

## Antisense tehnoloogia ja RNAi

**Antisense oligonukleotiidid on lühikesed, sünteetilised üheaheelised DNA oligomeerid või nende derivaadid, mis on disainitud seonduma tugevalt ja spetsiifiliselt komplementaarsete mRNA järjestustega märklaudkoe rakkudes tagades vastava geeni ekspressiooni inhibeerimise või peatamise.** Vastavalt ülesannetele peavad *antisense* oligomeerid omama küllalt pikka eluiga vereplasmas ja raku tsütoplasmas, olema vastupidavad ekso- ja endonukleasaasidele, mitte seonduma teiste valkudega ning mitte omama toksilisi efekte.

Esimesena kasutati *antisense* ühenditena üheaheelalisi DNA järjestusi (JOONIS). Antud oligomeerid sisenesid raku endotsütoosi abil, kuid nende kasutamine on piiratud tingituna lühikesest elueast plasmas ja rakus, sest nad hüdrolüüsitakse väga kiiresti nukleasaaside poolt. Järgmisse gruppi, I generatsiooni *antisense* molekulide hulka, kuuluvad **fosforotioaadid ja metüülfosfonaadid** (JOONIS). Nendes ühendites on fosfaatgrupi üks hapniku aatom asendatud vastavalt kas väävli või metüülrühmaga, mis tõstab stabiilsust nukleasaaside suhtes. Antud ühendid on vees hästi lahustuvad, sisenevad raku endotsütootilise mehhanismi abil ja omavad kõrget afiinsust mRNA vastavate järjestuste suhtes. Spetsiifilisuse tagamiseks peaksid nad sisaldama 17-25 nukleotiidi jääki. Kõik praeguseks ajaks ravitstarbel kasutatavad (**Vitravene™** (Fomivirsen, ISIS 2922)) või kliinilistesse katsetustesse jõudnud *antisense* oligomeerid on fosforotioaadid.

### Antisense tehnoloogia toimemehhanism

Enamus *antisense* oligomeere aktiveerivad peale mRNA märklaudjärjestusega seondumist **ribonukleas RNAasH-i**, mis tunneb spetsiifiliselt ära RNA-DNA kompleksi ja hüdrolüüsib heterokaksikahelas oleva RNA ahela, mille tulemusel translatsioon peatub. On pakutud, et selline mehhanism prevaleerib enamuse *antisense* molekulide korral. Kuid mitte kõik *antisense* oligomeerid, nagu näiteks metüülfosfonaadid ja peptiid nukleinhapped, ei aktiveeri RNAasH-d peale seondumist mRNA molekuliga. Teiseks mehhanismiks on **translatsiooni blokeerimine**, mille puhul *antisense* oligonukleotiid takistab ribosoomi seondumist ja edasi liikumist piki mRNA ahelat. Tavaliselt disainitakse *antisense* oligonukleotiid nii, et ta oleks komplementaarne translatsiooni start koodonit ümbritseva järjestusega.

Kuidas saavad *antisense* oligonukleotiidid raku? See ei ole päris täpselt teada. Aktiivse endotsütoosi (JOONIS) tulemusel satuvad oligonukleotiidid endosoomi ja mitte tsütoplasmasse. Endosoomis on oligonukleotiidid mRNA-dest eraldatud raku-

membraanile sarnase membraaniga. Tavaliselt lõhutakse nad nukleasaaside poolt ära ja väljutatakse eskotsütoosil. Nukleasaasi resistentsed kimäärsed metüülfosfonaat / fosfodiester oligonukleotiidid (samuti ka fosfodiester ja fosforotioaat struktuurid) võetakse eelistatult raku retseptor-vahendatud endotsütoosi ja vedelikfaasi pinotsütoosi poolt. Kui lisada oligonukleotiididele lipofiilseid rühmi (nagu kolesterool) siis võib toimuda ka adsorptsioon.

Tegelikult ei ole eriti veenvalt näidatud passiivse difusiooni toimumine oligonukleotiididega, millel on päris oluline laeng. Samuti ei tohiks füsioloogiliselt terve raku endosoom oluliselt lekkida.

Kuidas siis?

Erinevate gruppide poolt on katsetatud mitmeid strateegiaid, et parandada ebaefektiivseid "looduslikke" mehhanisme. Kõige enam levinud tehnika on tekitada oligonukleotiidide kompleks kationsete lipiididega. Kasutatakse ka muid mehhanisme näit. bakteriaalset toksiini streptolüsiin O ning samuti elektroporatsiooni.

### Geeniekspressiooni kontroll RNA-ga

Antisense RNA on komplementaarne mRNA-ga. Kui samas rakus esinevad komplementaarset sense ja antisense RNA molekulid, siis võib see viia stabiilsete duplekside moodustumisele, mis hakkavad segama geenide ekspressiooni transkriptsiooni tasemel, RNA protsessingut või ka translatsiooni. Antisense RNA vahendatud mehhanisme kasutatakse geeniekspressiooni regulatsiooni mehhanismina looduses nii arvukatel prokariootidel kui ka väiksemas ulatuses eukariootidel.

Teatud geenide inhibitsiooni võib saavutada nii antisense RNA või antisense oligonukleotiidide otsesel sisestamisel rakkudesse. Samuti on võimalik sisestada rakkudesse antisense transgeen (transgeen on promotori suhtes pööratud) ja saavutada antisense RNA stabiilne süntees ning pikaajaline geeni ekspressiooni inhibitsioon.

Kui asetada antisense konstruktid indutseeritava promotori kontrolli alla, siis on võimalik saavutada ka konditsionaalset geeni vaigistamist.

Antisense tehnoloogiate puhul on võimalik kasutada erinevaid meetodeid:

**Ribosüümid** on katalüütilised RNA molekulid, mis on võimelised läbi viima RNA substradi kohtspetsiifilist lõikamist ning mõningatel juhtudel ka ligeerimist. Kui sisestada antisense RNA-sse ribosüümi katalüütiline tsester võimaldab see suunata ribosüümi teatud kindlate mRNA molekulide suhtes, mis seejärel lõigatakse katki ja

degradeeritakse. Ribosüümide peamine eelis tavalise antisense RNA ees seisneb selles, et ribosüümide funktsionaalne aktiivsus taastub peale mRNA lõikamist ning on seetõttu nad võimelised inaktiveerima palju mRNA molekule samal ajal kui tavaline antisense inhibitsioon põhineb sense ja antisense RNA molekulide stöhhiomeetrilisel seondumisel.

**Thomas R. Cech ja Sidney Altman said 1989. aastal Nobeli keemia preemia RNA katalüütilise toime avastamise eest.**

Ribosüüme on kasutatud geeniekspressiooni inhibeerimiseks eukarüootidest kõigepealt *Drosophila*-l. Samuti on ribosüüme kasutatud imetaja rakuliinides eelkõige onkogeenide uurimisel ning viirusresistentsuse saavutamiseks. Palju on uuritud HIV-i ribosüüm vahendatud inhibitsiooni ning on saavutatud ka edu retroviirusvektorite kasutamisel, eriti vektorite puhul, mis sisaldavad mitmeid ribosüüme.

Kuna ribosüümid on RNA konstruktid ja seetõttu üsna heaks märklauaks nukleaasidele, siis näiteks geeniteraapia seisukohalt on vaja valmistada ja sisestada terve transgeenne konstrukti, millelt ribosüüme hakatakse valmistama.

**Kosuppressioon** iseloomustab sense transgeeni võimet supresseerida homoloogilisi endogeenseid gene. Sellist üllatavat fenomeni näidati esmakordselt transgeensetel taimedel, kui sooviti suurendada endogeense valgu (õiepigment petuuniat) kogust sisestades taime genoomi antud geeni ekstra koopiad. Arvati, et täiendavate koopiate sisestamine tõstab endogeense ensüümi hulka, mille tulemusel tekiks rohkem pigmenti. Üllatusega täheldati, et umbes 50% taimedel saavutati hoopis vastupidine efekt, st. õied olid hoopis valged või õrnalt värvunud. Seega viib transgeeni täiendavate koopiate integratsioon mõne või isegi kõigi transgeenide supressioonile ning ka homoloogiliste endogeensete geenide kosupressioonile. Kosupressiooni on näidatud ka loomadel ja seentel.

Kosupressiooni mehhanism on kompleksne, st. geeni vaigistamine võib toimuda nii transkriptsioonilisel kui ka posttranskriptsioonilisel tasemel.

Mis seda põhjustab? Kuigi transgeeni poolt indutseeritud geeni vaigistamine paistab mõnedel taimedel olevat seotud geeni spetsiifilise metülatsiooniga (transkriptsiooniline geeni-vaigistamine (TGS)), siis osa sellest protsessist toimub post transkriptsioonilisel tasemel. Erinevates uuringute käigus näidati, et homoloogisi transkripte küll tehakse, kuid need degradeeritakse kiiresti tsütoplasmas ja ei kogune.

**Posttranskriptsiooniline geeni vaigistamine (PTGS)**, mille kohta esialgu arvati, et on tegemist veidra ja segava fenomeniga, mille esinemine on piiratud vaid petuuniate ja mõne teise taimeliigiga

on käesolevaks ajaks muutunud molekulaarbioloogia üheks kuumimaks teemaks. Viimastel aastatel on selgunud, et PTGS toimub nii taimedel kui ka loomadel ning tema funktsiooniks on ilmselt kaitse viiruste vastu ja transposoonide vaigistamine.

## RNA interferents

Esimesed tõendid selle kohta, et dsRNA võib põhjustada geeni vaigistamist saadi nematood *C. elegans*'i uuringutel. Avastati, (Guo & Kempheus, 1995, *Cell* **81**:611-620), et antisense RNA kasutamisel geeniekspressiooni allasurumiseks vähendas antisense RNA sisestamine loomulikult sihtmärkgeeni ekspressiooni, kuid sedasama tegi ka kontrollina kasutatud sense RNA. Algselt jäi see fenomen selgitamata, kuid alles 1998 avastati (Fire et al., 1998, *Nature*, **391**:806-811), et süstides *C. elegans*'i nii sense kui antisense RNA segu, saadi tulemuseks tunduvalt efektiivsem geenivaigistamine kui eraldi sense või antisense RNA kasutamisel. Tegelikult oli vaja vaid mõne dsRNA molekuli sisestamist rakku, et täielikult vaigistada homoloogilise geeni ekspressioon. Seega on vastav efekt nagu ribosüümide puhul katalüütiline ja mitte stöhhiomeetriline. Lisaks sellele kutsus dsRNA süstimine nematoodi soolde esile geeni vaigistamine kogu ussil ja isegi ussi järglaste esimesel põlvkonnal. Avastati ka, et kui nematoodidele sööta baktereid, kelles oli ekspresseeritud nematoodi mingile geenile spetsiifiline dsRNA saadi sama efekt ja isegi usside leotamine dsRNA lahuses indutseeris geeni vaigistamise. Need strateegiad tegid võimalikuks suure arvu *C. elegans*-i knock-out mutantide saamise erinevate geenide funktsiooni uurimiseks. Samuti töötati välja strateegiad RNAi kasutamiseks *Drosophila*'s. Seal küll söötmine spetsiaalse dsRNA-d ekspresseeriva pärimüvega ei õnnestunud, kuid mikroinjektsioonil saadi siiski efekt.

**2006.a. said Andrew Z. Fire ja Craig C. Mello RNAi avastamise eest Nobeli meditsiinipreemia.**

## Kuidas RNAi töötab?

RNAi töötab kaheetapiliselt:

**Initsiatsiooni etapis** lõigatakse kas otse või transgeeni koosseisus rakkudesse viidud dsRNA lühikesteks 21-23 nukleotiidi pikkusteks **small interfering** ehk **siRNA**-deks. siRNA-sid toodetakse **Dicer** ensüümi poolt, mis kuulub dsRNA spetsiifiliste ribonukleaaside RNAasIII perekonda ja on ATP sõltuv ensüüm. Lõikamise tulemusel saadakse 19-21 bp pikkused dupleksid ehk siRNAd, millest igaühel on kahenuklotiidiline 3' üleulatav ots.

**Teises etapis** seonduvad siRNA dupleksid raku tsütoplasmas inaktiivsele nukleaasi kompleksile, mis seejärel aktiveerub ning moodustub nn. **RNA indutseeritud vaigistus kompleks** (RNA induced silencing complex (**RISC**)). See on RNAi põhiline

efektorkompleks. RISC kompleksid on erineva suurusega – väiksemad 100-160 kDa, suurimad kuni 500 kDa. Peale kaksikahelalise RNA sidumist eraldatakse RISC kompleksis siRNA ahelad üksteisest. Järgmises etapis seondub RISC kompleks siRNA komplementaarse mRNAga. Viimases etapis antud märklaud mRNA lagundatakse tänu RISC kompleksi nukleaasale aktiivsusele. Tekkivad mRNA lõigud hävitatakse ning valgusüntees peatub. Antud protsess on tänu siRNA spetsiifilisele järjestusest sõltuvalle paardumisele mRNAga spetsiifiline.

RNAi nähtus on levinud paljudes organismides nagu taimed, pärmid, ussid, putukad ja imetajad. Pikka kaheaheelalist RNAd ei saa aga kasutada imetajarakkudes, kuna see põhjustab rakus viiruse vastaseid reaktsioone, mis tunnevad ära dsRNA ja viivad raku surmani.

Seejärel avastati, et sünteetilisi lühikesi 21-25 nukleotiidi pikkusi dsRNA ahelaid, nn. **siRNA**-sid kasutades on võimalik lagundada rakus siRNAle homoloogse järjestusega mRNAd kahjustamata sellega raku elutegevust. Sünteetilised siRNAd on struktuurselt sarnased looduslikult tekkivate analoogidega – ka neil on dsRNA mõlema ahela 3' otsa kaks nukleotiidi paardumata. siRNAde kasutamine on tänapäeval üks populaarsemaid geenimanipulatsiooni tehnikaid. On loodud suured siRNAde kogud, mida saavad kasutada kõik teadlased. Samuti on RNAi tehnoloogia jõudnud ka meditsiini. Mitmed farmaatsiakompaniid on alustanud kliinilisi katsetusi kasutamaks siRNAsid haiguste raviks.

### Miks RNAi?

RNA interferentsi on leitud erinevatel organismidel nagu näiteks taimed, seened ja loomad: *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* ning isegi hiirtel ja sebrakalal (vöödilise pisidaanio). Sellisel universaalsel rakulisel vastel peaks olema oluline funktsioon. Kuid mis see on?

#### Mõned võimalused:

1. Mõningatel taime ja loomaviirustel on kaheaheelalise (ds)RNA genoomid. Lisaks sellele esineb taime ja loomaviirusi, mille RNA genoom konverteeritakse peremeesrakus lühiajaliselt dsRNA-ks. Seega võib RNAi olla vahend nende viiruste infektsiooni vastu hävitades nende mRNA ja blokeerides seega oluliste viirusvalkude sünteesi.
2. Transposoonid ("junk" DNA) Neid võib transkribeerida RNA molekulideks, millest mõned regioonid on kaheaheelalised. RNAi võib need hävitada.
3. RNA interferents võib olla mingi praegu meile tundmatu geeniekspressiooni kontrolliv protsess või selle osa.

### RNAi tööriistana?

RNAi avastamine on lisanud molekulaarbioloogide arsenalile uue ja väga perspektiivse tööriista, mille abil on saanud võimalikuks teha väga erinevate geenide knock-out eksperimente.

**Vt:** Sönnichsen *et al.*, 2005 Full-genome RNAi profiling of early embryogenesis in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005 Mar 24;434(7032):462-9.

Antud eksperimendis süstiti 20,326 *C.elegans*'i geenile vastavad dsRNA-d (98% kõigist!!!) ja vaadeldi iga konstrukti efekti antud organismi embrüonaalsele arengule meiosis lõpust alates (peale viljastamist) läbi teise mitootilise jagunemise kuni 4 rakulise embrüoni. Leiti vähemalt 661 geeni, mis muudavad selle perioodi jooksul mõnd protsessi. Umbes pooled neist osalesid raku jagunemisel ja pooled raku üldises metabolismis. Veel ca 1000 geeni andsid fenotüüpilise efekti, mis ilmnis hilisema arengu käigus.

Kuna RNAi-d saab kasutada erinevates kudedes valitud ajahetkel, annab see rea eeliseid tavalise knockout eksperimendi ees, kus mittetöötav geen tekitatakse juba iduliinis ning see võib tappa embrüo enne kui seda saab uurida.

Võib sisse viia ka vektori, millelt pidevalt sünteesitakse meid huvitava geeni vastast siRNA-d. Brummelkamp *et al.* (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* Apr 19; 296(5567):550-3

RNAi-d on perspektiivne võitluses viirusinfektsioonide vastu. Juba 2002 aastal ilmus kaks tööd, milles näidati et inimese koekultuuri rakke on võimalik kaitsta polioviruse ja HIV-1 vastu siRNA-dega, mis on komplementaarsed antud viiruste poolt kodeeritud RNA-dega.

**VT.** Hea ülevaade van Rij & Andino (2006) The silent treatment: RNAi as a defense against virus infection in mammals. *Trends in Biotech* vol:24, No4 pp186-193

### RNAi inimeste teraapias

Kuna RNAi puhul on sihtmärk väga spetsiifiline, siis on RNAi kasutamine üksikute geenide ekspressiooni välja lülitamiseks väga kuum teema. Sellel baasil loodetakse luua uus klass ravimeid. Nukleiinhappe põhistest **antiviiruslikest ainetest** on terve rida juba leidnud tee kliiniliste katsetuste staadiumi. **VT:** Haasnoot *etal.*, (2007) RNA interference against viruses: strike and counterstrike. *Nat Biotech* vol:25, No 12 pp1435-1443.

Samuti on erinevad firmad katsetamas antisense teraapia võimalusi muude haiguste vastu. **VT:** (2007) Antisense – down, but not out. *Nat Biotech* vol: 25 No 5 pp. 497-499

Näiteks on uuritud protoonkogeeni BCL-2-ga komplementaarset antisense RNA-d, eesmärgiga

rakendada seda teatud B-rakuliste lümfoomide ja leukeemiate korral.

Hiirtele näiteks on intravenoosselt süstitud apolipoproteiin B mRNA-le spetsiifilist siRNA-d, mille tulemusel langes apolipoproteiin B mRNA ja vastava valgu hulk ning alanes kolesterooli tase. Vastavad ravimid on käesoleval ajal samuti kliiniliste katsetuste erinevates staadiumides.

## Mikro RNA-d

Mikro RNA-d (miRNA-d) avastati 1993.a. Victor Ambros-e laboris *C. elegans*'i uuringutel. Need on endogeensed üheaheelalised 19-21 nukleotiidi pikkused RNA molekulid. 2001.a. avastati, et erinevate organismide (taimed, loomad) genoomid kodeerivad suurt hulka reguleerivaid funktsiooniga väikeseid RNA molekule, mida hakati nimetama miRNA-deks. Samuti näidati, et Dicer ensüüm protsessib miRNA-sid ning mõlemad inkorporeeritakse RNA-induced silencing complex (**RISC-i**).

2003.a näidati, et miRNA-d valmivad tuumas ning samal aastal kasutati esimest korda miRNA-de *in vivo* vaigistamist kunstlikult disainitud ja keemiliselt valmistatud oligonukleotiidide abil, mida nim. **antagomir**-ideks.

Käesolevaks ajaks on teada, et miRNA-d reguleerivad rohkem kui 30% imetajate geenidest. Samuti eeldatakse, et inimesed ekspresseerivad tuhandeid miRNA-sid, millest praeguseks on kirjeldatud ca 500. Need miRNA-d inhibeerivad ja pärsivad sellega tuhandete mRNA-de translatsiooni.

Seega on miRNA-de avastamine andnud uurijatele võimaluse kasutada „looduslikku“ posttranskriptsioonilist interferentsi, mis on väga suure tähtsusega meditsiini jaoks.

**Erinevalt paremini tuntud RNAi-st, mis kasutab kaheaheelalisi lühikesi RNA molekule (siRNA-d) mis vaigistavad ühe geeni, siis üks miRNA molekul võib olla suunatud 250-500 erineva mRNA molekuli vastu,** avades sellega ravimiarenduses täiesti uued perspektiivid. **VT:** Mack (2007) MicroRNA gets down to business. *Nat Biotech* vol:25 No 6. pp.631-638.

Üheks miRNA teraapia võimalikuks rakendusvaldkonnaks on vähiteraapia. Siin üritatakse rakendada miRNA inhibiitoreid (antagomir-e) miRNA-de taseme normaliseerimisel. Spetsiifiliste miRNA-de inhibeerimisel on tõenäoliselt võimalik tõsta mõnede tuumor supressor geenide mRNA-de ekspressioonitaset. Oluline on siin see, et ühe miRNA abil võib reguleerida sadu mRNA molekule.