici znajdują się po dwa niesparowane nukleotydy. Charakterystyczna jest obecność grupy fosforanowej na końcach 5' obu nici i wolnej grupy hydroksylowej na końcach 3'.

i normalne) oraz w tych komórkach somatycznych, które nie są wyposażone w system odpowiedzi immunologicznej (12-16). Jednak w większości komórek somatycznych oprócz efektu RNAi długi dwuniciowy RNA wywołuje szereg niespecyficznych odpowiedzi. Aktywacja PKR – kinazy białkowej zależnej od RNA, 2'-5'-syntetazy oligoadenylanowej i interferonów (IFN α i β) powoduje zahamowanie procesu syntezy białek komórkowych, niespecyficzną degradację RNA komórkowego i w konsekwencji prowadzi do apoptozy (13). Uważa się, że w komórkach ssaków RNAi nie jest naturalnym mechanizmem hamowania ekspresji genów. Z kilkoma wyjątkami (14-16) długi, dwuniciowy RNA jest aktywatorem apoptozy. Tuschl i wsp. (12,17)

udowodnili, że w komórkach ssaków można uzyskać genowo-specyficzną supresję poprzez efekt RNAi, stosując syntetyczne siRNA. Dupleksy te doskonale naśladują naturalne produkty rybonukleazy Dicer, są rozpoznawane przez kompleks nukleazowy RISC i zostają włączone w dalsze etapy procesu RNAi (rys. 1). Ze względu na swą długość, 21-23 nt dupleksy nie wywołują niespecyficznego odpowiedzi komórkowych. siRNA indukują wyciszenie zarówno egzogennych jak i endogennych genów. Mechanizm RNAi może być, jak się wydaje, zastosowany do hamowania ekspresji każdego niepożądanego genu (18). Zjawisko RNAi jest zatem użytecznym narzędziem molekularnym, zarówno w aspekcie analizy funkcji genów, jak i o znaczeniu terapeutycznym do hamowania ekspresji genów białek chorobotwórczych.

2. Charakterystyka siRNA

Natywne siRNA, będące produktami nukleolitycznej degradacji długiego dsRNA przez rybonukleazę Dicer, mają charakterystyczną budowę. Obie nici RNA o długości 21-23 nt, tworzą dupleks na odcinku 19 nt, pozostawiając na każdym końcu 3' po dwa lub więcej niesparowane nukleotydy. Charakterystyczną cechą zjawiska RNAi jest sekwencyjna specyficzność. Antysensowa nić siRNA tworzy w pełni komplementarny dupleks z docelowym mRNA (asRNA/mRNA). Jakiegokolwiek modyfikacje w obrębie nici antysensowej siRNA powodują obniżenie wydajności procesu RNAi lub też całkowity zanik tego zjawiska. siRNA posiadają na końcach 3' wolną grupę hydroksylową, a na końcach 5' grupę fosforanową (17,19). Zadano sobie pytanie, czy obecność tych grup jest konsekwencją mechanizmu nukleazy Dicer, czy też grupy te mają jakieś szczególne znaczenie dla któregoś z dalszych etapów procesu RNAi.

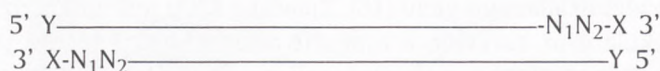
2.1. Funkcja grupy 5'-fosforanowej dla aktywności siRNA

Wprowadzenie modyfikacji końca 5', np. przez przyłączenie grupy 3-aminopropylfosforanowej (7), lub grupy O-metylowej (6,7), nie ogranicza efektywności procesu RNAi jeśli modyfikacja dotyczy nici sensowej, natomiast modyfikacja nici antysensowej prowadzi do zaniku procesu RNAi (tab. 1A). Wynik ten wskazuje, że koniec 5' nici antysensowej siRNA pełni istotną funkcję w procesie RNAi. Tuschl i wsp. (17) sugerują, że miejsce hydrolizy mRNA jest zależne od położenia końca 5' nici antysensowej siRNA, a 5'-terminalna grupa fosforanowa jest „molekularnym punktem odniesienia”, od którego mierzone jest miejsce hydrolizy mRNA. Syntetyczne siRNA, posiadające na końcu 5' grupę hydroksylową, podane do komórek *Drosophila melanogaster*, wydajnie hamują ekspresję genów zarówno egzo- jak i endogennych (17) oraz wywołują efekt RNAi w liniach komórek ssaczych (12). Wykazano, że siRNA ulegają wewnątrzkomórkowej fosforylacji na końcach 5'. W eksperymentach prowa-

dzonych w warunkach *in vitro* stwierdzono aktywność kinazową ekstraktów komórkowych w stosunku do syntetycznych siRNA (20).

Tabela 1

Tolerancja RNAi na modyfikacje i mutacje w niciach siRNA



A. Modyfikacja końca 5'

Rodzaj modyfikacji Y	Gen/ linia komórkowa	Wpływ modyfikacji na RNAi	Literatura
Y=OH	– <i>Pp-luc/Drosophila S2</i> , HeLa	nie obniża aktywności dupleksu. 5'-końcowa grupa hydroksylowa jest szybko fosforylowana przez wewnątrzkomórkową kinazę	(12,20,27)
Y=OMe	– <i>Pp-luc/HeLa S100</i> , <i>Drosophila S2</i>	modyfikacja w nici antysensowej całkowicie hamuje proces RNAi	(6)
Y=3-aminopropylfosforan	– <i>gfp/HeLa</i>	modyfikacja w nici sensowej nie ma wpływu na przebieg RNAi, modyfikacja w nici antysensowej całkowicie znosi efekt RNAi	(7)

B. Modyfikacja końca 3'

Rodzaj modyfikacji N ₁ N ₂ -X	Gen/ linia komórkowa	Wpływ modyfikacji na RNAi	Literatura
1	2	3	4
N ₁ N ₂ =TT	– <i>bTF/HeCaT</i>	identyczna aktywność wyciszania ekspresji genu dla dupleksów posiadających na końcach 3' dwa rybonukleotydy lub dwie reszty tymidylowe (dane identyczne dla siedmiu różnych dupleksów)	(11)
X=OH	– <i>Pp-luc/Drosophila S2</i> , – <i>Pp-luc/NIH/3T3</i> , BHK-21, CHO-K1, COS-7, HEK293, HeLa S3, – <i>jdkp-2/RAW264.7</i> , NIH3T3 – <i>Pp-luc/HeLa</i> , Ntera2D1	wprowadzenie modyfikacji w nici sensowej nie powoduje obniżenia efektu RNAi (>90% wyciszenia); podobna modyfikacja w nici antysensowej hamuje efekt RNAi (45-50 % wyciszenia)	(12) (26) (27) (23)
X=fluoresceina	– <i>bTF/HeCaT</i>	aktywność zmodyfikowanego dupleksu w niewielkim stopniu niższa w stosunku do niemodyfikowanego	(11)
X=puromycyna	– <i>gfp/HeLa</i>	modyfikacja w nici sensowej, lub modyfikacja w nici antysensowej dupleksu tylko w niewielkim stopniu obniża efekt RNAi	(7)
X=biotyna	– <i>gfp/HeLa</i>	modyfikacja w nici antysensowej nie znosi efektu RNAi jedynie w niewielkim stopniu obniża wydajność wyciszania	(7)
N ₂ =2',3' dideoksynukleotydy	– <i>Pp-luc/HeLa S100</i> , <i>Drosophila S2</i>	modyfikacja w nici antysensowej nie wpływa na wydajność procesu RNAi	(6)

1	2	3	4
x=3-aminopropyl fosforan	- <i>Pp-luc</i> /HeLa S100, <i>Drosophila</i> S2	modyfikacja w nici antysensowej nie wpływa na wydajność procesu RNAi	(6)
N ₂ =2'-O,4-C-etyleno-tymidyna (eT)	- <i>jdp-2</i> /RAW264.7, NIH3T3	modyfikacja w nici sensowej nie wpływa na jakość procesu RNAi, modyfikacja w nici antysensowej lub w obydwu niciach siRNA całkowicie hamuje RNAi	(26)
N ₂ =2-hydroksy-etylofosforan tymidyny (hp)	- <i>jdp-2</i> /RAW264.7, NIH3T3	modyfikacja w nici sensowej nie wpływa na jakość procesu RNAi, modyfikacja w nici antysensowej lub w obydwu niciach siRNA całkowicie hamuje RNAi	(26)

C. Modyfikacja wewnątrz nici dupleksu

Rodzaj modyfikacji	Gen/ linia komórkowa	Wpływ modyfikacji na RNAi	Literatura
mutacje nukleotydowe	- <i>bTF</i> /HaCaT	pojedyncza lub podwójna mutacja w centrum nici sensowej, jak również pojedyncza mutacja w nici antysensowej są tolerowane i tylko w niewielkim stopniu wpływają na obniżenie efektu RNAi; podwójna mutacja w centrum nici antysensowej całkowicie znosi efekt RNAi	(11)
DNA/RNA	- <i>bTF</i> /HaCaT	zamiana rybonukleotydowej nici sensowej na nić deoksyrybonukleotydową w dużym stopniu hamuje lub całkowicie znosi efekt RNAi	(11)
	- <i>Pp-luc</i> /HeLa, NTera2D1	hybryd DNA/RNA indukuje średni poziom aktywności RNAi, gdy nić antysensowa RNA posiada nie zmodyfikowany koniec 3' (UU); modyfikacja 3' (TT) w nici antysensowej powoduje zanik aktywności RNAi	(23)
RNA/DNA	- <i>bTF</i> /HaCaT, - <i>Pp-luc</i> /HeLa, NTera2D1	zamiana nici antysensowej RNA na nić DNA całkowicie hamuje proces RNAi	(11) (23)
sieciowanie nici dupleksu psoralenem / UV(320-400 nm)	- <i>gfp</i> /HeLa	kowalencyjne połączenie obu nici dupleksu nie znosi efektu RNAi, ale znacznie obniża. Podano hipotezę, że jeśli wiązanie znajduje się blisko końca 5' nici antysensowej lub w centrum dupleksu wówczas efekt RNAi zanika. Jeżeli natomiast nici połączone są blisko końca 3' nici antysensowej to dupleks zachowuje aktywność i może wywołać efekt RNAi	(7)

2.2. Wpływ modyfikacji grupy 3'-hydroksylowej na aktywność siRNA

Podstawienie 3'-terminalnej grupy hydroksylowej nici sensowej i antysensowej siRNA resztą fluoresceiny (11), puromycyny czy biotyną (7), lub też wprowadzenie 3'-terminalnego 2',3'-dideoksynukleotydu lub grupy 3-aminopropylfosforanowej

(6) nie powoduje zahamowania efektu RNAi (tab. 1B). Wyniki te zaprzeczają proponowanemu początkowo mechanizmowi amplifikacji dsRNA w systemie komórek ssaczych poprzez wydłużenie końca 3' nici antysensowej za pomocą polimerazy RdRp (8-10). Oczywiście jest, że zablokowanie grupy 3'-hydroksylowej nici antysensowej siRNA uniemożliwia wykorzystanie tej nici jako startera w reakcji amplifikacji. Sugeruje to, że w komórkach ssaków RNAi zachodzi według innego mechanizmu, lub też nie ma charakteru katalitycznego.

2.3. Zastosowanie nici antysensowej siRNA do wyciszania ekspresji wybranego genu

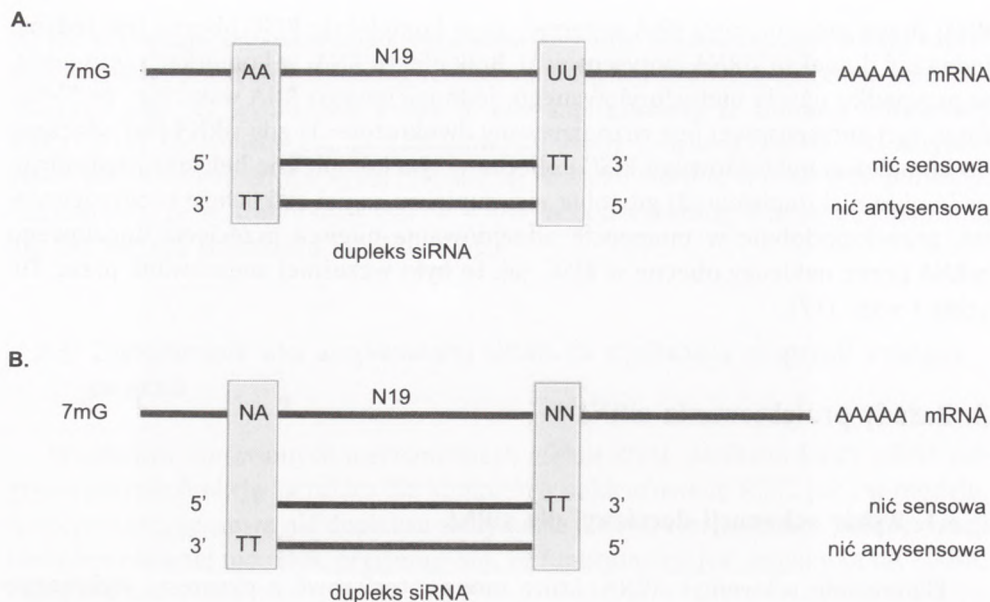
W obydwu omówionych mechanizmach efektu RNAi, zarówno kiedy siRNA odgrywa jedynie funkcję kierującą dla kompleksu nukleazowego RISC, jak i w modelu, w którym antysensowa nić dupleksu służy także jako starter w reakcji polimeryzacji komplementarnej nici RNA, przyjmuje się, że funkcjonalną jest jedynie ta nić siRNA, która jest komplementarna do mRNA. Przeprowadzono eksperymenty mające wyjaśnić czy jednoniciowe cząsteczki RNA, podobnie jak siRNA, mogą wywołać proces RNAi w lizatach komórek *Drosophila* i w ekstraktach S100 z komórek HeLa (6). Stwierdzono, że syntetyczny, jednoniciowy, antysensowy RNA nie jest aktywny w komórkach *Drosophila*. Niewielki efekt wyciszania ekspresji genu ujawnia się, gdy koniec 5' syntetycznego oligonukleotydu jest fosforylowany *in vitro*, jednak efekt ten jest niższy od wywołanego siRNA, użytym w tym samym stężeniu. Przecięcie docelowego mRNA w tym doświadczeniu zachodzi precyzyjnie w tym samym miejscu, co wskazuje, że jednoniciowy RNA wchodzi na drogę RNAi. Potwierdzeniem jest fakt, że taka sama sekwencja jednoniciowego RNA, posiadająca na końcu 5' grupę O-metylową nie wywołuje degradacji docelowego mRNA. Wymienione doświadczenia wskazują, po pierwsze, że w komórkach owadzych jednoniciowy RNA nie wywołuje efektu RNAi, jeśli nie posiada grupy fosforanowej na końcu 5'. Po drugie, wysunięto hipotezę, że jednoniciowy RNA, zawierający grupę 5'-hydroksylową nie jest prawdopodobnie substratem dla kinazy obecnej w komórkach *Drosophila*, dlatego też taki oligonukleotyd nie może być fosforylowany wewnątrzkomórkowo. Niższą efektywność jednoniciowego, antysensowego RNA, w porównaniu z dupleksem siRNA, tłumaczy się krótkim czasem półtrwania takiego RNA w komórce. Już po dwóch minutach inkubacji większość jednoniciowego RNA zostaje zdegradowana (6). Jest prawdopodobne, że tylko niewielka część 5'-fosforylowanego RNA jest zabezpieczana przed degradacją poprzez włączenie do kompleksu nukleazowego RISC. W ekstraktach S100 z komórek HeLa istnieje aktywność kinazowa, fosforylująca jednoniciowy RNA. Efekt RNAi jest wywołany za pomocą jednoniciowego RNA, posiadającego 5'-końcową grupę hydroksylową lub grupę fosforanową (6). Podobnie jak w komórkach owadzych zablokowanie końca 5' RNA poprzez wprowadzenie grupy O-metylowej konsekwentnie blokuje efekt RNAi. Indukcja procesu

RNAi przez jednoniciowy RNA sugeruje, że w kompleksie RISC obecna jest jedynie jedna nić dupleksu siRNA (antysensowa). Brak efektu RNAi w komórkach *Drosophila*, w przypadku użycia niefosforylowanego, jednoniciowego RNA wskazuje, że 5'-fosforan nici antysensowej jest rozpoznawany dwukrotnie: 1) gdy siRNA jest włączany do kompleksu nukleazowego RISC i obecna w tym kompleksie helikaza rozdysocjuje obie nici dupleksu, 2) gdy obie nici dupleksu są już całkowicie rozdysocjowane, prawdopodobnie w momencie odnajdowania miejsca przecięcia docelowego mRNA przez nukleazy obecne w RISC, jak to było wcześniej sugerowane przez Tuschla i wsp. (17).

3. Zasady projektowania siRNA

3.1. Wybór sekwencji docelowej dla siRNA

Planowanie sekwencji siRNA, które mogą interferować z ekspresją wybranego genu wymaga wiedzy na temat sekwencji kodującego mRNA. RNAi jest procesem cytoplazmatycznym (21,22), dlatego też siRNA nie może być skierowany na sekwencje intronowe pre-mRNA, którego dojrzewanie zachodzi w jądrze. Musi być skierowany na sekwencje kodujące genu. Informację na temat sekwencji dojrzałego mRNA większości genów można znaleźć np. w bazie danych GeneBank (www.ncbi.nlm.nih.gov). siRNA o sekwencjach homologicznych do różnych miejsc mRNA tego samego genu mogą indukować zróżnicowany poziom ekspresji genu (11,23,24), co związane jest z różną dostępnością poszczególnych fragmentów mRNA dla hybrydyzacji z DNA lub RNA. Dostępność ta określona jest drugo- i trzeciorzędową strukturą mRNA oraz obecnością czynników białkowych wiążących mRNA (25). Nie wyklucza się również zależności aktywności siRNA od jego sekwencji, w szczególności zawartości nukleotydów G/C, która może wpływać na szybkość fosforylacji końca 5' antysensowej nici siRNA (24). Hohen i wsp. (11) przeprowadzili systematyczną analizę różnic w aktywności siRNA, o sekwencjach homologicznych do mRNA białka hTF (*human Tissue Factor*). siRNA, skierowane na różne sekwencje docelowe tego samego mRNA, wykazywały znaczne różnice w stopniu wyciszania wybranego genu (od 80% dla najbardziej aktywnego dupleksu do 20% dla dupleksu skierowanego na sekwencję mRNA przesuniętą o 6 nt). Selekcja sekwencji docelowej dokonywana jest zatem doświadczalnie, metodą prób i błędów. W miarę możliwości wybieramy sekwencję odległą o 50-100 nt od miejsca inicjacji translacji, unikając rejonów bliskich kodonowi START (AUG) lub sekwencji niekodujących (5' lub 3' UTR, *untranslated region*), które zwykle są bogate w sekwencje wiążące białka regulatorowe, powodując, że kompleks RISC ma utrudniony dostęp do docelowego mRNA. Preferowany jest wybór sekwencji siRNA, posiadającej na końcach 3' dwie reszty urydylowe. W przypadku syntetyzowanych chemicznie dupleksów, mogą być one zastąpione przez reszty tymi-



Rys. 2. Projektowanie sekwencji syntetycznych siRNA. A. Wybór sekwencji docelowej mRNA typu AA(N19)UU i projektowanie odpowiedniej sekwencji siRNA. B. Projektowanie siRNA w przypadku braku sekwencji mRNA wymienionej w p. A. siRNA z dwoma tymidynami na końcach 3' nie zmieniają aktywności w procesie RNAi dopóki choć jedna adenozyzna jest obecna w zaznaczonym fragmencie mRNA.

dyłowe, co nie zmienia aktywności dupleksów, natomiast zmniejsza koszty syntezy i zwiększa odporność dupleksów na degradację nukleolityczną (11,12,22). W sekwencji mRNA szukamy motywów 5'-AA(N19)UU-3', 5'-AA(N21)-3' lub 5'-NA(N21)-3' (rys. 2). Obydwie nici, sensowa i antysensowa, mają wówczas sekwencje 5'-(N19)TT-3'. Zawartość G/C w projektowanych sekwencjach nie powinna zasadniczo przekraczać 30-40%, chociaż dupleksy o wyższej zawartości G/C również mogą być bardzo aktywne (22). Należy unikać sekwencji bogatych w G zdolnych do tworzenia struktur tetrapleksowych. Zaleca się wybór i syntezy kilku siRNA skierowanych na ten sam gen, gdyż mogą one wykazywać różne aktywności w procesie wyciszania jego ekspresji. Baza danych BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) pozwala na kontrolę czy wybrane sekwencje obecne są wyłącznie w wybranym genie.

3.2. Projektowanie optymalnej długości nici, liczby 3'-końców, niesparowanych nukleotydów, akceptowane modyfikacje

Przeprowadzono systematyczną analizę pozwalającą określić optymalną długość nici, liczbę niesparowanych nukleotydów na końcu 3', potencjalne modyfikacje, które mogą być wprowadzone do nici siRNA oraz ich wpływ na wydajność procesu RNAi

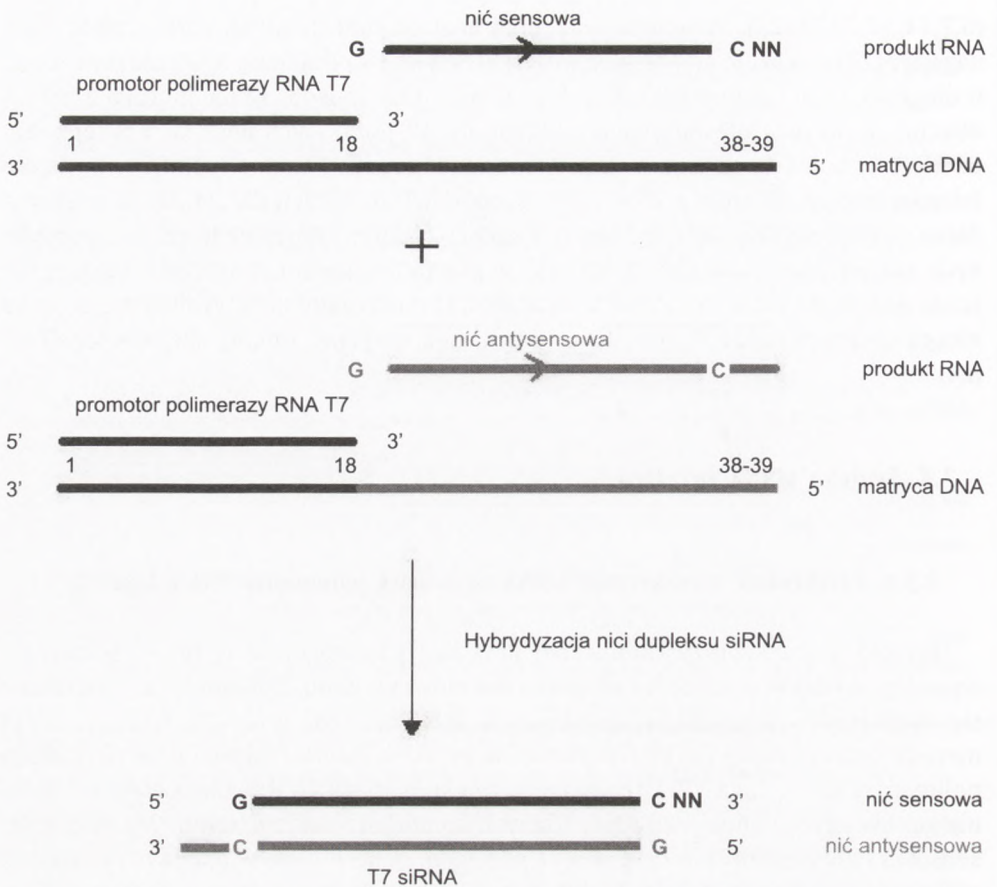
(6,7,11,12,23,26,27). W przeprowadzonej analizie funkcji siRNA w *Drosophila melanogaster* (27) wskazuje się, że najbardziej efektywne są dupлексы RNA, złożone z nici o długości 21 nt, zhybrydizowanych ze sobą w taki sposób, że na końcach 3' siRNA obecne są po dwa niesparowane nukleotydy. W podobnych analizach przeprowadzonych w komórkach ssaków dowiedziono, że nie ma aż takich różnic w wydajności jako funkcji długości siRNA, jak w komórkach owadzych (22,24,28). Bardzo wydajne są dupлексы posiadające nici o długości 21-29 nt. Również liczba niesparowanych nukleotydów na końcu 3' obu nici w przypadku komórek ssaczy nie jest tak ściśle określona jak w komórkach owadzych. Dopuszczalne jest wydłużenie odcinka niesparowanych nukleotydów do czterech, bez znacznej zmiany aktywności siRNA (24).

3.3. Synteza siRNA *in vitro*

3.3.1. Uzyskiwanie transkryptów siRNA za pomocą polimerazy RNA z faga T7

Wysoki koszt syntezy chemicznej RNA bez gwarancji, że wybrane sekwencje wywołają wydajne wyciszenie ekspresji docelowego genu, powoduje, że poszukuje się alternatywnych sposobów uzyskiwania siRNA. Donze i wsp. (29) zaproponowali metodę syntezy dużej liczby transkryptów krótkich interferujących RNA za pomocą polimerazy RNA z faga T7. Otrzymane w ten sposób siRNA wywołują efekt wyciszenia genów egzo- i endogennych w różnych komórkach ssaczy (tab. 2A). Nici RNA, sensową i antysensową, o długości 21 nt każda, generowano w osobnych reakcjach polimeryzacji na matrycy DNA kodującego wybrany fragment danego genu (rys. 3).

Oligonukleotydy – 18-mer, kodujący promotor polimerazy RNA z faga T7, zhybrydizowano z 39-merem, zawierającym komplementarną sekwencję promotorową, po której następowała sekwencja kodująca nic sensową lub antysensową. Przepisywana sekwencja o długości 19 nt (20 nt) posiadała dodatkowo dwa 3'-końcowe nukleotydy, które mogły być dowolne w przypadku nici sensowej i zdefiniowane (komplementarne) w przypadku nici antysensowej. Nic antysensowa siRNA uczestniczy w rozpoznawaniu docelowego mRNA, dlatego jej sekwencja musi być ściśle określona. Ostatni nukleotyd sekwencji promotorowej, guanozyna, jest zarazem pierwszym nukleotydem powstającej nici RNA, dlatego projektowana sekwencja, którą chcemy uzyskać tą metodą musi rozpoczynać się od G (w nici komplementarnej obecne C), 5'-G(N₁₇)C-NN-3'. Po reakcji transkrypcji kolejnym etapem na drodze do uzyskania siRNA jest hybrydyzacja obu nici. Tą metodą Paddison i wsp. (28) otrzymywali RNA o strukturze typu spinka (shRNA) o długościach dupлексу 22-29 nt, z 4 nt pętlą UAAA. Uzyskane transkrypty shRNA wprowadzano do komórek owadzych (*Drosophila*) i ssaczy (HEK293T). Wykazano, że shRNA w cytoplazmie hydrolyzowane są przez enzym Dicer do postaci 22 nt siRNA, wywołujących degradację



Rys. 3. Generowanie siRNA w wyniku reakcji transkrypcji *in vitro* za pomocą polimerazy RNA z faga T7. Nici RNA, sensowa i antysensowa, o długości 21 nt każda, generowane w osobnych reakcjach polimeryzacji na matrycy DNA kodującego wybrany fragment danego genu. Oligonukleotydy – 18-mer, kodujący promotor polimerazy RNA z faga T7, hybrydyzuje z 39-merem zawierającym komplementarną sekwencję promotorową, po której następuje sekwencja kodująca nić sensową lub antysensową. Przepisywana sekwencja o długości 19/20 nt posiada dodatkowo dwa 3'-końcowe nukleotydy, które mogą być dowolne w przypadku nici sensowej i zdefiniowane (komplementarne) w przypadku nici antysensowej.

docelowego mRNA. Aktywność taką wykazano na przykładzie wyciszenia ekspresji egzogenego genu *Pp-luc* na poziomie 40-70%. Inny przykład zastosowania polimerazy RNA z faga T7 w syntezie siRNA podano w pracy Capodici i wsp. (30), gdzie przeprowadzono transkrypcję *in vitro* z pochodnymi fluorowymi CTP i UTP. Tak modyfikowane siRNA, skierowane na geny wirusa HIV-1 (*gag*, *3'LTR*) oraz na egzogeny gen lucyferazy, wykazywały aktywność porównywalną z aktywnością siRNA otrzymanych na drodze chemicznej syntezy.

3.3.2. Uzyskiwanie e-siRNA za pomocą RNazy III z *Escherichia coli*

W reakcji RNAi *in vivo*, Dicer – enzym wywodzący się z rodziny RNazy III, hydrolizuje dwuniciowe RNA na fragmenty o długości 21-23 nt. RNaza III z *Escherichia coli* (EC 3.1.24), w warunkach *in vitro*, może także bardzo efektywnie hydrolizować dsRNA do krótkich fragmentów, przy czym mają one taką samą strukturę jak natywne siRNA: grupę fosforanową na końcu 5', grupę hydroksylową na końcu 3', oraz po dwa niesparowane nukleotydy na obu końcach 3' dupleksu RNA (19). Taka struktura, jak wiadomo, jest zasadnicza dla wywołania efektu RNAi. Długotrwała hydroliza dsRNA przez RNazę III z *Escherichia coli* prowadzi do krótszych (12-15 nt) produktów nie wywołujących odpowiedzi RNAi. Kontrolowana reakcja enzymatycznej hydrolizy prowadzi do wydajnego generowania siRNA o długości 20-25 nt. e-siRNA wytwarzane w ten sposób wydajnie obniżają ekspresję egzogennych i endogennych genów w różnych liniach komórkowych (tab. 2A). Ze względu na prostotę i szybkość wykonania metoda w której wykorzystuje się RNazę III z *Escherichia coli* może być użyteczna dla pozyskiwania siRNA, szczególnie dla celów analizy funkcji genów w komórkach ssaków.

Tabela 2

Sposoby uzyskiwania siRNA, alternatywne do syntezy chemicznej

A. siRNA syntetyzowane enzymatycznie

Geny	Linia komórkowa	siRNA	Stopień wyciszenia (%)	Literatura
<i>gfp, pkr,</i>	HeLa, HEK293T	T7 siRNA (21, 22 nt)	90	(29)
<i>Pp-luc</i>	HEK293T	T7 shRNA (22-29 nt)	40-70	(28)
<i>Pp-luc, gag, 3'LTR,</i>	HEK293T, U87-CD4 ⁺ -CCR5 ⁺ , CXCR4 ⁺	T7 siRNA (21 nt) F – T7 siRNA (21 nt)	90	(30)
<i>gfp, β-tubulina</i>	P19	T7 siRNA (21 nt) T7 shRNA(3 nt pętla)	80 (<i>gfp</i>) 90(<i>β-tubulina</i>)	(39)
<i>Pp-luc, R-luc, Lca,</i> <i>cdk1, cdk2, c-myc, p23</i>	<i>Drosophila</i> S2, C33A, HeLa, HEK293, hTERT-RPE1, IMR-90, CHO, MEF	e-siRNA (21-23 nt, 24-26 nt, 25-30 nt)	85-95 70 (<i>c-myc</i>)	(31)
<i>β-gal, gfp</i>	mysie komórki embri- onalne E10	e-siRNA (15-40 nt)	90-100	(32)
<i>Pp-luc, R-luc, cyklina</i> <i>E1, cdc25C</i>	HEK293	d-siRNA (20-21 nt)	90	(35)
<i>H-ras, c-jun, c-fos</i>	HeLa	d-siRNA (21-23 nt)	>90	(36)

B. siRNA syntetyzowane endogenicie w plazmidach

Geny	Linie komórkowe/orga-nizm	Plazmid/pro-motor	Typ siRNA	Wielkość pętli	Stopień wyci-szenia (%)	Literatura
<i>gfp, dnmt-1, lamina A/C, cdk-2</i>	HeLa, U-2 OS, H1299, C-33A	pBSU6, promotor U6	shRNA	6	>90	(18)
<i>hyg/gfp, Pp-luc, β-ksenina Pp-luc</i>	HeLa S3	pU6, promotor U6	siRNA	–	95	(24)
	HeLa, HEK293, Cos1, NIH/3T3, IMR90	pShh-1, promotor U6	shRNA	4-8	85-90	(28)
<i>p53, CDH1, CDC20</i>	HeLa, MCF7	pSUPER, promotor H1	shRNA	5-9	>90	(37)
<i>HIV rev-egfp</i>	293/EcR	pTZU6+1 promotor U6	siRNA	–	90	(38)
<i>gfp, β-tubulina CD8α</i>	P19	RARE3E, promotor U6	siRNA	–	80	(39)
			shRNA	3	>95	
	HeLa	pSLOOPIII, promotor H1	shRNA	9	>90	(40)
<i>gfp, lamina A/C</i>	HeLa	pAV, promotor U6 U6+27 lub U6+1	shRNA	4	>90	(41)
<i>mef2a, nd1</i>	pierwotne komórki neuronalne Neuro A	pBSU6, promotor U6	shRNA	6	70-97	(42)
<i>egfp, β-gluc, egfp-Q19, egfp-Q80</i>	HEK293, HeLa, PC12 transgeniczne myszy (mózg, wątroba)	pmCMVmpA, promotor CMV	shRNA	0	90 (<i>egfp, poliQ</i>) 60 (<i>β-gluc</i>)	(43)
<i>p53</i>	HEK293, AG01522C	RVH1, LTRH1, promotor H1	shRNA	9	~100	(44)
<i>egfp</i>	transgeniczne myszy transgeniczne szczury	pGtoR promotor H1	shRNA	9	>80	(45)
<i>Pp-luc</i>	transgeniczne myszy (wątroba)	pShh1, promotor H1	–	–	98	(46)
<i>k-ras</i>	SW480, HeLa	pPUR-tRNA/tRNA ^{val} , pUC-hU6/U6	shRNA	5, 10	>90	(47)

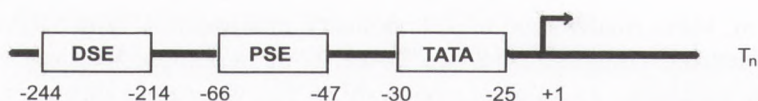
Yang i wsp. (31) podali dokładny opis reakcji hydrolizy długiego dsRNA przez rekombinowaną RNazę III z *Escherichia coli*. Dwuniciowy RNA, uzyskany *in vitro*, w ilości 100 µg poddano hydrolizie z 1 µg RNazy III, 15 min w 37°C (lub 0,2 µg RNazy III, 1 godz. w 21°C). W wyniku reakcji uzyskiwano populację e-siRNA o długościach od

15 do 30 nt, które rozdzielono na żelu poliakrylamidowym. Możliwe było wyizolowanie produktów o długościach 21-23, 24-26, 27-30 nt. Zaobserwowano, że dupлекsy e-siRNA o długości 21-30 nt powodowały 85-95% wyciszenie ekspresji egzogennych genów lucyferazy świetlika (*Pp-luc*) i Renilla lucyferazy (*R-luc*), oraz endogennych genów *LCa* (90%), *cdk1*, *cdk2*, *c-myc* (70%), *p23*. Porównano właściwości chemicznie syntetyzowanych siRNA, shRNA, oraz e-siRNA pod względem zdolności wyciszenia ekspresji genów. Stwierdzono, że spośród czternastu różnych siRNA lub shRNA, skierowanych na różne sekwencje tego samego genu, jedynie trzy dupлекsy wykazywały znaczącą aktywność RNAi. siRNA lub shRNA rozpoznają jedynie jeden element sekwencji docelowego mRNA, podczas gdy e-siRNA stanowią pewną populację, homologiczną sekwencyjnie do wybranego odcinka mRNA, dlatego też wzrasta prawdopodobieństwo, że będą prowadziły do jego degradacji. Pod koniec 2002 r. ukazały się dwie prace charakteryzujące rekombinowaną wersję ludzkiej rybonukleazy Dicer (rh-Dicer), uzyskaną w komórkach owadzi (33,34). Myers i wsp. opisali zastosowanie rh-Dicer do otrzymywania siRNA w warunkach *in vitro* poprzez enzymatyczną hydrolizę długiego dsRNA (35). Dwuniciowe RNA o długości 500 nt hydrolizowano do 20-21 nt fragmentów dwuniciowego RNA, nazwanych d-siRNA lub diced-siRNA. Oprócz wymienionych d-siRNA nie obserwowano innych produktów hydrolizy. Wynik ten wskazuje na charakterystyczny mechanizm działania enzymu Dicer, polegający na stopniowym odcinaniu kolejnych fragmentów RNA. Tak otrzymywane d-siRNA były zdolne do specyficznego ~90% wyciszenia ekspresji genów egzogennych (*Pp-luc* i *R-luc*) oraz endogennych, np. genu cykliny E i fosfatazy Cdc25C. Podobnie otrzymywano d-siRNA w laboratorium Tairy i wsp. (36).

3.4. Wewnątrzkomórkowa ekspresja siRNA

3.4.1. Promotory polimerazy RNA III

W wyższych organizmach eukariotycznych polimeraza RNA III (Pol III) jest odpowiedzialna za syntezę dużej ilości małych jądrowych, niekodujących RNA tzw. snRNA (*small nuclear RNA*), które pełnią istotną rolę w wycinaniu sekwencji intronowych z prekursora mRNA. System Pol III jest bardzo efektywny (4×10^5 kopii transkryptu/komórkę). Znane są sekwencje promotorowe genów kodujących to RNA. Można je zakwalifikować do trzech typów promotorów. Typy I i II to promotory genów odpowiednio 5SRNA i tRNA. Charakteryzują się tym, że ich sekwencje zawarte są wewnątrz transkrybowanego rejonu. Promotory genów U6 i H1 RNA należą do typu III promotorów Pol III. Wszystkie ich elementy, z wyjątkiem pierwszego transkrybowanego nukleotydu (+1) są zlokalizowane powyżej rejonu transkrybowanego i nie zawierają żadnych zewnętrznych sekwencji regulatorowych. Sekwencje wymagane dla wydajnej ekspresji to: TATA box, od -30 do -25, PSE (*proximal sequence element*),



Rys. 4. Organizacja promotora typu III ludzkiego genu U6 snRNA. Elementy składowe promotora: sekwencja DSE (*distal sequence element*), PSE (*proximal sequence element*), sekwencja TATA. Miejsce inicjacji transkrypcji oznaczone jest +1, miejsce terminacji transkrypcji Tn.

od -66 do -47, DSE (*distal sequence element*), od -244 do -214 (rys. 4). Promotory te idealnie nadają się do ekspresji 21 nt siRNA lub 50 nt sekwencji shRNA. Promotory U6 i H1 różnią się wielkością, jednak posiadają pewne stałe elementy sekwencji, w szczególności miejsca wiązania białka. Pierwszym transkrybowanym nukleotydem (+1) dla promotora U6 jest zawsze guanozyna, dla promotora H1 adenozyzna. Sygnałem do terminacji transkrypcji dla promotorów Pol III jest sekwencja czterech/pięciu tymidyn.

3.4.2. Konstrukcja wektorów plazmidowych

Metody wprowadzania do komórek syntetycznych siRNA z pomocą lipofektyny ograniczają zakres możliwych zastosowań RNAi z powodu niskiej wydajności transfekcji i krótkiego okresu półtrwania efektu wyciszenia. W 2002 r. kilka grup badawczych niezależnie przedstawiło systemy, które pozwalają na stabilną, wewnątrzkomórkową ekspresję siRNA (24,28,37-47). Brummelkamp i wsp. (37) zaprezentowali plazmid nazwany pSUPER, generujący endogennie shRNA, zawierające 19 nt nici sensową i antysensową, połączone odcinkiem 5 nt (UUCGA), 7 nt (CAGAGCU) lub 9 nt (UUCAAGAGA) tworzącym pętlę. Plazmid zawiera sekwencję promotora genu H1 RNA, pod którego kierunkiem odbywa się transkrypcja.

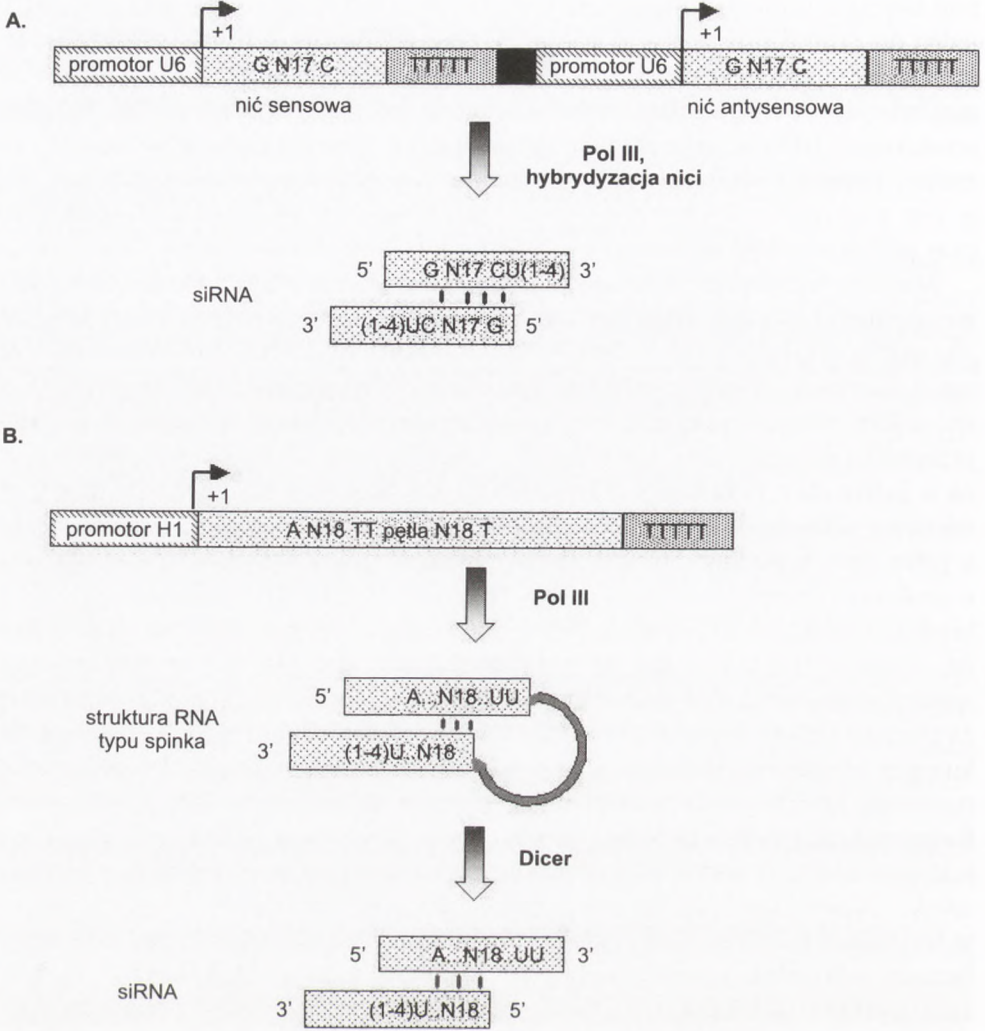
Spinki RNA posiadające tę samą sekwencję komplementarnych nici, różniące się sekwencją i wielkością spinającej je pętli, wykazywały różną aktywność wyciszenia endogenego genu *CDH1* w komórkach MCF-7, od 0% dla 5 nt pętli do >90% dla pętli 9 nt. Równie wysoki (>90%) stopień hamowania ekspresji uzyskano dla innych genów stosując shRNA z pętlą 9 nt (tab. 2B). Wykazano, że plazmid pSUPER pozwala na stabilne hamowanie ekspresji wybranego genu przez dłuższy czas (dwa miesiące), nie wywołując toksycznego efektu dla komórek. W innych pracach zaprezentowano plazmidy do ekspresji siRNA pod kontrolą promotora genu U6 RNA (18,24,28,38,39,41,42). Paul i wsp. (41) przedstawili system hamowania ekspresji genu laminy A/C poprzez endogennie syntetyzowane shRNA, posiadające stabilną czteronukleotydową pętlę (UUCG) i dwie komplementarne 19 nt nici, tworzące wewnątrz komórki strukturę dwuniciową. Taira i wsp. (24) przedstawili plazmidowy system ekspresji siRNA opierający się również na zasadzie transkrypcji przez Pol III obu nici niezależnie od siebie. W przeciwieństwie do innych systemów, nici senso-

wa i antysensowa siRNA były syntetyzowane w tym samym plazmidzie, ale każda pod kontrolą osobnego promotora U6. Transkrybowane nici zawierały na końcu 3' jedną do czterech reszt urydylowych, jako konsekwencję obecności sekwencji terminującej transkrypcję, charakterystycznej dla systemu Pol III (Tn). Po syntezie obie nici hybrydowały ze sobą wewnątrz komórki tworząc pożądany siRNA. Plazmidy produkujące tylko pojedyncze nici, sensową lub antysensową, nie miały wpływu na zmianę poziomu ekspresji wybranych genów. Stwierdzono, że tworzenie dupleksu *in vivo* zabezpiecza RNA przed wewnątrzkomórkowymi nukleazami. Przedłuża to czas półtrwania RNA w komórce w porównaniu do jednoniciowego RNA.

Możliwe jest równoczesne wyciszenie kilku genów poprzez zastosowanie wielu niezależnych kaset transkrypcyjnych w jednym plazmidzie. Zaskakujące jest, że siRNA lub shRNA syntetyzowane w jądrze komórkowym pod kierunkiem promotora U6, mogą hamować ekspresję mRNA w cytoplazmie. Przeprowadzono hybrydyzację *in situ* shRNA z sondami fluorescencyjnymi, i wykazano, że tylko niewielka część RNA przechodzi do cytoplazmy, i jest tam aktywna, natomiast większość jest zlokalizowana w jądrze (41). Taira i wsp. (47) skonstruowali także inny system plazmidowy, zawierający sekwencję tRNA^{Val}. Obecność tRNA^{Val} w transkrypcie ułatwia jego eksport z jądra do cytoplazmy. Ponadto, w wymienionej pracy wykazano, że transkrypty o strukturze spinki, posiadające motyw 10 nt pętli (CTTCCTGTCA), pochodzący z mikro-RNA (ludzki *mir-23*), syntetyzowane pod kontrolą promotora U6 są również bardzo wydajnie transportowane do cytoplazmy. Davidson i wsp. (43) zademonstrowali wykorzystanie wektora wirusowego do dostarczania i wewnątrzkomórkowej syntezy za pomocą polimerazy RNA II (Pol II), siRNA specyficznie redukujących ekspresję kilku egzo- i endogennych genów w warunkach *in vitro* i *in vivo* (tab. 2B). Do wektora wirusowego pAd5KnpA wprowadzono zmodyfikowany promotor CMV i syntetyczny fragment kodujący kasetę poli-A. Pomiędzy tymi elementami umieszczano sekwencje kodujące obie nici siRNA, co prowadziło po transkrypcji do produktu o strukturze spinki. Udowodniono, że siRNA syntetyzowane w wektorach wirusowych, zarówno w hodowlach komórek *in vitro*, jak i w organizmie myszy *in vivo*, są zdolne do specyficznego wyciszania ekspresji wybranych genów. System ten zastosowano do obniżania poziomu białek poliQ, ich zmutowanej postaci z wielokrotnymi powtórzeniami glutaminowymi, będących źródłem wielu chorób neurodegeneracyjnych. W badaniach przeprowadzonych w komórkach neuronalnych PC12 wykazano, że zastosowanie specyficznych siRNA, generowanych w wektorze wirusowym, wywołuje 90% zahamowanie ekspresji tych białek i zmniejszenie ilości agregatów białkowych.

4. Czas trwania procesu RNAi

Obniżenie poziomu białka wywołane przez egzogenne podanie siRNA jest przejściowe, trwa typowo od pięciu do siedmiu dni po transfekcji i obejmuje siedem do dziesięciu podziałów komórkowych. Podanie plazmidów i wywołanie ekspresji RNA



Rys. 5. Endogenna ekspresja siRNA. A. Kasetę ekspresyjną kodującą obie nici dupletu transkrybowane w jednym plazmidzie, każdą pod kontrolą osobnego promotora U6. Kasetę zawiera sekwencję promotora U6 (250 par zasad), sekwencję nici sensowej dupletu GN₁₇-C, po której następuje sekwencja T4 lub T5, będąca sygnałem terminacji transkrypcji. Po krótkim łączniku do kasety ekspresyjnej włączona są podobne elementy umożliwiające ekspresję nici antysensowej tzn. promotor U6, sekwencja kodująca nić antysensową i sygnał terminacji transkrypcji T4 lub T5. Powstające nici sensowa i antysensowa hybrydują ze sobą tworząc duplet siRNA. B. Kasetę ekspresyjną kodującą RNA o strukturze spinki (shRNA). Po sekwencji promotora genu H1 RNA (100 par zasad) wstawiona jest sekwencja nici sensowej i odwrócona sekwencja nici antysensowej, obie połączone ze sobą fragmentem kodującym pętlę. Na końcu znajduje się sekwencja terminacji transkrypcji T4 lub T5. RNA o strukturze typu spinki ulega obróbkę, w wyniku której powstaje siRNA.

wewnątrz komórki powoduje dłuższy efekt wyciszenia. Miyagishi i Taira (24) opisali doświadczenie, w którym wyciszali ekspresję genu β -kateniny przez okres dłuższy niż jeden tydzień. Brummelkamp i Paddison wyselekcjonowali komórki, w których gen białka p53, odgrywającego ważną rolę w naprawie uszkodzeń DNA, był stabilnie wyciszony, odpowiednio, przez dwa miesiące (37) lub kilka tygodni (28). Wskazuje to, że długoterminowa ekspresja siRNA jest możliwa i nie jest toksyczna dla komórek.

Możliwość stabilnej ekspresji siRNA otwiera drogę do zastosowania zjawiska RNAi w nowej terapii genowej, na przykład w leczeniu infekcji wirusowych. Ekspresja siRNA w wektorach retrowirusowych pozwala na kierowanie ich do tzw. komórek pierwotnych, co do tej pory było nieosiągalne (43-44). Wysoka specyficzność siRNA stwarza nadzieję ich zastosowania do wyciszenia onkogenów bez zmiany alleli typu dzikiego.

5. Podsumowanie

Zjawisko RNAi jest sekwencyjno-zależnym procesem potranskrypcyjnego wyciszenia ekspresji genów, polegającym na ukierunkowanej degradacji mRNA, indukowanej przez dwuniciowy RNA, homologiczny do wyciszanego genu. Aktywną formą dwuniciowego RNA są krótkie, 21-23 nt siRNA, będące produktami degradacji dsRNA za pomocą nukleazy Dicer. Włączone w nukleazowy kompleks RISC służą jako RNA kierujący i rozpoznający docelową sekwencję mRNA ulegającą degradacji. siRNA mogą być podawane egzogenicznie (są to syntetyzowane chemicznie lub enzymatycznie siRNA) lub mogą być wytwarzane wewnątrzkomórkowo, z kodujących je plazmidów. Transkrypcja realizowana jest przez polimerazę RNA III pod kontrolą promotorów genów U6 lub H1 RNA. Modyfikacje w obrębie nici antysensowej prowadzą zazwyczaj do znacznego obniżenia lub zaniku aktywności RNAi, natomiast tolerowane są modyfikacje w obrębie nici homologicznej do sekwencji docelowej. Poprzez wprowadzanie modyfikacji końca 3' nici antysensowej udowodniono, że w komórkach ssaczych, jak również w komórkach owadów nie dochodzi do amplifikacji siRNA. Zjawisko RNAi jest użytecznym narzędziem molekularnym, zarówno w aspekcie analizy funkcji genów, jak i o znaczeniu terapeutycznym do hamowania ekspresji niepożądanych genów białek chorobotwórczych i genów wirusowych.

Praca powstała w ramach realizacji grantów finansowanych przez Komitet Badań Naukowych, grant nr PBZ-KBN-059/T09/09, oraz 5 Program Ramowy Unii Europejskiej, grant QLRT nr 2001-02774.

Literatura

1. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-811.
2. Bernstein E. A., Caudy A., Hammond S. M., Hannon G. J., (2001), *Nature*, 409, 363-366.
3. Hammond S., (2000), *Nature*, 404, 293-296.

4. Hannon G. J., (2002), *Nature*, 418, 244-251.
5. Sharp P., (2001), *Genes Dev.*, 15, 485-490.
6. Schwarz D. S., Hutvagner G., Haley B., Zamore P. D., (2002), *Mol. Cell*, 10, 537-548.
7. Chiu Y. L., Rana T. M., (2002), *Mol. Cell*, 10, 549-561.
8. Lipardi C., Wei Q., Paterson B., (2001), *Cell*, 107, 297-307.
9. Sijen T, Fleenor J., Simmer F., Thijssen K. L., Parrish S., Timmons L., Plasterk R. H. A., Fire A., (2001), *Cell*, 107, 465-475.
10. Nishikura K., (2001), *Cell*, 107, 415-418.
11. Holen T., Amarzguioui M., Wiiger M., Babaie E., Prydz H., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30(8), 1757-1766.
12. Elbashir S., Tuschl T., (2001), *Nature*, 411, 494-498.
13. McManus M. T., Sharp P. A., (2002), *Nat Rev.*, 3, 737-747.
14. Billy E., Brondani V., Zhang H., Muler U., Filipowicz W., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(25), 14428-14433.
15. Yang S., Tutton S., Pierce E., Yoon K., (2001), *Mol. Cell. Biol.*, 21(22), 7807-7816.
16. Paddison P., Caudy A. A., Hannon G. J., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 1443-1448.
17. Elbashir S., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Genes Dev.*, 15, 188-200.
18. Sui G, Soohoo C., Affar E. B., Gay F., Shi Y., Forrester W. C., Shi Y., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(8), 5515-5520.
19. Amarasinghe A. K., Calin-Jagcman I., Harmouch A., Sun W., Nicholson A. W., (2001), *Methods Enzymol.*, 342, 143-158.
20. Nykänen A., Haley B., Zamore P. D., (2001), *Cell*, 107, 309-321.
21. Caplen N. J., Parrish S., Imani F., Fire A., Morgan R. A., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98(17), 9742-9747.
22. Elbashir S. M., Harborth J., Weber K., Tuschl T., (2002), *Methods*, 26, 199-213.
23. Hohjoh H., (2002), *FEBS Lett.*, 521, 195-199.
24. Miyagishi M., Taira K., (2002), *Nat. Biotech.*, 19, 497-500.
25. Amarzguinou M., Brede G., Babaie E., Grotli M., Sproat B., Prydz H., (2000), *Nucleic Acids Res.*, 28(21), 4113-4124.
26. Hamada M., Kawaida R., Koizumi M., Morita K., Furukawa H., Imanishi T., Miyagishi M., Taira K., (2002), *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 12(5), 301-309.
27. Elbashir S., Martimez J., Patkaniowska A., Lendeckel W. Tuschl T., (2001), *EMBO J.*, 20(23), 6877-6888.
28. Paddison P. J., Caudy A. A., Bernstein E., Hannon G. J., (2002), *Genes Dev.*, 16, 948-958.
29. Donze O., Picard D., (2002), *Nucleic Acids Res.*, 30(10), e46.
30. Capodici J., Kariko K., Weissman D., (2002), *J. Immunol.*, 169(9), 5196-5201.
31. Yang D., Buchholz F., Huang Z., Goga A., Chen C-Y., Brodsky F. M., Bishop J. M., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(15), 9942-9947.
32. Calegari F., Haubensak W., Yang D., Huttner W. B., Buchholz F., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(22), 14236-14240.
33. Provost P., Dishart D., Doucet J., Frendewey D., Samuelsson B., Radmark O., (2002), *The EMBO Journal*, 21(21), 5864-5874.
34. Zhang H., Kolb F. A., Brondani V., Billy E., Filipowicz W., (2002), *The EMBO Journal*, 21(21), 5875-5885.
35. Myers J. W., Jones J. T., Meyer T., Ferrell Jr J. E., (2003), *Nature Biotechnology*, 21, 324-327.
36. Kawasaki H., Suyama E., Iyo M., Taira K., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31(3), 981-987.
37. Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R., (2002), *Science*, 296, 550-553.
38. Lee N. S., Dohjima T., Bauer G., Li H., Li M-J., Ehsani Salvaterra P., Rossi J., (2002), *Nat. Biotech.*, 19, 500-505.
39. Yu J-Y., DeRuijter S. L., Turner D. L., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(9), 6047-6052.
40. McManus M. T., Petersen C. P., Haines B. B., Chen J., Sharp P. A., (2002), *RNA*, 8, 842-850.
41. Paul C. P., Good P. D., Winer I., Engelke D. R., (2002), *Nat. Biotech.*, 19, 505-508.

42. Gaudilliere B., Shi Y., Bonni A., (2002), *J. Biol. Chem.*, 277(48), 46442-46446.
43. Xia H., Mao Q., Paulson H. L., Davidson B. L., (2002), *Nat. Biotech.*, 20, 1006-1010.
44. Barton G. M., Miedzhitov R., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(23), 14943-14945.
45. Hasuwa H., Kaseda K., Einarsdottir T., Okabe M., (2002), *FEBS Lett.*, 532, 227-230.
46. Caffrey A. P., Meuse L., Pham T. T. T., Conklin D. S., Hannon G. J., Kay M. A., (2002), *Nature*, 418, 38-39.
47. Kawasaki H., Taira K., (2003), *Nucleic Acids Res.*, 31(2), 700-707.