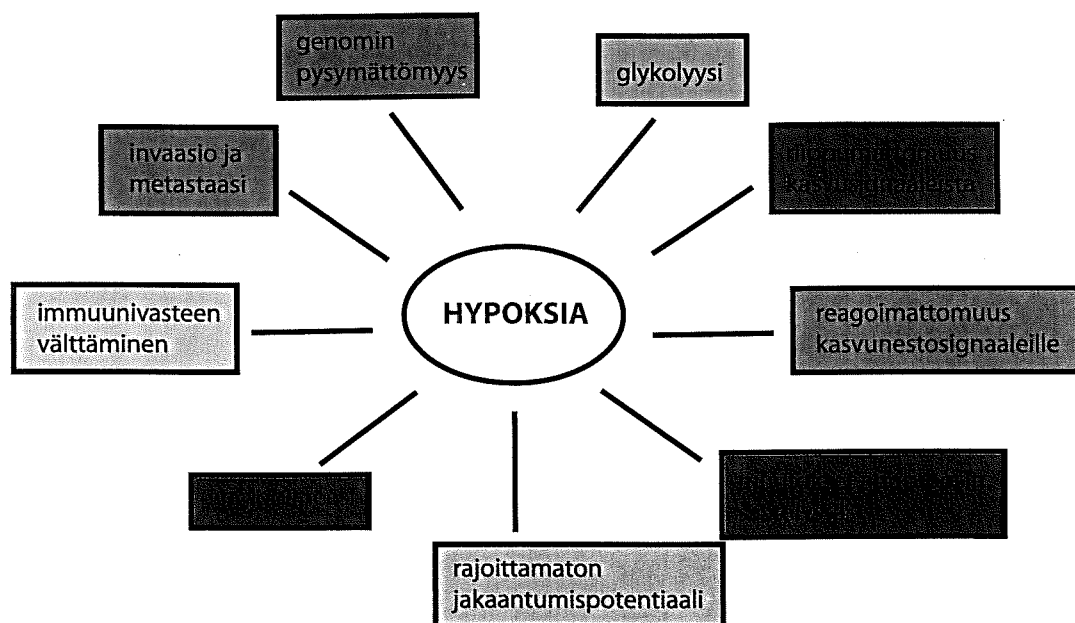


# SOLUBIOLOGI

1 • 2009

27. vuosikerta



# RNA-hiljentymisen virussäikeenä

Eveliina Karelehto<sup>1</sup> (FM) ja Petri Susi<sup>1,2</sup> (FT, Dos.)

<sup>1</sup>Joint Biotechnology Laboratory (JBL), Kemian laitos, Turun yliopisto, Tykistökatu 6 a 6, 20520 Turku

<sup>2</sup>Virusoppi, Kliinis-teoreettinen laitos, Turun yliopisto, Kiinamyllynkatu 13, 20520 Turku

Sähköposti: sekare@utu.fi, pesusi@utu.fi. Puh. 02-3337391

RNA-hiljentymisellä (RNAi) tarkoitetaan solunsisäistä tapahtumasarjaa, jossa kaksisäikeinen RNA saa aikaan reaktioketjun, joka johtaa kompleentaarisen lähetti-RNA:n hajoamiseen ja sitä koodaavan geenin toiminnan vaimentumiseen. RNAi on evoluutiossa hyvin säilynyt ilmiö ja sitä esiintyy lähes kaikilla aiotumallisilla organismeilla. RNAi:stä on viime vuosien aikana tullut perustyökalu solubiologiassa, mutta se on mahdollisesti myös tärkeä tulevaisuuden lääkeaine hyödyntämällä sen mekanisme esimerkiksi torjuttaessa virusinfektioita.

RNA-hiljentymisen havaittiin ensimmäisenä kasveissa, jolloin siitä alettiin käyttää nimityksiä transkriptionjälkeiseksi hiljentymisen (engl. post-transcriptional gene silencing; PTGS) ja yhteisvaimennus (engl. co-suppression)(van der Krol ym. 1990, Napoli ym. 1990). Muutamaa vuotta myöhemmin myös virusgeeneillä siirtogeeneiseksi muokattu kasvi osoittautui vastustuskykyiseksi kasvivirusinfektioille ilman siirtogeenin koodaaman proteiinin tuottumista (Dougherty ym. 1994). Nämä tutkimukset viittasivat siihen, että RNA:n kautta toimi uusi puolustusmekanismi, joka kohdistui geeniekspressioon. Pian vastaava ilmiö löydettiin myös sienistä, joissa ilmiötä nimitettiin vaimennukseksi (engl. quelling) ja laakamadoista, joiden yhteydessä käyttöön otettiin nimi RNA-hiljentymisen eli RNAi (engl. RNA-interference). Jälkimmäinen on sittemmin vakiintunut kirjallisuudessa, ja tälle on perusteena se, että RNAi:n mekanismi on kaikilla eliöillä samankaltainen.

RNA-hiljentymisen oletetaan evoluution myötä kehittyneen solujen puolustusmekanismiksi viruksia ja loisia vastaan. Erittäin vahvana todisteena tästä pidetään sitä, että virukset

tuottavat useita erilaisia patogeenisille tärkeitä proteiineja, jotka estävät RNAi:tä (Anandalakshmi ym. 1998, Mourrain ym. 2000, Voinnet ym. 2000). RNA-hiljentymisen on ajateltu suojelevan organismeja myös vakauttamalla sen genomia; mutaatiot RNAi-järjestelmässä esimerkiksi lisäävät transpositioiden määrää genomissa ja viallisen RNA:n kertymistä soluun (Ketting ym. 1999, Tabara ym. 1999). Lisäksi eräs RNAi:n tehtävä on osallistua epigeneettiseen säätelyyn ja sen on huomattu estävän transkriptiota lisäämällä DNA-metylaatiota ja muuttamalla kromatiinin rakennetta (Lippmann ym. 2003).

## RNA-hiljentymisen mekanismi

Virusinfektio, transgeenit tai vialliset transkriptiotuotteet voivat johtaa kaksisäikeisen RNA:n muodostumiseen solussa. RNAasi III -perheeseen kuuluva ribonukleaasi, Dicer, pilkkoo kaksisäikeisestä RNA:sta lyhyitä RNA-molekyylejä (Hammond ym. 2000, Zamore ym. 2000). Nämä voidaan jaotella alaryhmiin niiden koon ja toiminnan perusteella. Kaksi parhaiten tunnettua alaryhmää ovat em. tavalla muodostuvat siRNA-molekyylit (engl. small interfering RNA) ja miRNA-molekyylit, jotka koodataan genomista. Riippumatta kaksinauhaisen RNA:n alkuperästä, molemmat voivat siis johtaa RNAi:n käynnistymiseen (Tuschl ym. 1999, Gregory ym. 2005). SiRNA koostuu kahdesta noin 21–25 nukleotidin mittaisesta RNA-säikeestä, joiden 5'-päässä on fosfaatti- ja 3'-päässä hydroksyyli-ryhmä. Säikeet ovat siRNA-molekyylissä pariutuneet siten, että molekyylin molempiin päihin jää kaksi ylimääräistä nukleotidiä. MiRNA:t ovat 20–23 nukleotidin mittaisia endogeenisiä yksisäikeisiä RNA-molekyylejä, jotka säätelävät eliön geeniekspressiota. MiRNA:ta tuottavat geenit

sijaitsevat genomissa ryppäinä. Näistä geneistä RNA-polymeraasi II transkriptoi primaari-miRNA-molekyyliä (pri-miRNA). Tämän jälkeen Drosha-entsyymi yhdessä kaksisäikeistä RNA:ta sitovan alayksikkönsä DGCR8:n kanssa pilkkoo pri-miRNA:n 60–70 nukleotidin mittaiseksi miRNA:n esiasteeksi, pre-miRNA:ksi. Pre-miRNA pariuu itsensä kanssa silmukka-muotoon. Tämän kuljettajaproteiini Exportin 5 yhdessä GTPaasi Ranin kanssa kuljettaa pre-miRNA:n sytoplasmaan. Sytoplasmassa Dicer ja sen kaksisäikeistä RNA:ta sitova alayksikkö TRBP (engl. transactivating response RNA-binding protein) pilkkovat pre-miRNA:n edelleen kaksisäikeiseksi miRNA:ksi.

RNA-hiljentymisen toisessa vaiheessa siRNA:n tai miRNA:n toinen nauha (guide-nauha) liittyy RNA-indusoituvaan hiljennyskompleksiin (engl. RNA-induced silencing complex; RISC) ja ohjaa sen emäspariutumisen avulla joko pilkkomaan komplementaarisen lähetti-RNA:n tai pysäyttämään sen translaation. RISC sisältää kaikilla eliöillä kaksi perusosaa. Näistä ensimmäinen osa on kompleksin toimintaa ohjaava lyhyt RNA. Toinen osa on passenger-nauhan hajottava sekä lähetti-RNA:n pilkkova Argonautti-perheeseen kuuluva proteiini (Martinez ym. 2002, Matraga ym. 2005, Winter ym. 2009). Argonautti-proteiinit rakentuvat kahdesta alayksiköstä, N-terminaaliseen PAZ-domeeniin ja C-terminaaliseen PIWI-domeeniin (Hall 2005). Näistä PAZ-domeeni sitoo guide-nauhan RISC:iin ja PIWI-domeeni pilkkoo kohde-lähetti-RNA:n. Ihmisillä RISC sisältää lyhyen RNA:n sekä argonautti 2-proteiinin lisäksi Dicerin ja TRBP:n (Meister ym. 2004, Chendrimada ym. 2005). Si/miRNA:n komplementaarisuus kohde-lähetti-RNA:n kanssa määrää liittyykö se lähetti-RNA:ta pilkkovaan RISC:iin vai translaation keskeyttävään RISC:iin (Lim ym. 2005, Winter ym. 2009). Translaation keskeytyminen tapahtuu siten, että RISC ohjataan tietyille transloimatonta lähetti-RNA:ta sisältäville sytoplasman alueille (engl. processing bodies; P-bodies), joissa proteiini nimeltään GW182 pysäyttää translaation (Liu ym. 2005).

#### RNA-hiljentymisen virusterapiana

Koska lyhyet RNA-molekyylit ovat osa elion luonnollista viruspuolustusta, erittäin spesifejä geenien toiminnan hiljentäjiä ja koska niiden tuottaminen on yksinkertaista, ne saattavat sopia hyvin esimerkiksi virusinfektioiden hoitoon.

Verrattuna perinteisiin pienimolekyyllisiin lääkkeisiin sekä uudempaan biologisiin lääkkeisiin siRNA-lääkkeiden kehittäminen on nopeaa ja tuottaminen edullista ja helppoa. Eri lääkeyrityksillä on kliinisissä faasitutkimuksissa tällä hetkellä siRNA-lääkkeitä muun muassa hepatiitti B virus-, HI-virus- (engl. human immunodeficiency virus; HIV) ja RS-virus (engl. respiratory syncytial virus; RSV) infektiota vastaan (Haussecker 2008).

Viruksilla on erilaisia lisääntymisstrategioita, minkä vuoksi RNA-hiljennysterapian kohteet niille voivat myös olla erilaisia. Suoraviivaisin lähestymistapa on suunnitella RNA-hiljennyskohdentamaan viruksen tuottamaan lähetti-RNA-molekyyliin. Näin on onnistuttu heikentämään muiden muassa hepatiitti B ja C virusten sekä HIV-1:n lisääntymiskykyä (Jacque ym. 2002, Kapadia ym. 2003). Toisaalta virus-RNA:n määrä solussa on suuri ja erityisesti RNA-virukset kehittävät helposti resistenssin RNA-hiljennystä vastaan mutatoitumalla (Scherer ym. 2007). Resistenssin muodostumista voidaan vaikeuttaa valitsemalla kohteeksi jokin viruksen käyttämä isäntäsolun molekyyli. Näitä virusten hyödyntämiä kofaktoreita on usein solussa määrällisesti vähemmän kuin virus-RNA:ta, mutta toisaalta isäntäsolun molekyylien hiljentämisellä voi olla vakavia haittavaikutuksia. Tunnetuin esimerkki isäntäsolun kohteesta lienee HIV-1:n koreseptoreina käyttämät kemokiini-reseptorit CCR5 ja CXCR4, joita hiljentämällä voidaan estää HIV-infektio. Solun pintareseptorien lisäksi on kuitenkin löydetty myös useita mahdollisia solunsisäisiä kohteita, kuten Arp2/3-kompleksi, joka välittää useiden virusten solunsisäistä kuljetusta tai transkriptiotekijä pTEFb, joka on tärkeä HIV-1:n replikaatiolle (Komano ym. 2004). Tehokkaimmiksi virusten replikaation estäjiksi on huomattu erilaiset RNA-hiljennysyhdistelmät. Esimerkiksi hiljentämällä yhtäaikaaisesti useita kohtia geenistä tai useita isäntäsolun kofaktoreita on saavutettu parhaimmat tulokset virusten lisääntymisen estossa (Haasnoot ym. 2007).

#### Akuutit ja krooniset virusinfektiot

RNA-hiljennysterapian vaikutus voi olla ohimenevää, mikä sopii erityisesti akuuttien virusinfektioiden kuten influenssa A-viruksen hoitoon tai pitkäaikaisempaa, mikä puolestaan sopii hyvin kroonisten virusinfektioiden kuten HIV-1:n hoitoon. RNA-hiljennysterapian suunnittelu on

yksinkertaisinta akuutin hengitysteiden infektiosta aiheuttaville viruksille kuten RSV tai influenssa A-virus. Infektio on ohimenevä, jolloin lyhytaikainen siRNA-transfektio on riittävä. siRNA-lääke voidaan annostella hengitysteiden limakalvolle kätevästi aerosoloina. Pisimmällä RNA-hiljennyksen hyödyntämisessä viruslääkkeeksi on lääkevalmistaja Alnylam Pharmaceuticals (<http://www.alnylam.com/>), joka on kehittämässä siRNA-lääkettä RSV-infektioon. Hengitettävä ALN-RSV01-lääke on tällä hetkellä lääkekehityksen faasi II vaiheessa ja alustavat tulokset ovat erittäin lupaavia (Haasnoot ym. 2007). Kroonisen infektiosta aiheuttaville viruksille kuten HIV tai HBV on huomattavasti vaikeampaa kehittää RNA-hiljennysterapiaa, koska tarvitaan pitkäaikainen siRNA:n ilmeneminen, jolloin ongelmaksi muodostuvat siRNA:n kuljettaminen ja kohdentaminen haluttuun kudokseen sekä jatkuvan siRNA-ilmenemisen aiheuttamat haitat. Pitkäaikaisen RNA-hiljennyksen seurauksena viruksesta muodostuu helposti resistentti kanta, jonka vuoksi lääkkeen täytyy sisältää useita eri siRNA-molekyylejä eri kohteisiin. Tällöin puolestaan haittavaikutukset lisääntyvät edelleen. Lisäksi ihmisen kroonisten virusinfektioiden eläinmalleja on vähemmän kuin akuuttien virusinfektioiden eläinmalleja, mikä vaikeuttaa testaustulosten tulkintaa.

### Influenssa-infektion estäminen RNA-hiljennyksellä

Influenssa on ortomyksovirusiin kuuluvan influenssavirus A:n tai B:n aiheuttama lähengitysteiden raju akuutti infektio. Vuosittaisten influenssaepidemioiden seurauksena väestöstä 5–20 % sairastuu vakavasti ja 250 000 – 500 000 ihmistä kuolee. Influenssan torjuntaa ja hoitoa vaikeuttaa, että se leviää herkästi pisaratartuntana. Lisäksi influenssaviruksen pinta-antigeeneissä tapahtuu jatkuvasti mutaatioita, minkä vuoksi ihmisen immuunipuolustus ei enää tunnista virusta. Kokonaan uusia influenssaviruskantoja muodostuu, kun kaksi eri viruskantaa infektoi saman solun. RNA-hiljennys vaikuttaa lupaavalta keinolta estää ja hoitaa influenssaa. Tämä johtuu siitä, että influenssa A-virus on RNA-virus, jolla ei ole missään elinkiertoensa vaiheessa DNA-väliainetta. Viruksen vRNA-, lähetti-RNA- ja cRNA-molekyylit voivat kaikki toimia kohteina RNA-hiljennykselle. Koska siRNA-molekyylit ovat kaksisäikeinen, toinen nauhoista on komplementaarinen lähetti-RNA:lle sekä cRNA:lle ja

toinen vRNA:lle. Kaikki influenssa A-viruksen 10 proteiinia ovat tärkeitä sen replikaatiolle ja näistä minkä tahansa hiljentäminen todennäköisesti heikentää viruksen lisääntymistä. Koska influenssa on lähengitysteiden infektio, siRNA-lääke voidaan formuloida myös inhaloitavaan muotoon. Tämä on paitsi käytännöllistä, myös hyvä keino saavuttaa korkea paikallinen siRNA-pitoisuus infektoituneessa kudoksessa hyvin pienillä annoksilla. Ihmisillä hengitysteiden epiteelisolut eivät jakaannu nopeasti, jolloin on mahdollista, että siRNA-lääkettä tarvitsisi inhaloitua melko harvoin, esimerkiksi vain kerran viikossa (Ge ym. 2004).

Nykyisen influenssan estoon käytetyn keinoon, rokotteen, teho on heikompi sairauden riskiryhmissä kuin muussa väestössä ja sen edellytyksenä on terve immuunijärjestelmä. Lisäksi rokotetta joudutaan viruksen muuntautumisen vuoksi päivittämään jatkuvasti. Sen sijaan siRNA-lääkkeen teho olisi luultavasti samankaltainen kuin riskiryhmissä kuin muussakin väestössä ja sitä voitaisiin antaa myös henkilöille, joiden immuunijärjestelmä toimii puutteellisesti. Kun RNA-hiljennys kohdennetaan influenssavirusgenomin konservoituneisiin osiin, virus ei myöskään kehittä vastustuskykyä siRNA-lääkettä kohtaan niin helposti kuin rokotetta tai tällä hetkellä käytössä olevia lääkkeitä vastaan. RNA-hiljennyksen kohdetta valitessa on keskitytty niihin influenssa A-viruksen genomien osiin, jotka ovat hyvin konservoituneita eri viruskantojen välillä. Tärkeimpiä antigeenejä HA:a ja NA:a vastaan ei ole suunniteltu siRNA-molekyylejä, koska ne eivät sisällä vaadittavaa 21 emäsparin mittaista konservoitunutta sekvenssiä. Sen sijaan erityisen lupaaviksi on havaittu NP:n ja PA:n hiljentäminen. Molemmat ovat välttämättömiä cRNA:n ja vRNA:n muodostumiselle ja jos ne poistetaan, kaiken virusRNA:n transkriptio loppuu, jolloin uusia virioneja ei enää synny (Ge ym. 2004). NP:a ja PA:ta vastaan kohdennettujen siRNA-molekyylit on todettu pilkkovan kohdelähetti-RNA, mutta estävän myös muun virusRNA:n transkriptiota infektoituneissa solulinjoissa ja kananalkioissa. Myös *in vivo* hiirimallissa on saatu hyviä tuloksia. Kokeessa kontrolli siRNA:n annostelu hiirille johti 60 % kuolleisuuteen, kun taas yhdistelmä siRNA-molekyylejä, sekä NP:a että PA:ta vastaan, johti 100% eloonjäämiseen (Tompkins ym. 2004). Edellä mainituissa tutkimuksissa siRNA annosteltiin ennen infektiota, mutta siRNA:lla on tehoa myös infektiosta alkamisen jälkeenkin (Ge ym. 2004).

HIV:in  
HIV-1  
sairau  
nikatc  
ficien  
lääkit  
therap  
laatua  
vaihe  
HAAI  
haitta  
kityks  
ei ole  
RNA-  
avulla  
joita  
sa, m  
ja isä  
sen ti  
seura  
sesta  
isäntä  
CXC  
sen l  
virus  
sen I  
maan  
isänn  
mia l  
raker  
iineja  
prote  
vpu-  
U;  
RNA  
hilje  
nemi  
HIV-  
ym.  
nien  
kyyll  
kons  
mää  
kin h  
en R  
rens  
tymi  
maa  
geen  
HIV  
daar  
hilje  
sä o

### HIV:n hoito RNAi:llä

HIV-1 aiheuttaa hitaasti etenevän, kroonisen sairauden, jota loppuvaiheessa seuraa immuunikato eli AIDS (engl. Acquired Immuno Deficiency Syndrome). Nykyisellä yhdistelmä-lääkityksellä (engl. highly active antiretroviral therapy; HAART) voidaan parantaa elämänlaatua ja hidastaa sairauden etenemistä AIDS-vaiheeseen, muttei poistaa virusta elimistöstä. HAART-lääkitys on kallista, aiheuttaa paljon haittavaikutuksia ja vaatii potilaalta tarkkaa lääkityksen seuraamista. Rokotetta HIV:ta vastaan ei ole. HIV on lentivirusten ryhmään kuuluva RNA-retrovirus. HIV tarttuu vaippaproteiinsinsa avulla isäntäsolun pinnan CD4-molekyyleihin, joita esiintyy ihmisellä pääosin auttaja-T-soluissa, makrofageissa ja dendriittisoluisissa. Viruksen ja isäntäsolun lipidikalvojen fuusio eli viruksen tunkeutuminen solun sisälle on puolestaan seurausta viruksen gp120-proteiinin sitoutumisesta jompaankumpaan HIV:n koreseptoreista, isäntäsolun kemokiinireseptori CCR5:een tai CXCR4:ään. Isäntäsoluun päästessään viruksen käänteiskopiointientsyymi kopioi toisesta virusRNA-molekyylistä sille komplementaarisen DNA-molekyylin, joka kulkeutuu solun tumaan ja integroituu sattumanvaraiseen kohtaan isännän genomia. HIV:n integroitunutta genomia kutsutaan provirukseksi. Se koodaa kolmea rakenneproteiinia eli gag-, pol- sekä env-proteiineja, kahtaa säätelyproteiinia eli tat- sekä rev-proteiineja sekä neljä apuproteiinia eli vif-, vpr-, vpu- ja nef-proteiineja.

Useita HIV:n tärkeitä geenejä on hiljennetty RNAi-mekanismeilla. Esimerkiksi gag-geenin hiljentäminen johti virus-RNA:n määrän vähenemiseen riippumatta siitä tehtiinkö transfektio HIV-infektiota ennen vai sen jälkeen (Novina ym. 2002). Vastaavasti myös vif- sekä nef-geenin hiljentäminen synteettisillä siRNA-molekyyleillä ja vif-geenin hiljentäminen shRNA-konstruktilla johtivat merkittävään virus-RNA:n määrän laskuun (Jacque ym. 2002). Pian kuitenkin huomattiin, että pidempiaikainen HIV-geenin RNA-hiljennys johtaa nopeasti RNA-interferenssille vastustuskykyisten viruskantojen syntymiseen. Tämän vuoksi ryhdyttiin kohdentamaan RNA-hiljennystä niihin HIV:n isäntäsolun geeneihin, joita virus tarvitsee lisääntyäkseen. HIV:n isäntäsolun RNA-hiljennyskohteet voidaan jakaa ryhmiin sen perusteella, mihin niiden hiljennyksellä pyritään. Ensimmäisessä ryhmässä ovat ne kohteet, joiden hiljentäminen estää

HIV:n pääsyn solun sisään. Näistä tärkeimmät ovat solun pinnan kemokiinireseptorit CCR5 ja CXCR4, joita hiljentämällä HIV:n lisääntymistä solulinjassa on pystytty vähentämään (Martinez ym. 2002). Toisen ryhmän kohteiden hiljentäminen estää HIV:n transkriptiota. Esimerkiksi ihmisen transkriptiotekijä P-TEFb on HIV:n transkriptiolle välttämätön. P-TEFb koostuu sykliini T1:stä ja CDK9:stä. HIV:n tat-proteiini transaktivoi RNA polymeerasi II:n sykliini T1:n vaikutuksesta, ja kun P-TEFb hiljennetään kohdistamalla siRNA-molekyylillä joko sykliini T1:een tai CDK9:ään, myös tat-proteiinin transaktivaatio ja sitä kautta HIV:n lisääntyminen solulinjassa vähenevät (Chiu ym. 2004). Kolmas kohderyhmä muodostuu molekyyleistä, joiden hiljentäminen estää HIV-RNA:n kuljetuksen tumasta sytoplasmaan. Esimerkiksi yksi ihmisen proteiini, joka on HIV:n rev-proteiinin toiminnalle välttämätön, on nimeltään hRIP (engl. human Rev-interacting protein; hRIP). Kun hRIP hiljennetään siRNA:lla, viruksen lähetti-RNA:n kuljetus tumasta sytoplasmaan estyy (Yu ym. 2005). Neljännen ryhmän kohteiden hiljentäminen estää uusien virionien kokoamisen ja työntymisen ulos solusta. Hiljentämällä isäntäsolun Tsg101-proteiinia voidaan estää uusien HIV-partikkelien työntyminen ulos isäntäsolusta (Garrus ym. 2001).

Kaikkien em. kohteiden hiljentämisellä on havaittu HIV:n replikaation vähentyminen, mutta hiljentymisen kesto on ollut lyhytaikainen. Ratkaisu tähän ongelmaan voi olla shRNA- tai lhRNA-välitteinen RNA-hiljennys. lhRNA (engl. long-hairpin RNA) on shRNA-molekyylillä pidempi silmukanmuotoinen RNA-molekyylillä, josta solun sisällä pilkotaan useita lyhyitä siRNA-molekyylejä. Esimerkiksi tat- ja rev-geenejä vastaan kohdistettujen 50, 53 ja 80 emäsparin mittaisten lhRNA-molekyyliden on todettu ilmentävän haluttuja siRNA-molekyylejä T-soluissa pitkäaikaisesti ja estävän HIV:n lisääntymistä (Sano ym. 2008). Pidempiaikaisen RNA-hiljentämisen seurauksena HIV:sta muodostuu kuitenkin nopeasti vastustuskykyisiä kantoja. Mutaatiot kohdesekvenssissä aiheuttavat sen, ettei siRNA- tai shRNA-molekyylillä tunnisteta enää kohdettaan. Lisäksi mutaatiot muualla kuin kohdesekvenssissä voivat aiheuttaa RNA:n sekundaarirakenteeseen muutoksia, jotka suojaavat kohdesekvenssiä siRNA:lta (Westerhout ym. 2005). Vastustuskykyisten viruskantojen muodostuminen voidaan ehkä välttää kohdentamalla RNA-hiljennys yhtäaikaisesti useampaan koh-

teeseen tai yhdistämällä RNA-hiljennys muihin virusterapioihin. Tällainen on esimerkiksi lentiviruspohjainen vektori, joka sisältää kolme eri geeniä HIV:ta vastaan. Yksi näistä geeneistä tuottaa HIV:n rev- ja tat-proteiineja vastaan kohdistetun shRNA-molekyylin. Yksi vektorin geeneistä tuottaa ribotsyymiin, lähetti-RNA:ta entsyymaattisesti hajottavan yksisäikeisen RNA-molekyylin, kemokiinireseptori CCR5:tä vastaan. Lisäksi vektori sisältää HIV:n transaktivaatiosta vastaavan tat-proteiinin "harhauttaja-proteiinin". Normaalisti tat-proteiini sitoutuu lähetti-RNA-molekyylin LTR-päässä (engl. long terminal repeat; LTR) sijaitsevaan TAR-alueeseen (engl. trans-activating response region; TAR) ja mahdollistaa näin transkription aloittamisen. Vektorista tuotettu "harhauttaja-proteiini" muistuttaa TAR-alueella ja HIV:n tat-proteiiniin sitoutuvaa siihen, jolloin HIV:n RNA-molekyylin transkriptio keskeytyy. Kyseisellä lentivirusvektorilla transdukoituidut hiirten kudokset tuottivat T-soluja, jotka olivat vastustuskykyisiä HIV:lle. shRNA-ribotsyymi-Tat-harhauttajavektorin kehitys on edennyt lääketutkimusten kliiniseen vaiheeseen (Anderson ym. 2007).

### RNA-hiljennysterapian haitat

Vaikka RNAi on spesifinen geenien hiljentämismekanismi, silläkin on haittavaikutuksia. Haittavaikutukset voidaan jakaa immuunijärjestelmän aktivaatiosta johtuviin, väärään lähetti-RNA:han sitoutumisesta johtuviin sekä luonnollisen RNA-hiljennysreitien saturoitumisesta johtuviin vaikutuksiin. Edellä mainittujen haittojen lisäksi vektorit voivat aiheuttaa haittavaikutuksia. Kemiallisella siRNA-molekyylin muokkauksella ja vektorin valinnalla voidaan ainakin osittain välttää haittavaikutuksia. Aluksi uskottiin, että lyhyet alle 21. emäsparin mittaiset kaksisäikeiset RNA-molekyylit eivät aiheuta immuunivastetta. Tutkimukset ovat kuitenkin osoittaneet, että lyhyetkin RNA-molekyylit voivat aktivoida immuunijärjestelmän. siRNA-molekyylin aiheuttama luontainen immuunivaste on joko Toll-like-reseptorien (TLR) kautta välittyvää tai ei-TLR-välitteistä. Soluissa on reseptoreja, jotka normaalisti tunnistavat patogeenien RNA-molekyylejä ja aktivoivat interferoni- ja sytokiinituotantoa. RNA:ta tunnistavia Toll-like reseptoreja ovat TLR3, 7 ja 8. Solujen muita RNA-reseptoreja ovat proteiinikinaasi R (PKR) sekä RIG-I (engl. retinoic acid inducible gene 1) ja MDA-5 (engl. melanoma differentia-

tion-associated gene 5). Plasman dendriittisolut ilmentävät jatkuvasti TLR7:ää ja siRNA-molekyylin esittely näihin soluihin johtaa suoraan voimakkaaseen interferoni alfan (IFN- $\alpha$ ) tuottamiseen (Robbins ym. 2009). Suurin osa solulinjoista ei ilmennä siRNA:n tunnistukselle tärkeitä TLR7:ää tai TLR8:aa, mutta sytoplasman RNA-reseptorien kuten RIG-I:n ilmentyminen on yleisempää ja niiden aktivoituminen johtaa myös interferonivasteisiin (Judge ja MacLachlan 2008).

Myös vektori voi aiheuttaa tai vaikuttaa immuunivasteiden muodostumiseen. Esimerkiksi useimmat ei-viruspohjaiset vektorit ja niiden mukana myös siRNA kuljetetaan solun sisään endosytoosilla suoraan siRNA:n tunnistavien, immuunivasteen aiheuttavien, reseptorien läheisyyteen. Lisäksi siRNA-molekyylin sekvenssi ja rakenne voivat vaikuttaa immuunijärjestelmän aktivaatioon. On huomattu esimerkiksi, että TLR:t tunnistavat erityisesti siRNA-molekyylejä, joissa on runsaasti GU-sekvenssejä. Muut RNA-reseptorit puolestaan tunnistavat siRNA-molekyylejä niiden rakenteen perusteella. Ne esimerkiksi aktivoituvat tunnistessaan siRNA-molekyylin 5' pään trifosfaattiryhmän (Judge ja MacLachlan 2008, Robbins ym. 2009).

Immuunijärjestelmän aktivaatiosta saattaa joissain tapauksissa olla hyötyä terapian kannalta, mutta useimmiten se johtaa ei-toivottuihin vaikutuksiin. Esimerkiksi TLR:en yliaktivaatio aiheuttaa ihmisillä flunssankaltaisia oireita. Immuunivasteet myös vaikeuttavat prekliinisten ja kliinisten siRNA-molekyyleillä tehtävien kokeiden tulkintaa. Tutkimuksissa on varmistettava, että aiheutunut vaste on seurausta RNA-hiljennyksestä eikä immuunivasteesta. Halutun lähetti-RNA:n hiljentymisen lisäksi siRNA- ja shRNA-molekyylit hiljentävät myös solun muita lähetti-RNA-molekyylejä. Niinkin lyhyt kuin 7 nukleotidin mittainen väärälle lähetti-RNA:lle komplementaarinen jakso joko guide- tai passenger-nauhassa voi aiheuttaa ei-toivottujen geenien hiljentymistä. Komplementaarisen jakson sijainnilla siRNA-molekyylissä on myös merkitystä. On esimerkiksi osoitettu, että jos komplementaarinen jakso osuu guide-nauhan 5' pään loppuosaan, siRNA-molekyylit hiljentää kohde-lähetti-RNA:n lisäksi myös useita ylimääräisiä lähetti-RNA-molekyylejä. Tämän tyyppisten haittavaikutusten mekanismi muistuttaa miRNA-välitteistä RNA-hiljentymistä siten, että osittainkin komplementaarisuus lähetti-RNA:n kanssa riittää hiljentämään geenin toiminnan. Lisäksi miRNA-molekyylit tunnistavat

vat s  
naut  
sano  
S:  
silla  
lähet  
mole  
emäl  
hilje  
kun  
kyyli  
vät s  
mole  
ja m  
että  
väliti  
joidet  
tiin e  
hepa  
hilje  
maks  
notek  
hairp  
saane  
kaud  
ei ha  
Tutki  
heutu  
nistat  
shRN  
tyyp  
ja lis  
miRN  
pääte  
välitti  
ta. Y  
tumai  
ym. 2

### Kirja

Anan  
Mallo  
of ge  
USA'

Ande  
Yam  
ty anc  
three  
siRN/  
ved T

vat satoja lähetti-RNA-molekyylejä juuri guide-nauhassa sijaitsevan 7 nukleotidin mittaisen niin sanotun seed-jakson avulla (Jackson ym. 2006).

Samaa kohdetta vastaan suunnatuilla erilaisilla siRNA-molekyyleillä on kullakin erilaiset lähetti-RNA-hiljennysprofiilit. Mikäli siRNA-molekyylin 5'-pään sekvenssistä muutetaan emäksiä, sille muodostuu uusi lähetti-RNA-hiljennysprofiili. Samaa vaikutusta ei havaita, kun emäksiä muutetaan muualta siRNA-molekyylistä. Tämän tyyppiset haittavaikutukset eivät siis ole riippuvaisia kohteesta vaan siRNA-molekyylin sekvenssistä. Koska solu itse tuottaa ja muokkaa miRNA-molekyylit, on mahdollista että ne kilpailevat solun luontaisten miRNA-välitteiseen RNA-hiljennykseen liittyvien tekijöiden kanssa ja satureivat niitä. Tämä havaittiin ensimmäisenä hiirikokeessa, jossa tutkittiin hepatiitti B virusta vastaan suunnatun RNA-hiljennysterapian vaikutuksia. Kokeessa hiirten maksat transdukoitiin virusvektorin avulla keino-otekoisella shRNA-konstruktilla (engl. short hairpin RNA). Useat suuria shRNA-annoksia saaneista hiiristä sairastuivat ja kuolivat kuu-kauden kuluessa transduktiosta. Tutkimuksessa ei havaittu immuunijärjestelmän aktivoitumista. Tutkijat eivät myöskään uskoneet kuolemien aiheutuvan väärien lähetti-RNA-molekyylin tunnistamisesta, koska kaikki tutkitut 23 erilaista shRNA-molekyylä johtivat samanlaiseen fenotyyppiin. shRNA:n toksisuus oli annosvasteista ja lisäksi korreloi selkeästi maksan luontaisten miRNA-molekyylin vähenemisen kanssa. Tästä pääteltiin, että toksisuus johtui hiirten miRNA-välitteisen hiljennysmekanismin satureoitumisesta. Yhdeksi satureoituvaksi tekijäksi ehdotettiin tuman kuljettajaproteiini Exportin 5:tä (Grimm ym. 2006).

### Kirjallisuutta

- Anandalakshmi R, Pruss G, Ge X, Marathe R, Mallory A, Smith T, Vance VA: viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13079-13084, 1998.
- Anderson J, Li M, Palmer B, Remling L, Li S, Yam P, Yee J, Rossi J, Zaia J, Akkina R: Safety and efficacy of a lentiviral vector containing three anti-HIV genes - CCR5 ribozyme, tat-rev siRNA, and TAR decoy in SCID-hu mouse-derived T cells. *Mol Ther* 15, 1182-1188, 2007.
- Chendrimada T, Gregory R, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740-744, 2005.
- Chiu Y, Cao H, Jacque J, Stevenson M, Rana T: Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by RNA interference directed against human transcription elongation factor P-TEFb (CDK9/CyclinT1). *J Virol* 78, 2517-2529, 2004.
- Dougherty WG, Lindbo JA, Smith HA, Parks TD, Swaney S, Proebsting WM: RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol Plant Microbe Interact* 7, 544-552, 1994.
- Garrus J, von Schwedler U, Pornillos O, Morham S, Zavitz K, Wang H, Wettstein D, Stray K, Côté M, Rich R, Myszka D, Sundquist W: Tsg101 and the vacuolar protein sorting pathway are essential for HIV-1 budding. *Cell* 107, 55-65, 2001.
- Ge Q, Eisen H, Chen J: Use of siRNAs to prevent and treat influenza virus infection. *Virus Res* 102, 37-42, 2004.
- Gregory R, Chendrimada T, Cooch N, Shiekhattar R: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* 123, 631-640, 2005.
- Grimm D, Streetz K, Jopling C, Storm T, Pandey K, Davis C, Marion P, Salazar F, Kay M: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441(7092):537-541.
- Haasnoot J, Westerhout E, Berkhout B: RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotechnol* 25, 1435-1443, 2007.
- Hall T: Structure and function of argonaute proteins. *Structure* 13, 1403-1408, 2005.
- Hammond S, Bernstein E, Beach D, Hannon G: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000;404(6775):293-296.
- Haussecker D: The business of RNAi therapeutics. *Hum Gene Ther* 19, 451-462, 2008.
- Jackson A, Burchard J, Schelter J, Chau B, Cleary M, Lim L, Linsley P: Widespread siR-

NA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA* 12, 1179-1187, 2006.

Jacque J, Triques K, Stevenson M: Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418, 435-438, 2002.

Judge A, MacLachlan I: Overcoming the innate immune response to small interfering RNA. *Human Gene Ther* 19, 111-124, 2008.

Kapadia S, Brideau-Andersen A, Chisari F: Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 2014-2018, 2003.

Ketting R, Haverkamp T, van Luenen H, Plasterk R: Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell* 99, 133-141, 1999.

Komano J, Miyauchi K, Matsuda Z, Yamamoto N: Inhibiting the Arp2/3 complex limits infection of both intracellular mature vaccinia virus and primate lentiviruses. *Mol Biol Cell* 15, 5197-5207, 2004.

Lim L, Lau N, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter J, Castle J, Bartel D, Linsley P, Johnson J: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433, 769-773, 2005.

Lippman Z, May B, Jordan C, Singer T, Martienssen R: Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. *PLoS Biol* 1(3):E67, 2003.

Liu J, Valencia-Sanchez M, Hannon G, Parker R: MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723, 2005.

Martínez M, Gutiérrez A, Armand-Ugón M, Blanco J, Parera M, Gómez J, Clotet B, Esté J: Suppression of chemokine receptor expression by RNA interference allows for inhibition of HIV-1 replication. *AIDS* 16, 2385-2390, 2002.

Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Lührmann R, Tuschl T: Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574, 2002.

Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel D, Zamore P: Passenger-strand cleavage facilitates assemb-

ly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607-620, 2005.

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 15, 185-197, 2004.

Mourrain P, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J, Jouette D, Lacombe A, Nikic S, Picault N, Rémoúé K, Sanial M, Vo T, Vaucheret H: Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101, 533-542, 2000.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen RA: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289, 1990.

Novina C, Murray M, Dykxhoorn D, Beresford P, Riess J, Lee S, Collman R, Lieberman J, Shankar P, Sharp P: siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nat Med* 8, 681-686, 2002.

Robbins M, Judge A, MacLachlan I: siRNA and innate immunity. *Oligonucleotides* 19, 89-102, 2008.

Sano M, Li H, Nakanishi M, Rossi J: Expression of long anti-HIV-1 hairpin RNAs for the generation of multiple siRNAs: advantages and limitations. *Mol Ther* 16, 170-177, 2008.

Scherer L, Rossi J, Weinberg M: Progress and prospects: RNA-based therapies for treatment of HIV infection. *Gene Ther* 14, 1057-1064, 2007.

Tabara H, Sarkissian M, Kelly W, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A, Mello C: The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* 99, 123-132, 1999.

Tang G, Reinhart B, Bartel D, Zamore P: A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* 2003;17(1):49-63.

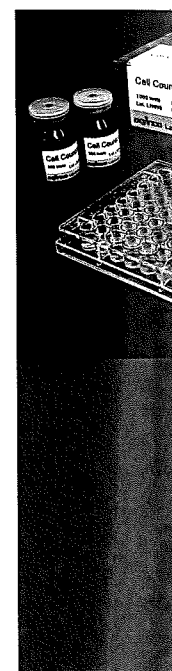
Tompkins S, Lo C, Tumpey T, Epstein S: Protection against lethal influenza virus challenge by RNA interference in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 8682-8686, 2004.

Tuschl T, Zamore P, Lehmann R, Bartel D, Sharp P: Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* 13, 3191-3197, 1999.

Van de Stuijje  
of lim  
a supp  
291-29

Westerhout  
ence  
RNA  
2005.

Winter  
richs  
bioger  
Cell B



**BIOT**  
www.biotop.fi



Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JNM, Stuitje AR: Flavonoid genes in petunia: addition of limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2, 291-299, 1990.

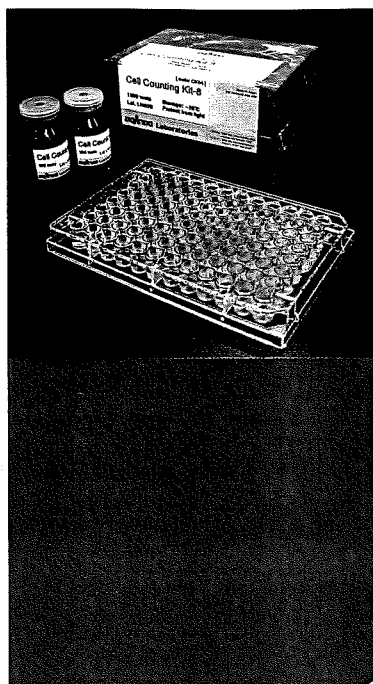
Westerhout E, Ooms M, Vink M, Das A, Berkhout B: HIV-1 can escape from RNA interference by evolving an alternative structure in its RNA genome. *Nucleic Acids Res* 33, 796-804, 2005.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory R, Diederichs S: Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* 11, 228-234, 2009.

Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DA: viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167, 2000.

Zamore P, Tuschl T, Sharp P, Bartel D: RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101(1):25-33.

Yu Z, Sánchez-Velaz N, Catrina I, Kittler E, Udofia E, Zapp M: The cellular HIV-1 Rev cofactor hRIP is required for viral replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 102, 4027-4032, 2005.



Dojindo

**dojindo**

## Cell Counting Kit-8

### CELL VIABILITY & CYTOTOXICITY ASSAY KIT

**SIMPLE** ➤ Colorimetric microplate assay  
One-bottle, ready-to-use solution  
No harvesting, washing or solubilization step

**SAFE** ➤ No toxicity to cells  
No organic solvent or isotope required

**SENSITIVE** ➤ More sensitive than MTT, XTT, MTS or WST-1

More sensitive than  
MTT, XTT, MTS or WST-1

CODE	PRODUCT	PRICE
CK04-11	Cell Counting Kit-8, 1000 tests	267€
CK04-12	Cell Counting Kit-8, 3000 tests	533€
CK04-20	Cell Counting Kit-8, 10000 tests	1467€

#### FOR MORE INFORMATION

Biotop Oy [www.biotop.fi](http://www.biotop.fi)  
City-Lab Oy [www.city-lab.fi](http://www.city-lab.fi)  
Dojindo [www.dojindo.com](http://www.dojindo.com)

**BIOTOP** JL

[www.biotop.fi](http://www.biotop.fi)

Tykistökatu 6 B 3 | 20520 TURKU | puh. (02) 241 0099 | [myynti@biotop.fi](mailto:myynti@biotop.fi)