

SiRNS-technológia, a jövő génterápiája?

RÁCZ ZSUZSANNA és HAMAR PÉTER DR.

Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Kóréletani Intézet, Budapest

A genetikában új korszak kezdődött 17 éve, amikor a petúniában felfedezték a koszsüpressziót. Később a koszsüpressziót azonosították a növényekben és alacsonyabb rendű eukariótákban megfigyelt RNS-interferenciával (RNSi). Bár a növényekben ez ősi vírusellenes gazdaszervezeti védekezőmechanizmus, emlősökben az RNSi élettani szerepe még nincs teljesen tisztázva. Az RNSi-t rövid kettős szálú interferáló RNS-ek (short interfering RNA, siRNS) irányítják. A jelen cikkben összefoglaljuk az RNSi történetét és mechanizmusát, az siRNS-ek szerkezete és hatékonysága közötti összefüggéseket, a célsejtbe való bejuttatás virális és nem virális módjait. Az siRNS-ek klinikai alkalmazásának legfontosabb akadályai az *in vivo* alkalmazás. Bár a hidrodinamikus kezelés állatokban hatékony, embereknél nem alkalmazható. Lehetőséget jelent viszont a szervspecifikus katéterezés. A szintetizált siRNS-ek ismert mellékhatásait szintén tárgyaljuk. Bár a génterápia ezen új területén számos problémával kell szembenézni, a sikeres *in vitro* és *in vivo* kísérletek reményt jelentenek emberi betegségek siRNS-sel történő kezelésére.

Kulcsszavak: RNS-interferencia (RNSi), rövid interferáló RNS (siRNS), bevitel, humán génterápia

SiRNA technology, the gene therapy of the future? A new era in genetics started 17 years ago, when co-suppression in petunia was discovered. Later, co-suppression was identified as RNA interference (RNAi) in many plant and lower eukaryote animals. Although an ancient antiviral host defense mechanism in plants, the physiologic role of RNAi in mammals is still not completely understood. RNAi is directed by short interfering RNAs (siRNAs), one subtype of short double stranded RNAs. In this review we summarize the history and mechanisms of RNAi. We also aim to highlight the correlation between structure and efficacy of siRNAs. Delivery is the most important obstacle for siRNA based gene therapy. Viral and nonviral deliveries are discussed. In vivo delivery is the next obstacle to clinical trials with siRNAs. Although hydrodynamic treatment is effective in animals, it cannot be used in human therapy. One possibility is organ selective catheterization. The known side effects of synthesized siRNAs are also discussed. Although there are many problems to face in this new field of gene therapy, successful *in vitro* and *in vivo* experiments raise hope for treating human disease with siRNA.

Keywords: RNA interference (RNAi), short interfering RNA (siRNA), delivery, human gene therapy

(Beérkezett: 2007. november 21.; elfogadva: 2007. november 26.)

A génterápia lehetősége a jelenlegi legérdekesebb témák egyike. A DNS kettős spirálszerkezet felfedezésének ötvenedik évfordulóján Watson kijelentette a Time magazinnak, hogy ötven éve a legérdekesebb projekt a genetikai anyag szerkezetének a feltárása volt [1]. Ezzel kezdődően a génterápia a tudományos-fantasztikus irodalomból a klinikai kezeléseket realisztikusan választható lehetőségévé lépett elő. Bár az első klinikai kipróbálásokat súlyos, nem kívánt események miatt betiltották: tízből két páciensnél T-sejtes leukémia fejlődött ki X-kapcsolt súlyos kombinált immunhiány (X-linked severe combined im-

mune deficiency, X-SCID) kezelésére irányuló retrovírus alapú génterápiát követően [1]. Ennek ellenére az amerikai Élelmiszer- és Gyógyszer-engedélyezési Hivatal (Food and Drug Administration) több mint 169, különböző fázisokban lévő génterápiás klinikai kipróbálást tart nyilván [2]. Az RNS-interferencia (RNSi), amelyet rövid interferáló RNS-k (siRNS-ek) segítségével végzünk, a génterápia legígéretesebb területeinek egyikévé vált. Az siRNS-ek alkalmazásának lehetőségei a fertőző és autoimmun betegségektől a rosszindulatú daganatokig és genetikai rendellenességekig terjedhetnek [3].

Az RNS-interferenciával elért géncsendesítés története és élettani szerepe

Az RNS-interferencia (RNSi) a géncsendesítés egy típusa, amit először növényekben [4] és gerinctelenekben [5] figyeltek meg. Növényekben az RNSi megvédi a génállományt a vírusoktól és a transzpozonoktól, de az emlőssejtekben betöltött szerepét még nem ismerjük teljesen.

Az RNS-interferenciát először a petúniában írták le [6]. *Jorgensen és munkatársai* kimutatták, hogy a kívülről bejuttatott molekulák képesek a gazdaszervezet géneinek expresszióját módosítani. Ezt a folyamatot „koszuppresszió” nevezték el. Később *Mello és munkatársai* antiszensz RNS-eket (asRNS-eket) alkalmaztak a *Caenorhabditis elegans* hengeresféregben. Ez volt a géncsendesítés első állatmodellje [7]. Megfigyelték, hogy ha a *C. elegans*-ba hosszú kettős szálú RNS-eket (double stranded RNA, dsRNS) juttattak be, az a homológ hírvívő (messenger) RNS (mRNS) célzott degradációját okozta. Továbbá a dsRNS szensz és antiszensz RNS-számainak egyszerre történő beadása akár tízszer hatékonyabb csendesítést eredményezett, mint egy szál egyedüli használata. Ezt az eljárást poszttranszkripció géncsendesítésnek (post-transcriptional gene silencing, PTGS) nevezték el. Feltételezték még, hogy a PTGS a növényekben, gombákban és *Drosophilában* megfigyelt koszuppresszió rokona [8]. Bár az RNSi alacsonyabb rendű eukariótákban történő felfedezése nem váltott ki számottevő érdeklődést, az orvosbiológiai kutatás figyelme egy csapásra az RNSi-re irányult, amikor felfedezték emlőssejtekben való előfordulását. *Tuschl és munkatársai* kimutatták, hogy az RNSi emlőseredetű tenyésztett sejtekben siRNS-ekkel kiváltható [9]. Mostanáig az siRNS-eket már sikeresen alkalmazták géncsendesítésre számos állatmodellben, mint például nematoda- [10], *Drosophila*- [11], hidra- [12], zebradánió- [13], egér- [14, 15] és patkánymodellekben [16].

Az RNS-interferencia *in vivo* funkciója a gazdaszervezet védelme vírusoktól és idegen génektől, mivel a vírusok életciklusa során gyakran keletkeznek dsRNS-ek [17]. Az idegen RNS-szekvenciák felismerése és hasítása a vírusos fertőzés gátlását eredményezi. Bár az RNSi a növényekben ősi

vírusellenes védelem, még nem tisztázott, hogy az ilyen típusú PTGS-mechanizmusnak van-e szerepe az emlőssejtek természetes vírusellenes védelmében vagy a génszabályozás más folyamataiban.

Az RNSi biokémiai mechanizmusa

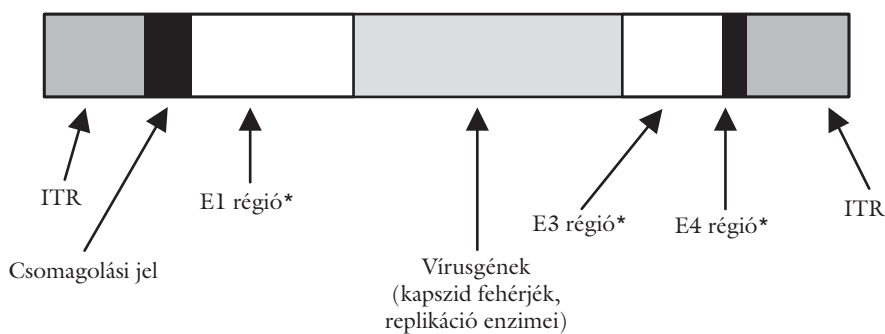
A hosszú dsRNS-eket a ribonukleázok Rnáz-III családjába tartozó Dicer alakítja át siRNS-é. Az siRNS-eknek van egy szabad 5'-foszfát végük, amit 19 bázispár (bp) hosszú kettős szálú RNS követ, a 3' végen két párosítatlan nukleotidból álló túlnyúló résszel [18]. A felismert siRNS-ek beépülnek az RNS indukálta csendesítő (RNA induced silencing complex, RISC) több alegységből álló ribonukleoprotein-komplexbé. A RISC-ben az siRNS-ek széttekerednek, szensz és antiszensz száakra bomlanak. Az antiszensz szál irányítja a cél-mRNS felismerését és hasítását. Az aktivált RISC tartalmazza

- az antiszensz RNS-szálat,
- továbbá egy fehérjét, amely homológ a növényi *Argonaute* géncsalád termékével (fehérjetermékek, amelyek az RNSi-ben részt vevő RNS-kötő fehérjék),
- továbbá más, nem jellemzett faktorokat is tartalmaz, amelyek közé tartozik egy, a cél-RNS hasításáért felelős endonukleáz.

Az mRNS elhasítása következtében a transzkripció és transláció teljes folyamata megszakad. Más szóval, a fehérjeszintézis a genom intaktsága mellett gátlódik (*1. ábra*).

Az RNSi élettartama

Az RNSi-vel végzett csendesítés nem teljes, ami azt jelenti, hogy az eredmény a génexpresszió visszaszorítása (knock-down) és nem a kiiktatása (knockout). Gyorsan osztódó sejtekben az siRNS transzfekciójának a transzfekció után 2–3 napig van maximális hatása, a csendesítő hatás maximum egy hétig tart. A hatékony csendesítés elvesztése feltételezhetően a sejtosztódásokkal bekövetkező siRNS-hígulásnak tudható be. A végállapotú differenciált sejtekben, mint például a makrofágokban, az *in vivo* RNSi-hatások több napig tartanak egyetlen dózis beadása után [19].



ITR = invertált terminális ismétlődés, * = kivágható és/vagy beilleszthető régió

1. ábra Adenovírus-vektorok szerkezete

Bejuttatási stratégiák

Az RNSi-t alkalmazó terápia számára a bejuttatás még komoly akadályt jelent, mivel az emlőssejtek sejtmembránja az siRNS-ek számára nem átjárható, és a legtöbb *in vitro* kísérletben alkalmazott transzfekciós módszer nem alkalmazható *in vivo*. Továbbá a gyors vesekiválasztás miatt az siRNS-ek *in vivo* felezési ideje nagyon rövid (a másodpercek/percek tartományba esik). A szintetikus siRNS-ek bejuttatására megoldás lehet az siRNS-prekursorok expressziója vírusvektorokból, esetleg a komplexálás, vagy összekapcsolás hordozó lipidekkel vagy fehérjékkel (2. ábra). Az siRNS-ek egyszerű peptidekhez kapcsolásáról kimutatták, hogy felerősíti az siRNS-ek sejtmembránon keresztüli transzportját [20]. A sejtspecifikus bejuttatás, amely során az siRNS-eket sejtfelszíni receptorligandokhoz vagy antitestekhez kapcsoljuk, lecsökkenthetné a potenciális toxicitást mind a virális, mind a nem virális eredetű vektorrendszerekben.

Számos vírusalapú és nem vírusalapú expressziós rendszer teszi lehetővé az siRNS-ek sejtekbe juttatását, mint például adenovírus, adenoasszociált vírus, onkoretrovírus, lentivírusvektorok, liposzómák, nanorészecskék vagy peptid-lipid transzfekciós eljárások.

Vírusalapú bejuttatási stratégiák

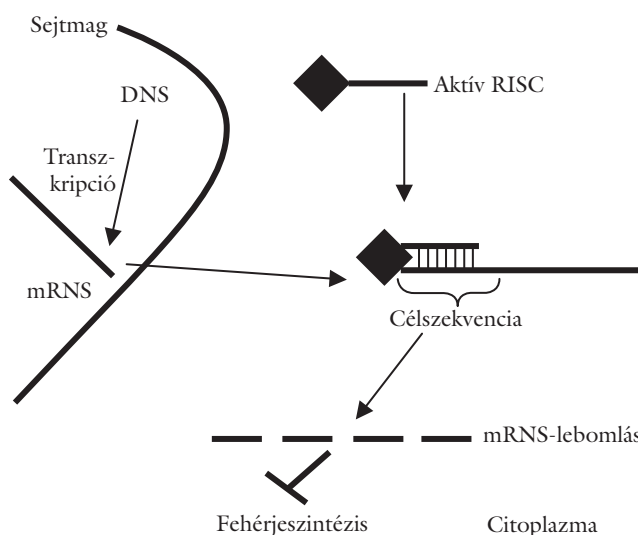
Az újabb vírusalapú RNSi-vel végzett génterápiás kísérletekben többfajta vírusvektort alkalmaztak, a leggyakoribbakat (adenovírus-, adenoasszociált vírus-, retrovírus- és lentivírusvektorokat) ebben a fejezetben tekintjük át.

Az *adenovírus-vektorokat* (AdV-k) gyakran alkalmazzák génterápiás kísérletekben, sőt klinikai kísérletekben is. Az AdV-knek számos előnye van:

- egyszerű nagy titerben előállítani,
- viszonylag nagy méretű transzgént képesek a célsejtbe juttatni (az AdV-k képesek több mint 30 kb méretű transzgénnel *in vivo* transzdukálni sejteket),
- széles a sejttropizmusuk,
- nem épülnek be a gazdasejt genomjába,
- a géntranszfer nagy hatásfokú,
- az AdV-knek emberekben alacsony a patogenitása [21].

Szisztémás beadást követően az adenovírusok percekben belül felhalmozódnak a májban a szinuszoidális fenestrációknak köszönhetően. Az AdV-k alkalmazásának fő hátránya a transzgenexpresszió rövidege (néhány naptól pár hétig tart) és a vektorok által expresszált vírusfehérjék okozta gyulladásozó reakció. Ezek a vírusfehérjék röviddel a beadás után stimulálják a veleszületett immunrendszert. Továbbá a beadás után 2–7 nappal a vektor által kódolt MHC-prezentált fehérjék beindítják a szerzett immunválaszt, általában azt követően, hogy a gazdasejtek antitesteket termeltek a vírus kapszid antigénjei ellen [22].

Előállíthatók olyan rekombináns adenovírus-vektorok, amelyeknél a vírusgéneket az E1-, E2- és E3-régiókban vagy az E4-régió és a vírusgenom vége közötti részben terápiás célú szekvenciákkal helyettesítik.



2. ábra A csendesítő mechanizmus: RNSi szintén inicializálható kémiai szintetizált siRNS-ek sejtekbe juttatásával. Ezek a molekulák 19–21 bázispár méretű RNS-ek, amelyek a célszekvenciával homológok

Az egyik leggyakrabban alkalmazott adenovírus-vektor az 5. típusú adenovírus (Ad5). Az Ad5-ből származik az adenovírus-vektorok első és második generációja és az úgynevezett nagy kapacitású vagy „kibelezett” vektorok. Az első generációs vektorokból kivágták az E1-régiót, a második generációs vektorokból az E1- mellett az E2- és/vagy az E4-régiókat is. Az első generációs vektoroknak lehet további deletiója az E3-régióban, amely régió a vírusreplikációért felel. A nagy kapacitású (high capacity, HC) vagy „kibelezett” (gutted) Ad-vektorokból hiányzik az összes kódoló vírusgén, csak az invertált terminális ismétlődéseket (inverted terminal repeats, ITR-ek) és a csomagolási jelet (packaging signal) tartalmazzák, amiről kimutatták, hogy *in vivo* csökkenti a toxicitást és az immunogenitást [23]. A replikációkompetens (replication-competent, RC) Ad-vektorok az E1A- és E1B-régiókban tartalmaznak deletiókat is, amelyek fehérjetermékei (E1A, E1B) normális esetben megkötik és inaktíválják a Retinoblastoma-proteint (Rb) és a p53-at, így aktiválva a sejtciklust. Tehát az RC-Ad-vektorokat alkalmazhatjuk p53- vagy Rb-negatív tumorokban [24].

Adenoasszociált vírus vektorok. A *Dependovirus* nemzetség tagjai, az adenoasszociált vírusok (AAV) számára a replikációhoz szükséges egy ún. segítő vírus, mint például adenovírus. Miután a gazdasejt sejtmagjába bekerül, az AAV-nak kétfajta életciklusa lehet: a litikus és a lizogén út vonal. Az első a segítő vírussal fertőzött sejtekben fejlődik ki, míg a lizogén út vonal esetében nincs szükség a segítő vírusra, és az AAV-genom beépül a 19. kromoszóma hosszú karjára és ott marad látens alakban [25]. A gazdaszervezet genomjába történő beépülése miatt az AAV-vektorokból származó transzgenexpresszió akár 18 hónap hosszan is tarthat (lásd később). Az expresszió ezen hosszú élettartama kihasználható RNSi-ben, ha hosszú távú expresszió szükséges.

AAV-vektorok birtokolják mind az adenovírus-, mind a retrovírusvektorok előnyeit, amelyek a következők:

- gének átvitelének különböző sejt típusokba, még osztódó és nem osztódó sejtekbe is,
- széles gazdavalaszték,
- alacsony szintű immunválasz,
- génexpresszió megnyúlt élettartama (akár 18 hónappal az rAAV injektálása után).

A *retrovírusvektorral* létrehozott géntranszfer vonzó az orvosi biológiai kutatás számára, mivel a retrovírusoknak számos előnyük van a többi vírussal szemben. A retrovírus virion körülbelül 80–100 nm átmérőjű, a gazdasejt plazmamembránjából származó lipid-kettősrétegbe burkolva. A retrovírusok egyik legfontosabb előnye az, hogy képesek a saját egyszálú RNS-genomjukat a gazdasejt genomjába transzformálni. Ez a stabil integráció a célsejt genomjába akár 8–9 kb idegen DNS tartós bevitelét teszi lehetővé. A retrovírusvektorok használhatók még rövidhajtú-RNS (short hairpin RNA, shRNS) bejuttatására RNS-polimeráz-III- (Pol-III-) promóter, mint például U6 vagy H1 (lásd alább) szabályozása alatt.

A replikációra képtelen retrovírusokból hiányzik az összes vírusgén, a vírus előállításához szükségük van csomagoló sejt vonalra vagy segítő vírusra (helper vírus). A hibás replikációjú retrovírusvektorok nagy előnye a transzgen nagyobb mérete és az enyhébb immunválasz. A retrovírust alkalmazó génterápiás kísérletek egyik fő hátránya a transzgen beillesztése során potenciálisan fellépő mutagenézis. Egy retrovírusgenom aktívan átíródó génekbe és/vagy protoonkogénekbe integrálása rosszindulatú daganatokhoz vezethet, mint például az X-kromoszómához kötött súlyos kombinált immunhiányosság kifejlődése (X-linked severe combined immune deficiency, X-SCID) retrovírust alkalmazó génterápiás kezelés után tíz páciensből kettőnél [26]. A retrovírusok azon képessége, hogy visszaalakulhatnak replikációra képes retrovírusokká (replication-competent retrovírus, RCR), azt jelenti, hogy a gazdasejt genomjába történő véletlenszerű retrovírus-integráció következtében lehetővé válik a daganatok előfordulása és az onkogénaktiválódás (insertió mutagenézis).

A hatékony fertőzéshez számos vírusfajtnál szükséges a sejtszétválás, így a nem osztódó sejteket általában nehéz transzdukálni. A retrovírusok egyik alosztálya, a *Lentivírusok* családja képes megfertőzni nem osztódó sejteket, és képes a transzgenek hosszú távú expresszióját fenntartani. A tudomány jelenlegi állása szerint már sikeresen transzfektáltak lentivírusvektorokkal számos sejt típusot. Népszerűvé teszi a lentivírusvektorokat a génterápiás kísérletekben az a képességük, hogy a gazda genomjába stabilan integrálódnak. Az adenovírus-transzgenexpresszió 6 hetével szemben a lentivírus-expresszió akár 6 hónap is lehet.

A vírusvektorok segítségével végzett génterápiát összefoglalva, a fentebb említett összes vírusvektort már alkalmazták RNSi-re. Mindegyik kísérlet fő része a megfelelő vektorrendszer kiválasztása volt. A szövetspecifikus promóterek és a célsejtek felszínén található specifikus receptorok ellen irányított vírusantigének széles skálája következtében

szinte minden sejt típusot transzdukálhatunk vírusvektorokkal. Továbbá a vírusvektorokat egyszerű előállítani és alkalmazni. Ha stabil transzgenexpresszióra van szükségünk, retrovírus- és AAV-vektor-rendszereket kell alkalmaznunk. Az összes többi vektorból származó expresszió csak átmeneti. A vírusvektorok egyik fő hátránya a gazdaszervezet immunválasza és a vírust semlegesítő antitestek termelődése röviddel a vírusvektor első beadása után, ami megakadályozza a virális vektor azonos szerotípusának ismételt alkalmazását. Ennek a problémának a megoldásában segíthet a vírusantigének változtatása. A gazdatropizmus szélesítésére vagy szűkítésére alkalmazhatjuk a pszeudotipizálást és a vírus burkának módosítását.

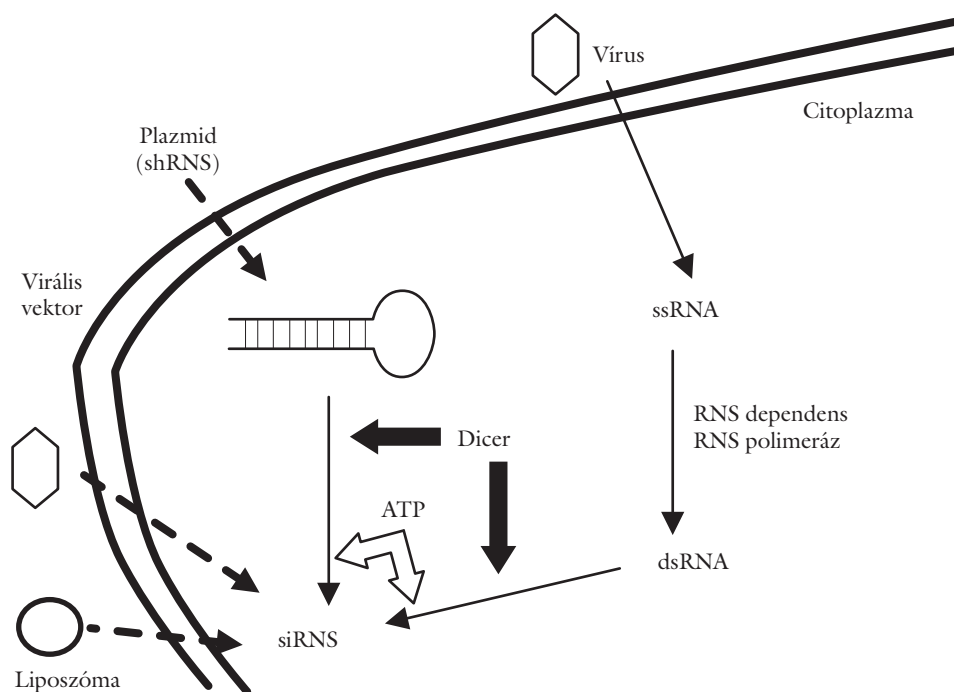
Nem vírusalapú bejuttatási stratégiák

Amint az feljebb látható, a vírusvektorok számos esetben nem alkalmazhatók. Ilyenkor meg kell fontolni a nem vírusos bejuttatási módszereket. Számos stratégia létezik hatékony nem vírusos bejuttatás elérésére mind *in vitro*, mind *in vivo*.

Az siRNS-ek *in vivo* bejuttatásából származó gyógyászati előnyt egereken már igazolták. Szintetikus siRNS-ek *in vivo* sejtbe juttathatók módosított „hidrodinamikusan transzfekciós eljárással”, egy nagynyomású injektáló módszerrel, amelyet eredetileg antiszensz oligonukleotidok és plazmid-DNS bejuttatására dolgoztak ki. Rágcsálónál a hidrodinamikusan kezelésre a fark vagy a hímvessző vénáit alkalmazhatjuk. Amikor az siRNS-eket gyorsan (másodpercek alatt), nagy térfogatban (az állat keringő vértérfogatának 50–100%-át) intravénásan injektáljuk, a folyadék feltorlódik a vena cava vénás rendszerében, és olyan magas vénás és kapilláris nyomást hoz létre, amely átpréseli az siRNS-eket a bő vérellátású parenchimás szervek (máj, vese, stb.) endothel rétegén [19]. Korábbi kísérletekben hidrodinamikusan kezelést követően egerek májában a hepatocyták körülbelül 90%-a felvette az siRNS-t, ami a Fas-apoptózis-receptor expresszióját 80–90%-ban gátolta [15].

Bár egerekben hatékony, a hidrodinamikusan kezelés nem alkalmazható humán klinikumban. Esetleg megfelelő alternatíva lehet az siRNS helyi bejuttatása szövetekbe kisebb térfogatú injekcióval vagy helyi (szervspecifikus) vénák katéterezésével. Már számos kísérletben bizonyították, hogy az siRNS-ek bejuttathatók a központi idegrendszerbe [27], a szubretinális térbe [28] és a peritoneális üregbe [29], ahol ki is fejtik hatásukat.

Az siRNS-ek sejtekbe történő bejuttatását megvalósíthatjuk rövidhajtú-RNS-eket (short hairpin RNS, shRNS) expresszáló plazmidokkal is. A sejtek sikeres transzfekció után elkezdik termelni a kódolt shRNS-t. Az shRNS-ek rövid, speciális szerkezetű RNS-ek: szensz szál – hajtúkanyar (5–9 bp) – komplementer antiszensz szál. Az shRNS szintézisét követően a hajtút a termelő sejtben található Dicer hasítja, az eredmény siRNS (3. ábra). Mivel ez a folyamat a sejtek belsejében történik, és az shRNS-rendszerek (shRNS-t kódoló plazmidok) jóval stabilabbak biológiai folyadékok-



3. ábra Külső és belső útvonalak, amelyeken gátló siRNS kerülhet a sejtbe [a jobb oldali nyilak: RNSi élettani szerepe, szaggatott nyilak (balra): az siRNS közvetlen bejuttatása a sejtekbe gyógyászati céllal]

ban, mint az siRNS-ek [30], a csendesítési hatékonyság fel-erősödik. Bizonyos szövetekben vagy sejtípusokban úgy ér-
hetjük el az shRNS-k expresszióját, hogy az shRNS-eket
szövetspecifikus vagy indukálható promóterrel rendelkező
plazmidokban expresszáljuk.

Az siRNS-sel végzett géncsendesítés lehetséges mellékhatásai

Az siRNS-ek nagy koncentrációban való alkalmazása az in-
terferonrendszer aktiválásához vezethet, vagy előfordulhat,
hogy a célgénen kívül más géneket is elcsendesít (off-target
hatás).

Interferonválasz

A duplex RNS-molekulák a sejtek citoplazmájában mélyre-
ható élettani reakciót válthatnak ki. Egyetlen dsRNS-mole-
kula (amely a legtöbb vírusfertőzés esetén kialakul) elég ah-
hoz, hogy indukálja az interferonok (IFN) szintézisét. Az
interferonok többfunkciós citokinek, amelyek a gazdaszer-
vezet immunológiai funkcióit modulálják, és képesek gátol-
ni a tumorsejt-növekedést és a vírusreplikációt. A legtöbb
dsRNS vagy vírusfertőzés az I. típusú IFN-okat indukálja,
ezek az IFN- α és az IFN- β .

A citoplazmában található dsRNS aktiválja a dsRNS akti-
vált fehérje-kináz-R-t (protein kinase-R, PKR). A dsRNS
PKR-hez kötődése a PKR autofoszforilációjához vezet. Az
aktiválást követően két reakcióút ismert a PKR-től kiindulva.

Az első reakcióút során az aktivált PKR aktiválja a nukleá-
ris (transzkripció) faktor (NF)- κ B-t az I κ B-regulátor-fehérje
foszforilálásával. Az aktivált NF- κ B transzlokálódik a sejtma-
gba, és aktiválja a promóter régiókban NF- κ B-kötőhellyel
rendelkező gének transzkripcióját [31], ezek közül is leg-
gyakrabban az IFN- β génjét.

Az aktivált PKR-től ismert másik reakcióút a translációs
elongációt iniciáló faktor- α alegységének (EIF α) a foszforilá-
ciója. Az EIF α foszforilációjának hatására gátlódik a transz-
láció és ezzel a sejt teljes (nem specifikus) fehérjeszintézise.
A vírusellenes válasz részeként a dsRNS-ek aktiválják a 2',5'-
oligoadenilát-szintetáz (2',5'-oligoadenylate synthetase,
OAS), ami az ATP hosszú oligoadenilát-láncokká történő
feldarabolása révén aktiválja a ribonukleáz-L-t (RNázL). Az
aktív RNázL lebontja a nem specifikus celluláris RNS-eket,
így felfüggeszti a vírusfertőzést.

Az IFN-válasz kiváltásának PKR-független útján a
dsRNS közvetlenül is aktiválhatja az IFN-ek expresszióját.
A szintézist követően a sejt környezetébe bocsátja az
IFN-eket (parakrin hatás). A kiválasztott IFN-ek a kör-
nyező sejtekben indukálják az IFN-stimulált géneket
(ISG-k) [32].

Az siRNS-kísérletek első éveiben azt gondolták, hogy az
siRNS-ek túl kicsik ahhoz, hogy interferonválaszt indukáljan-
ak. *Sledz és munkatársai* felfedezték, hogy a különböző cél-
gén ellen tervezett siRNS-ek interferonválaszt aktiváltak *in*
vitro [33]. *Fish és munkatársai* megfigyelték, hogy 21 nt
hosszúságú shRNS-szekvenciákat expresszáló lentivírusvek-
torokkal fertőzött sejtekben az OAS1-gén indukálódott
[34]. Ugyanakkor, saját kísérleteinkben 2 különböző siRNS-
t alkalmazva nem találtunk emelkedést az OAS1 expresszi-
ójában *in vivo*.

A célgéneken kívüli csendesítés (off-target silencing)

Az siRNS és a cél-mRNS közötti tökéletes bázispárosítás következtében a csendesítés specifikus. Megfigyelték azonban [35], hogy az siRNS-ek magas koncentrációja képes célgéneken kívüli más gének csendesítésére is (off-target silencing). A célponton kívüli csendesítés azt jelenti, hogy az siRNS nemkívánatos módon, csak részlegesen komplementer szekvenciákat is gátol. A multiplex endokrin neoplázia 1- (MEN1-) gén ellen célzott tíz siRNS-ből a négy leghatékonyabb közül egy fokozta a p53- és a p21-expressziót, egy másik siRNS csökkentette a p21 mennyiségét, míg további kettő nem okozott jelentős változást a p53- és p21-szintekben az áltranzfektált sejtekhez képest. Az siRNS-ek 10 nM-re titrálása csökkentette a MEN1-gén csendesítését, de nem szüntette meg a p53-ra és a p21-re gyakorolt nem specifikus hatást [36]. Következésképpen, a célgéneken kívüli csendesítés hatását már alacsony koncentrációjú siRNS is kiválthatja. A probléma megoldható az siRNS-ek gondos tervezésével és/vagy különböző siRNS-szekvenciák tesztelésével, hogy kiválasszuk a legjobb célspecifikus/célon kívüli profillal rendelkező szekvenciát.

Sledz és munkatársai megfigyelték, hogy hosszú, 500 bp méretű dsRNS-ek (amelyek megtalálhatók *Drosophilában* és hengeresféregben) a PKR aktiválásával képesek nem specifikus szuppressziót létrehozni (a nem specifikus szuppresszió PKR-hiányos sejtekben 25%-os volt, a vad fenotípusú sejtek 75%-ával szemben) [33].

Jackson és munkatársai megfigyelték, hogy emlőssejtenyészetben az eredeti siRNS-koncentráció ezredére csökkentése sem szüntette meg teljesen a célgéneken kívüli csendesítést. Továbbá olyan nem célzott gének csendesítése, amelyek az siRNS csak tizenegy folyamatosan illeszkedő nukleotidját tartalmazták, elég volt a célponton kívüli csendesítés kiváltásához [37]. A nem szekvenciaspecifikus (célon kívüli) csendesítés problémájának megoldása a különböző szekvenciák *in vivo* (állatmodellekben végzett) tesztelése lehet.

Az RNSi gyógyászati alkalmazása

A genetikai anyagban előforduló bármilyen elváltozás a géncsengesítés célpontja lehet. A genetikai elváltozások mellett RNSi-vel szintén kezelhetünk fertőzéseket (mind akut, mind krónikus), neurodegeneratív betegségeket és rosszindulatú daganatokat (lásd később). A fulmináns hepatitis mérsékelése [15], ischaemiareperfüzio utáni vesekárosodás [16], gyulladás [29] vagy bakteriális szepikus sokk [38] szintén gátolható siRNS-ekkel.

Az RNSi-t alkalmazó terápia segítségével eddig kezelt vírusos fertőzések magukban foglalják a következőket: hepatitis-C vírus [39] indukálta májbetegség, súlyos akut légzési szindróma (severe acute respiratory syndrome, SARS) [40], humánpapillomavírus-fertőzésre (HPV) visszavezethető tumorigenezis [45], vírusos influenza [41], HIV-1 [42] és szá-

mos további vírusfertőzés. Kimutatták, hogy az RNSi számos más intracelluláris patogén ellen is hatékony, például a *Mycobacterium* [43] és a *Trypanosoma* [44] ellen. Az RNSi helyi siRNS-injektálással alkalmazható a tumornövekedés lassítására [45], az áttétképződés, illetve a rák vascularizációjának gátlására is. Az RNSi-t mind *in vitro*, mind *in vivo* sikeresen alkalmazták rosszindulatú daganatok ellen. Az siRNS-eket és shRNS-eket alkalmazták az agy- [46], mell- [47] és petefészekdaganatok [48] állatmodelljeiben. Neurodegeneratív betegségek szintén lehetnek az RNSi gyógyászati célpontjai, mivel a mutáns gének csendesítése lassíthatja számos progresszív neurodegeneratív betegség kifejlődését, mint például az Alzheimer-kórt [49] vagy a Huntington-kórt [50].

Az RNSi-t alkalmazó terápia szerepe óriási mértékben nőtt. Jelenleg a legfontosabb kérdés az siRNS-eknek a terápiás hatás helyére való juttatása. Klinikai vizsgálatok várhatóak fertőző, örökletes, neurodegeneratív és rákos betegségek siRNS-ekkel történő kezelésére.

Támogatás

Kísérleteinket az NIH Research Grant #R03 TW07069 támogatásával végeztük, melyet a Fogarty International Center és a National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases közösen szponzorál. További támogatást az OTKA T049022, NF69278 (HP) pályázatok nyújtottak.

Irodalom

- [1] *Milhavet, O., Gary, D. S., Mattson, M. P.*: Pharmacol. Rev., RNA Interference in Biology and Medicine. 2003, 55, 629–648.
- [2] www.clinicaltrials.gov. ghv. nlm. nih. gov
- [3] *Devroe, E., Silver, P. A.*: Therapeutic potential of retroviral RNAi vectors. Expert Opin. Biol. Ther., 2004, 4, 319–327.
- [4] *Vaucheret H., Beclin C., Fegard M. J.*: Post-transcriptional gene silencing in plants. Cell Sci., 2001, 114, 3083–3091.
- [5] *Agrawal, N., Malhotra, P., Bhatnagar, R. K.*: siRNA-directed silencing of transgene expressed in cultured insect cells. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2004, 320, 428–434.
- [6] *Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R.*: Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. Plant Cell, 1990, 2, 279–289.
- [7] *Grishok, A., Mello, C. C.*: RNAi (nematodes: *Caenorhabditis elegans*). Adv. Genet., 2002, 46, 339–360.
- [8] *Hammond, S. M., Berstein, E., Beach, D. és mtsai*: An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature, 2000, 404, 293–296.
- [9] *Elbashir, S. M., Harboth, J., Lendeckel, W. és mtsai*: Duplexes of 21-nt RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. Nature, 2001, 411, 494–498.
- [10] *Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K. és mtsai*: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998, 391, 806–811.
- [11] *Kennerdell, J. R., Carthew, R. W.*: Use of ds-RNA mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell, 1998, 95, 1017–1026.
- [12] *Lohmann, J. U., Endl, I., Bosch, T. C.*: Silencing of developmental genes in *Hydra*. Dev. Biol., 1999, 214, 211–214.

- [13] *Wargelius, A., Ellingsen, S., Fjose, A.*: Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1999, 263, 156–161.
- [14] *Song, E., Lee, S. K., Wang, J. és mtsai*: RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nature Medicine*, 2003, 9, 347–351.
- [15] *Hamar, P., Song, E., Kókény, G. és mtsai*: Small interfering RNA targeting Fas protects mice from renal ischemia-reperfusion injury. *PNAS*, 2004, 101, 14883–14888.
- [16] *Gou, D., Narasaraaju, T., Reddy, N. és mtsai*: Gene silencing in alveolar type II cells using cell-specific promoter in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 134.
- [17] *Kumar, M., Carmichael, G. G.*: Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in higher eukaryotes. *MMBR*, 1998, 62, 1415–1434.
- [18] *Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. és mtsa*: RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 2000, 101, 25–33.
- [19] *McCaffrey, A. P., Meuse, L., Pham, T. T. és mtsai*: RNA interference in adult mice. *Nature*, 2002, 418, 38–39.
- [20] *Simeoni, F., Morris, M. C., Heutz, F.*: Insight into the mechanism of the peptide-based gene delivery system MPG: implications for delivery of siRNAs into mammalian cells. *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31, 2717–2724.
- [21] *Vorburger, S. A., Hunt, K. K.*: Adenoviral gene therapy. *The Oncologist*, 2002, 7, 46–59.
- [22] *Bessis, N., GarciaCozar, F. J. Boissier, M. C.*: Immune responses to gene therapy vectors: influence on vector function and effector mechanisms. *Gene Therapy*, 2004, 11, 10–17.
- [23] *Gao, G. P., Yang, Y., Wilson, J. M.*: Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J. Virol.*, 1996, 70, 8934–8943.
- [24] *Benrt, K., Liang, M., Ye, X. és mtsai*: A new type of adenovirus vector that utilizes homologous recombination to achieve tumor-specific replication. *J. Virol.*, 2002, 76, 10994–11002.
- [25] *Samulski, R. J., Zhu, X., Xiao, X. és mtsai*: Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *The EMBO Journal*, 1991, 17, 3941–3950.
- [26] *Hacein-Bey-Abina, S., Von Kalle, C., Schmidt, M. és mtsai*: LMO2-associated clonal Tcell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science*, 2003, 302, 400–419.
- [27] *Davidson, B. L., Paulson, H. L.*: Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol.*, 2004, 3, 145–149.
- [28] *Reich, S. J., Fosnot, J., Kuroki, A. és mtsai*: Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF efficiently inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *J. Molecular Vision*, 2003, 9, 210–216.
- [29] *Flynn, M. A., Casey, D. G., Todryk, S. M. és mtsa*: Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *J. Inflamm. (Lond.)*, 2004, 1, 4–16.
- [30] *Paddison, P. J., Caudy, A. A., Bernstein, E. és mtsai*: Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.*, 2002, 16, 948–958.
- [31] *Bonner, M. C., Weil, R., Dam, E. és mtsai*: PKR stimulates NF- κ B irrespective of its kinase function by interacting with the I κ B kinase complex. *Mol. Cell Biol.*, 2000, 20, 4532–4542.
- [32] *Kumar, M., Carmichael, G. G.*: Antisense RNA: function and fate of duplex RNA in higher eukaryotes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 1998, 62, 1415–1434.
- [33] *Sledz, C. A., Holko, M., Veer, M. J. és mtsai*: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.*, 2003, 5, 834–839.
- [34] *Fish, R. J., Kruihof, E. K. O.*: Short-term cytotoxic effects and long-term instability of RNAi delivered using lentiviral vectors. *BMC Mol. Biol.*, 2004, 5, 9–24.
- [35] *Scacheri, P. C., Rozenblatt-Rosen, O., Caplan, N. J. és mtsai*: Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *PNAS*, 2004, 101, 1892–1897.
- [36] *Walters, D. K., Jelinek, D. F.*: The Effectiveness of Double-Stranded Short Inhibitory RNAs (siRNAs) May Depend on the Method of Transfection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.*, 2002, 12, 411–418.
- [37] *Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelter, J. és mtsai*: Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology*, 2003, 21, 635–637.
- [38] *Reiley, W., Zhang, M., Wu, X. és mtsai*: Regulation of the Deubiquitinating Enzyme CYLD by I κ B Kinase Gamma-Dependent Phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, 2005, 25, 3886–3895.
- [39] *Kapaida, S. B., Brideau-Andersen, A., Chisari, F. V.*: Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 2014–2018.
- [40] *Wang, Z., Ren, L., Zhao, X. és mtsai*: Inhibition of Severe Acute Respiratory Syndrome Virus Replication by Small Interfering RNAs in Mammalian Cells. *J. Virol.*, 2004, 78, 7523–7527.
- [41] *Ge, Q., Filip, L., Bai, A. és mtsai*: Inhibition of influenza virus production in virus-infected mice by RNA interference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, 101, 8676–8681.
- [42] *Song, E., Lee, S. K., Dykxhoorn, D. M. és mtsai*: Sustained Small Interfering RNA-Mediated Human Immunodeficiency Virus Type 1 Inhibition in Primary Macrophages. *J. Virol.*, 2003, 77, 7174–7181.
- [43] *Vieira, O. V., Harrison, R. E., Scott, C. C. és mtsai*: Acquisition of Hrs, an Essential Component of Phagosomal Maturation, Is Impaired by Mycobacteria. *Mol. Cell Biol.*, 2004, 24, 4593–4604.
- [44] *Liang, X. H., Liu, Q., Michaeli, S.*: Small nucleolar RNA interference induced by antisense or double-stranded RNA in trypanosomatids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 7521–7526.
- [45] *Schiffelers, R. F., Ansari, A., Xu, J. és mtsai*: Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 149–159.
- [46] *Boado, R. J.*: RNA Interference and Nonviral Targeted Gene Therapy of Experimental Brain Cancer. *NeuroRX*, 2005, 2, 139–150.
- [47] *Onodera, Y., Hashimoto, S., Hashimoto, A. és mtsai*: Expression of AMAP1, an ArfGAP, provides novel targets to inhibit breast cancer invasive activities. *The EMBO Journal*, 2005, 24, 963–973.
- [48] *Menendez, J. A., Vellon, L., Mehmi, I. és mtsai*: Inhibition of fatty acid synthase (FAS) suppresses *HER2/neu (erbB-2)* oncogene overexpression in cancer cells. *PNAS USA*, 2004, 101, 10715–10720.
- [49] *Miller, V. M., Gouvion, C. M., Davidson, B. L. és mtsa*: Targeting Alzheimer's disease genes with RNA interference: an efficient strategy for silencing mutant alleles. *Nucleic Acids Res.*, 2004, 32, 661–668.
- [50] *Dou, F., Netzer, W. J., Tanemura, K. és mtsai*: Chaperones increase association of tau protein with microtubules. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 721–726.

(Hamar Péter dr.,
Budapest, Nagyvárad tér 4., 1089
e-mail: hampet@net.sote.hu)