Akceptuję
W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej Polityce Prywatności

Znaczenie microRNA w terapii genowej

Wstęp:

Terapia genowa definiowana jako dostarczanie do komórek kwasów nukleinowych o własnościach leczniczych wydaje się jednym z najbardziej obiecujących aspektów medycyny molekularnej. Rewolucja w rozumieniu roli cząsteczek RNA w biologii komórki zainicjowana odkryciem zjawiska interferencji RNA (RNAi) w badaniach na nicieniu Caenorhabditis elegans (1) zwróciła uwagę na potencjalne kliniczne zastosowania tych molekuł (2,3).



Większość z dotychczasowych projektów skupiona była na zastosowaniu krótkich dwuniciowych cząsteczek RNA biorących udział w szlaku RNAi nazywanych siRNA (short interfering RNA), powodujących wyciszanie ekspresji pojedynczych genów przez degradację transkryptów o regionach ściśle komplementarnych do sekwencji siRNA (4).

Zupełnie nowe możliwości wydaje się oferować druga klasa małych niekodujących cząsteczek RNA nazwanych miRNA, będących endogennymi regulatorami ekspresji wielu genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Od czasu odkrycia genu lin-4 w C. elegans w 1993 roku kodującego pierwsze poznane miRNA opisano niemal 10 000 miRNA (5) oraz oszacowano, iż nawet do 30% ludzkich genów może podlegać regulacji przez te krótkie cząsteczki RNA (6). Rosnąca liczba doniesień wskazuje na ich istotne znaczenie dla procesów regulacji rozwoju i różnicowania, kontroli podziałów komórkowych oraz apoptozy (7), a także w patologii wielu schorzeń (8). Poniżej opisany zostanie mechanizm działania miRNA, ich znaczenie w rozwoju procesów chorobowych oraz możliwości ich wykorzystania dla potrzeb terapii genowej.

Biogeneza miRNA (Rys. 1):

Dojrzałe miRNA są jednoniciowymi cząsteczkami niekodującego RNA o długości ok. 22 nukleotydów. Geny dla miRNA ulegają transkrypcji za pośrednictwem cząsteczek polimeraz RNA II lub III, tworząc w jądrze długie nici pri-miRNA, do kilku tysięcy nukleotydów, które modyfikowane są przez dodanie czapeczki na końcu 5’ (MGpppG) oraz poliadenylację na końcu 3’. pri-miRNA są w jądrze przekształcane przez kompleks enzymatyczny Drosha (o aktywności RNazy III) oraz białka wiążącego dwuniciowe RNA Pasha (u człowieka DGCR8) do pre-miRNA o długości ok. 70 nukleotydów, które posiadają wewnątrzcząsteczkowe regiony komplementarności powodujące fałdowanie w struktury przypominające spinkę do włosów.
Molekuły pre-miRNA są transportowane do cytoplazmy dzięki aktywności transportera eksportyny 5 współdziałającego z białkiem Ran wiążącym GTP. Następnie kolejny enzym o aktywności RNazy III o nazwie Dicer tnie pre-miRNA do postaci dwuniciowych rybonukleotydów o długości 18-24 reszt. Te krótkie cząsteczki ulegają załadunkowi do związanego z miRNA kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex) zawierającego m. in. białka z rodziny Argonautów. Jedna z nici dupleksu, nazywana nicią wiodącą (guide strand), podlega preferencyjnej inkorporacji do kompleksu, natomiast druga nazywana nicią pasażerską (passenger strand) jest degradowana. Dojrzałe miRNA w postaci nici wiodącej zasocjowanej z towarzyszącym wielobiałkowym kompleksem wiąże się do docelowych transkryptów posiadających komplementarne sekwencje zwykle w rejonie 3’ UTR. Efekt wiązania prawdopodobnie zależy od stopnia komplementarności mRNA do dojrzałego miRNA, całkowita lub niemal całkowita komplementarność skutkuje cięciem prowadzącym do degradacji transkryptu, w przypadku niepełnej komplementarności dochodzi do represji translacji (9).

Szlak biogenezy miRNA. Geny miRNA są przepisywane z kodujących je sekwencji w genomie najczęściej przez polimerazę RNA II a powstałe transkrypty pri-miRNA podlegają modyfikacjom końca 5’ (czapeczka) i 3’ (ogon poliadenylowy). Ulegają one obróbce przez białka Drosha i Pasha polegającej na wycięciu rejonu o strukturze spinki do włosów, dzięki czemu powstają cząsteczki pre-miRNA o długości około 70 nukleotydów. pre-miRNA są eksportowane z jądra przez transporter jądrowy eksportynę 5 mechanizmem zależnym od białka Ran związanego z GTP. W cytoplazmie pre-miRNA ulega cięciu przez enzym Dicer do dwuniciowych cząsteczek o długości ok. 22 nukleotydów. Termodynamicznie mniej stabilna z nici ulega inkorporacji do kompleksu RISC (RNA-induced silencig complex). Wysoki stopień komplementarności transkryptu do związanej z RISC nici mi-RNA skutkuje degradacją transkryptu, natomiast częściowa komplementarność powoduje zahamowanie translacji (9).

Różnice pomiędzy miRNA a siRNA:

Drugą wspomnianą już klasą krótkich niekodujących RNA biorących udział w regulacji ekspresji genów są siRNA różniące się od miRNA głównie pochodzeniem. siRNA powstają przede wszystkim w wyniku cięcia długich dwuniciowych łańcuchów RNA lub długich rejonów o strukturze typu spinki do włosów, przeważnie egzogennego pochodzenia np. genomów wirusowych, transpozonów. Przeciwnie, miRNA są pochodzenia endogennego, kodowane przez sekwencje prekursorów w genomie i wydają się stanowić istotniejszy mechanizm regulacyjny w warunkach fizjologicznych (10).

Metody badania miRNA:

Wszystkie odkryte sekwencje miRNA są umieszczane w powszechnie dostępnej internetowej bazie danych o nazwie „miRBase” (5), obecna 13. edycja bazy zawiera informacje o 9539 sekwencjach (11).
Metody bioinformatyczne. Identyfikacja sekwencji kodujących miRNA w genomie oraz przewidywanie regulowanych przezeń genów docelowych możliwe są za pomocą narzędzi bioinformatycznych. Wykorzystują one zwykle trzy cechy miRNA: 1) pochodzenie z prekursorowych transkryptów o dł. 70-100 nukleotydów o strukturze spinek do włosów, 2) wysoki stopień konserwacji sekwencji pomiędzy spokrewnionymi ewolucyjnie gatunkami oraz 3) charakterystyczny wzór ewolucyjnej dywergencji (12). Jeszcze ważniejszym zastosowaniem metod komputerowych jest przewidywanie celów dla konkretnych miRNA. Typowymi kryteriami używanymi przez te aplikacje są: stopień komplementarności zasad ze szczególnym uwzględnieniem wykrywania całkowitej lub bliskiej całkowitej komplementarności w tzw. „seed region”, którym to terminem określa się nukleotydy 2-8 od 5’ końca miRNA, stabilność termodynamiczna przewidywanego kompleksu mRNA/miRNA, a także poziom konserwacji ewolucyjnej miejsc wiązania miRNA w rejonie 3’ UTR genu w różnych gatunkach (12).

Badanie ekspresji miRNA. Podstawową techniką stosowaną do określania poziomu ekspresji różnych cząsteczek miRNA w różnych typach próbek jest analiza mikromacierzy zawierających związane do stałego podłoża (zwykle na szklanej płytce) komplementarne oligonukleotydy zoptymalizowane do efektywnej i specyficznej hybrydyzacji z badanymi miRNA, możliwe jest także zastosowanie hybrydyzacji w roztworze z wyłapującymi polistyrenowymi ziarnami pokrytymi związanymi oligonukleotydowymi sondami komplementarnymi do analizowanych miRNA z następczą analizą powstałych hybryd przy pomocy wielokolorowego cytometru przepływowego. Rozpoznany kolor

pozwala na określenie rodzaju miRNA, natomiast gęstość sygnału odpowiada stężeniu miRNA. Uzyskane wyniki analiz mikromacierzy potwierdza się wykonując już komercyjnie dostępne testy ilościowej łańcuchowej reakcji polimerazy poprzedzonej odwrotną transkrypcją (qRT-PCR), testy te umożliwiają również określanie poziomu pri-miRNA oraz pre-miRNA (13).

Najstarszą i wciąż stosowaną techniką jest analiza Northern Blot, obecnie wykonywana głównie w celu uzupełnienia i potwierdzenia rezultatów technik wysokiej przepustowości jak mikromacierze i qRT-PCR (14). Weryfikacja regulowanych genów badana jest przez kotransfekcję konstruktami miRNA oraz mRNA z genem reporterowym np. lucyferazy i przewidywaną sekwencją wiązania miRNA w rejonie 3’ UTR. Hybrydyzacja in situ przy użyciu specjalnych oligonukleotydowych sond o wysokim powinowactwie pozwala analizować wzory ekspresji miRNA na utrwalonych formaliną skrawkach oraz zatopionych w parafinie fragmentach tkanek (13).

Analiza funkcji miRNA. W przypadku nicieni oraz muszki owocowej dostępne są knockout’y specyficznych genów dla poszczególnych rodzin miRNA i możliwe jest wnioskowanie o ich funkcjach na podstawie zmienionych fenotypów. Zmodyfikowane antysensowne oligonukleotydy (ASOs) dla inhibicji funkcji specyficznych miRNA wydają się być skutecznym podejściem w pracy z liniami komórkowymi. W przypadku badań in vivo wykazano efektywność modyfikowanych antysensownych RNA („antagomirów”, (15)). W przypadku ssaków uzyskano do tej pory myszy z knockout’em enzymu Dicer (16) oraz opublikowano pierwsze doniesienia o delecji genów specyficznych miRNA w modelu mysim (13). Dużym utrudnieniem dla badania roli konkretnych cząsteczek miRNA jest regulowanie przez pojedyncze miRNA wielu docelowych genów oraz wpływ wielu miRNA na poziom ekspresji pojedynczego genu. Ta, jak się wydaje, skomplikowana sieć interakcji dopiero zaczyna być rozwikływana.

Rola miRNA:

Odkrycie miRNA związane było z badaniami procesu rozwoju i różnicowania, późniejsze badania ujawniły ich znaczenie w wielu procesach zarówno fizjologicznych, jak i chorobowych. Przypuszcza się, iż miRNA hamują ekspresję genów, które powinny być wyciszone w danym typie tkanki. mRNA genów o wysokiej ekspresji, charakterystycznych dla danej tkanki bądź typu komórek, zwykle pozbawione są miejsc wiążących dla seed sequence takich regulatorowych miRNA. W ten sposób miRNA przyczyniają się do zapewnienia tkankowo specyficznego wzoru ekspresji genów (7).

Choroby nowotworowe. Badania wzorów i poziomu ekspresji miRNA w komórkach ludzkich nowotworów wykazały specyficzne zmiany sugerujące, iż jedną z oznak postępujących zmian neoplastycznych jest deregulacja komórkowych miRNA powiązana z towarzyszącymi zmianami genetycznymi i epigenetycznymi takimi jak delecje, amplifikacje, mutacje punktowe oraz zmiany wzoru i poziomu metylacji DNA. miRNA mogą pełnić zarówno funkcje genów supresorowych, jak i onkogenów, a miRNA o roli w procesie transformacji nowotworowej określane są jako oncomiRs. Mogą one występować w rejonach niestabilnych genetycznie i często ulegających delecjom w komórkach rakowych, jak ma to miejsce w przypadku pierwszego bezpośredniego powiązania między konkretnymi miRNA a fenotypem komórek rakowych, którego dokonał zespół Calina i wsp. dla miR-15 i miR-16 (17). Lokują się one w regionie 13q14, którego delecja występuje w ponad połowie przypadków przewlekłej białaczki limfatycznej (CLL – chronic lymphocytic leukemia). Poziomy ekspresji miR-15 i miR-16 pozostają w odwrotnej korelacji do poziomu Bcl-2 w CLL i wykazano, iż regulują one ekspresję genu dla tego białka na poziomie posttranskrypcyjnym. Represja Bcl-2 przez miRNAs w liniach komórek białaczkowych prowadzi do indukcji apoptozy, z tego względu te dwa miRNA wydają się dobrymi kandydatami dla terapii genowej nowotworów wykazujących nadekspresję genu Bcl-2. (18).

Klaster miR-17-92 ma natomiast znaczenie dla rozwoju chłoniaków złośliwych oraz raków płuc i funkcjonuje jako onkogen. W komórkach tych locus dla sześciu miRNA z tej grupy na chromosomie 13 ulega często amplifikacji powodując ich podwyższoną ekspresję. Rola tych cząsteczek polega najprawdopodobniej na wspomaganiu proliferacji komórek poprzez przestawienie równowagi w ekspresji czynników transkrypcyjnych z rodziny E2F w stronę sprzyjającego podziałom E2F3, ze zmniejszeniem poziomu pro-apoptotycznego E2F1 (18, 19).

Rodzina miRNA let-7 wykazuje charakter supresorowy. Cząsteczkom tym przypisuje się regulację ekspresji protoonkogenu białka RAS, które jest związaną z błoną cząsteczką sygnałową regulującą wzrost i różnicowanie komórek. Mutacje wspomnianego onkogenu są obecne w 15-30% wszystkich ludzkich nowotworów. Utrata miejsc wiążących dla tej rodziny miRNA jest mechanizmem utraty represji onkogenu Hmga2 (high mobility group A2) (20).

Sekwencje dla miRNA mogą pozostawać pod kontrolą genów supresorowych, jak przypadku miR-34, bezpośrednio aktywowanego przez czynnik transkrypcyjny p53 po uszkodzeniu genomu.

Całościowe zmiany w ekspresji miRNA również mogą mieć znaczenie w procesie nowotworzenia. Badanie profilu ekspresji miRNA w 334 ludzkich rakach, liniach komórek rakowych i próbkach zdrowych tkanek wykazały, iż całościowy spadek poziomu wielu miRNA jest jedną z cech komórek rakowych (13). Fakt, iż najniższą ekspresję wykazywały komórki najsłabiej zróżnicowanych guzów, wskazuje na znaczenie małych RNA w procesie różnicowania i hamowania proliferacji. Kumar i współpracownicy wykazał, iż globalny spadek poziomu miRNA, który może być wynikiem mutacji enzymów niezbędnych dla dojrzewania tych cząsteczek jak Drosha i Dicer, w komórce promuje transformację nowotworową (21). Duże znaczenie miRNA w chorobach nowotworowych predysponuje je jako cel terapeutyczny oraz narzędzie diagnostyczne i prognostyczne (13,12).

Układ krwionośny. Niedawne badania wykazały wysoki poziom ekspresji miRNA w komórkach układu krwionośnego - kardiomiocytach, komórkach śródbłonka oraz mięśni gładkich naczyń. Duże zainteresowanie nimi wynika z rosnącej liczby dowodów na istotne funkcje regulacyjne w procesach rozwoju, różnicowania, proliferacji i apoptozy komórek układu naczyniowego oraz modulacji angiogenezy (22).

W 2005 roku opisano rolę miR-1 w różnicowaniu kardiomiocytów. Gen dla tego miRNA pozostaje pod bezpośrednią kontrolą regulatorów różnicowania w komórkach mięśniowych m. in. SRF-ów (serum response factors), MyoD (myogenic differentiation factor D) i Mef2 (myocyte-enhancing factor 2) i jego ekspresja jest istotna dla prawidłowego rozwoju serca (23).

W komórkach mięśni gładkich naczyń, wykazano natomiast pro-proliferacyjne i anty-apoptotyczne własności miR-21. Jako prawdopodobne cele regulacyjne dla tego miRNA rozpoznano transkrypty fosfatazy PTEN oraz Bcl-2 (10). Może to mieć kliniczne znaczenie w przypadku podziałów komórek mieśni gładkich prowadzących do tworzenia warstwy neointimy w ścianach naczyń po angioplastyce, co może prowadzić do restenozy (14).

Cząsteczki miRNA, jak już wyżej wspomniano, mają również znaczenie dla procesu angiogenezy. Komórki ludzkiej linii śródbłonka żyły pępowinowej HUVEC (human umblilical vein endothelial cells) są cennym modelem angiogenezy in vitro ze względu na zdolność tworzenia przypominających kapilary struktur w odpowiedzi na czynniki stymulujące. Wzór ekspresji miRNA w tych komórkach został niedawno scharakteryzowany. Opisano 15 miRNA o wysokiej ekspresji (przede wszystkim miR-221 i miR-222) posiadających jako cele mRNA dla receptorów głównych pro-angiogennych czynników wzrostowych (24, 25). Obniżenie poziomu enzymu Dicer w komórkach śródbłonka

wpłynęło na ekspresję kilku istotnych regulatorów funkcji śródbłonka i angiogenezy m. in. Tie1, Tie2 VEGFR2, eNOS i IL-8. miRNA let-7f reguluje endogenny inhibitor angiogenezy trombospondynę-1. W przypadku patologicznej angiogenezy towarzyszącej rozwojowi nowotworów rolę przypisano grupie miR-17-92, której nadekspresja z użyciem wektorów retrowirusowych przyspieszała neowaskularyzację guzów (10). Ponadto udział miRNA wykazano m. in. w regulacji procesów zapalnych w ścianach naczyń krwionośnych objętych miażdżycą (22), chorobie niedokrwiennej serca oraz arytmiach (14).

Regulacja metabolizmu. Pierwsze doniesienia o roli miRNA w metabolizmie pochodzą z obserwacji mutantów miR-14 Drosophila melanogaster, które charakteryzowały się powiększonymi kroplami lipidów w ciele tłuszczowym, podstawowym miejscu gromadzenia tłuszczów u tych owadów (26). W fizjologii ssaków wykryto natomiast rolę miR-375 kontrolującego zależną od glukozy sekrecję insuliny przez regulację genu miotrofiny. Inhibicja tego miRNA objawia się wzmożonym wydzielaniem insuliny, co umożliwia branie pod uwagę tej cząsteczki jako celu dla rozwoju nowych strategii leczenia cukrzycy. Funkcja specyficznego dla komórek wątroby miR-122 została zbadana przez zastosowanie antysensownych oligonukleotydów (ASOs), na podstawie analizy mikromacierzy rozpoznano grupę genów o obniżonej ekspresji odpowiedzialnych za metabolizm lipidów. Zastosowanie ASOs skutkowało podwyższonym tempem oksydacji kwasów tłuszczowych oraz obniżoną syntezą kwasów tłuszczowych i steroli. Całkowite poziomy cholesterolu i triglicerydów w osoczu były obniżone w badanych myszach. W modelu otyłości u myszy (ob/ob) inhibicja miR-122 skutkowała ponadto obniżonym stłuszczeniem wątroby, stąd proponowane wykorzystanie tych obserwacji w leczeniu otyłości (15).

Infekcje wirusowe. Presja selekcyjna w ewolucji wielu wirusów działała w kierunku wykształcenia strategii uniknięcia aktywacji mechanizmów obronnych gospodarza. Wirusy o dużych genomach kodują często specyficzne białka inaktywujące systemy obronne komórki, m. in. odpowiedź interferonową oraz indukcję apoptozy. Wyłaniająca się istotna rola miRNA w regulacji wielu genów, w tym uczestniczących w szlakach sygnalizacyjnych i reakcjach immunologicznych (7) pozwala przypuszczać także o ich znaczeniu dla rozwoju infekcji wirusowych. Nie powinien dziwić fakt wykorzystywania przez wirusy szlaku miRNA dla modulacji ekspresji istotnych dla zakażenia genów przez kodowanie własnych cząsteczek miRNA w obrębie genomu wirusowego oraz wpływ na komórkowe miRNA. Wirusowe miRNA mogą posiadać kilka korzystnych dla patogenu charakterystyk, przede wszystkim są, w przeciwieństwie do białek, nieimmunogenne, ponadto relatywnie krótkie, nawet poniżej 200 nukleotydów/par zasad ze wszystkimi cis-kodowanymi sekwencjami regulatorowymi, co jest dużą zaletą w kontekście ograniczonej pojemności większości genomów wirusowych (27).

Które z wirusów najprawdopodobniej korzystają z własnych miRNA? Większość wirusów RNA oraz Pokswirusy (Poxviridae) należące do wirusów DNA przeprowadza replikację w cytoplazmie co nie pozwoliłoby na obróbkę potencjalnych miRNA w jądrze przez Drosha, ponadto ich wycięcie doprowadziłoby do degradacji genomu wirusów RNA. Istotnie miRNA wykryto jedynie w genomach jądrowych wirusów DNA, w tym wszystkich herpeswirusów (28). Dobrze poznano funkcję miRNA kodowanego przez wirus SV40 (simian virus 40), które hamuje ekspresję dużego antygenu T wirusa w późnych etapach infekcji, chroniąc przed rozpoznaniem i lizą zainfekowanych komórek przez cytotoksyczne limfocyty T (27, 28).

Specyficzna tkankowo ekspresja niektórych miRNA może mieć znaczenie dla tropizmu niektórych wirusów oraz sprzyjać infekcji, jak to ma miejsce w przypadku specyficznego dla hepatocytów miR-122. Interakcja tego miRNA z 5’UTR genomu wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) sprzyja replikacji wirusa (27, 28). Potencjał terapeutyczny miR-122 został rozpoznany przez firmy farmaceutyczne Santaris i Regulus, które prowadzą obecnie prace nad rozwojem metod leczenia

HCV opartych na inhibicji tego miRNA (29). Dokładniejsze poznanie znaczenia miRNA w chorobach wirusowych z pewnością zaowocuje wkrótce rozwojem kolejnych metod leczenia opartych na tych cząsteczkach.

Strategie terapeutycznej modulacji miRNA:

Inhibicja działania miRNA. Dojrzałe miRNA są krótkimi łańcuchami kwasu rybonukleinowego, ten charakter biochemiczny determinuje tworzenie par zasad na zasadzie oddziaływań typu Watson'a-Crick'a jako najkorzystniejszy sposób zahamowania działania tych cząsteczek. ASOs wydają się najszybszą możliwą do zastosowania metodą terapeutycznej inhibicji miRNA. Specyficzne ASOs przeznaczone przeciwko cząsteczkom miRNA, określane AMOs (anti-miRNA ASOs), były stosowane przez wiele grup do obniżania aktywności miRNA w badaniach na kulturach komórkowych. Wykazano skuteczność oligonukleotydów z modyfikacjami cukru na pozycji 2' (szczególnie 2'-O-metylo (2'-OMe), 2'-O-metoksyetylo (2'-MOE), 2'-fluoro (2'-F) i mostka tlenowego między pozycjami 2' i 4' (locked nucleic acids, LNA)), jak również podstawienie atomu tlenu w fosforanie szkieletu fosfocukrowego atomem siarki (30,31).

Podwyższanie powinowactwa AMOs do miRNA wydawałoby się pozytywnie wpływać na aktywność tych molekuł, jednakże dokładniejsze zbadanie tego związku nie wykazało silnej korelacji między powinowactwem, a rzeczywistą skutecznością AMOs (32), wskazując na znaczenie również innych, nie do końca jeszcze dobrze zdefiniowanych, parametrów. Sugerowano, że AMOs mogą obniżać poziom dojrzałego miRNA, jednakże fakt zachodzenia tej degradacji jest do tej pory kontrowersyjny (30,31). Pomimo doniesień o efektywności systemowego podania samych AMOs w roztworze soli fizjologicznej (33), próbuje się poprawiać biodystrybucję oligonukleotydów przez zamykanie w liposomach oraz sprzęganie z małocząsteczkowymi ligandami np. cholesterolem (15). O ile sprzęganie wydaje się być atrakcyjną ścieżką w kierunku tworzenia eksperymentalnych terapii bazujących na AMOs, to kompleksy lipidowe zawierające AMOs wykazują ograniczenia związane z toksycznością, kosztami oraz ograniczoną dystrybucją in vivo.

Wpływ na biogenezę miRNA. Globalne ograniczenie poziomu wszystkich miRNA może być osiągnięte przez zahamowanie procesu dojrzewania tych cząsteczek przez inhibicję enzymów Drosha, Dicer lub innych komponentów szlaku. Spodziewane są jednak liczne plejotropowe efekty takiego podejścia. Ponadto, dość łagodne efekty obniżenia aktywności składników szlaku biogenezy miRNA sugerują, iż cząsteczki te charakteryzują się dość dużą stabilnością i długim czasem życia w komórce, co ogranicza możliwość zastosowania takiej strategii w krótkoterminowej terapeutycznej modulacji poziomu miRNA (30).

Metody suplementacji. W przypadku wielu schorzeń, w szczególności nowotworów, obniżenie poziomu pewnych miRNA przyczynia się istotnie do rozwoju objawów patologicznych. Stąd, dostarczanie molekuł mogących pełnić w komórkach funkcje brakujących cząsteczek miRNA wydaje się mieć potencjał terapeutyczny. Najbardziej realne wydaje się na chwilę obecną zastosowanie w tym celu cząsteczek analogicznych do naturalnych produktów cięcia przez Dicer i zbliżonych strukturą do cząsteczek siRNA. Zastosowanie takich cząsteczek napotyka te same trudności, co rozwijane lecznicze siRNA, przede wszystkim stabilność i dostarczenie do różnych typów tkanek. Niezbędne wydają się modyfikacje chemiczne stosowanych kwasów nukleinowych, tak aby poprawić stabilność w płynach ustrojowych głównie przez zabezpieczenie przed degradacją przez nukleazy, a także zapobiec szybkiemu usuwaniu z krwioobiegu przez filtrację w nerkach. Ochronę przed nukleolitycznym trawieniem mogą zapewnić liczne modyfikacje pozycji 2' cukru (2'-OMe, 2'-MOE, 2'-F, LNA). Podstawienie części atomów tlenu siarką w szkielecie fosfocukrowym sprzyja wiązaniu przez białka osocza i opóźnia usuwanie przez nerki (30). Poprawa pobierania preparatów możliwa

jest do osiągnięcia przez sprzęganie z resztami takimi jak cząsteczki cholesterolu (15). Skutecznym podejściem może być także lokalne podanie terapeutycznych kwasów nukleinowych, pierwsze próby kliniczne zostały już przeprowadzone dla doocznego podawania siRNA przeciwko receptorowi dla VEGF w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej związanego z wiekiem (Age-related Macular Degeneration, AMD) (34). Podawanie wziewne wykazało efekt terapeutyczny w leczeniu infekcji wirusowych górnego układu oddechowego (30). Ekspresja miRNA z wektorów wirusowych. Odmiennym podejściem do dostarczania terapeutycznych cząsteczek miRNA do organizmu jest umieszczenie kodujących ich sekwencji w obrębie zmodyfikowanego genomu wirusowego służącego jako wektor dla potrzeb terapii genowej. Zwykle polega to na wklonowaniu odpowiedniej kasety ekspresyjnej zawierającej sekwencję kodującą krótką cząsteczkę RNA o strukturze spinki do włosów (short hairpin RNA, shRNA) pod promotorem dla polimerazy RNA II lub III. shRNA jest następnie cięte przez Dicer i ulega załadunkowi do RISC. Niewątpliwymi korzyściami płynącymi z takiej strategii jest szansa uzyskania bardziej stabilnej i długotrwałej ekspresji bez konieczności wielokrotnego podawania preparatów leczniczych miRNA, a także możliwość ekspresji wielu cząsteczek miRNA jednocześnie (30,35). Przydatność zmodyfikowanych adenowirusów i wirusów związanych z adenowirusami (Adeno-associated Viruses, AAV) do dostarczania transgenów do komórek wielu tkanek została potwierdzona w licznych badaniach (36). Niestety wciąż podejście to napotyka ograniczenia związane z odpowiedzią immunologiczną przeciwko adenowirusom oraz ograniczoną infekcją niektórych typów tkanek. W konstrukcji wektorów tych typów możliwe jest wykorzystanie specyficznej dla danego typu komórek bądź tkanki ekspresji pewnych miRNA w celu modyfikacji naturalnego tropizmu wirusów. Przykładowo dodanie sekwencji komplementarnej dla specyficznego dla komórek wątroby miR-122 do genu E1A onkolitycznego wektora adenowirusowego umożliwia redukcję replikacji wirusa w tych komórach oraz hepatotoksyczności związanej z podaniem wektora, przy jednoczesnym zachowaniu zdolności do normalnej replikacji w pozostałych typach komórek (37). W celu uzyskania myszy z obniżoną ekspresją niektórych genów użyto natomiast lentiwirusów do infekcji embrionalnych komórek macierzystych (38). Wyższa stabilność ekspresji z tych wektorów związana z integracją do genomu niesie za sobą jednak ryzyko mutagenezy insercyjnej. Badania Grimm'a i współpracowników (39) zwróciły uwagę także na ryzyko saturacji szlaku RNAi przez zastosowanie zbyt silnych promotorów dla ulegających ekspresji cząsteczek shRNA. Eksportyna 5, będąca czynnikiem limitującym eksport pre-miRNA z jądra do cytoplazmy wydaje się mieć znaczenie w mechanizmie hepatotoksyczności indukowanej podaniem wektorów z shRNA pod silnymi promotorami. Stąd konieczność starannej optymalizacji konstrukcji wektorów do terapeutycznego uzupełniania niedoborów ekspresji niektórych miRNA.

Podsumowanie:

Niedawne odkrycie znaczenia miRNA w regulacji ekspresji genów przyniosło falę zainteresowania i intensywnych badań mających na celu poznanie ich roli zarówno w warunkach fizjologicznych, jak i patologicznych. Uzyskane wyniki dają nadzieje na możliwość opracowania licznych zastosowań terapeutycznych tych cząsteczek szczególnie w dziedzinie terapii genowej. Wciąż jednak pozostało wiele do odkrycia w kwestii dokładnego mechanizmu działania miRNA, jak i funkcji konkretnych z nich. Z pewnością największy potencjał zdaje się tkwić w zdolności pojedynczego miRNA do regulacji ekspresji wielu powiązanych genów, co mogłoby prowadzić do regulacji całych szlaków sygnałowych, czy metabolicznych przy pomocy modulacji jednej lub kilku cząsteczek np. dostarczonych przez podanie w jednym wektorze wirusowym. Przy tym cząsteczki te są niewielkiej długości, co umożliwia modulację krótkimi oligonukleotydami, bądź inkorporację do wektorów używanych w terapii genowej. Wpływ na wiele docelowych mRNA stanowić może jednak również poważne utrudnienie w rozwoju leków opartych na miRNA ze względu na spodziewane efekty uboczne i jest przyczyną skupienia uwagi przemysłu farmaceutycznego głównie na cząsteczkach siRNA (40). Mimo to, należy spodziewać się, iż optymalizacja kwestii dostarczania, wydajności,

stabilności i toksyczności zaowocuje w najbliższych latach licznymi klinicznymi zastosowaniami miRNA.

Autor: Kamil Kruczek.

Literatura:

1.Fire A., Xu S., Montgomery M., Kostas S., Driver S., Mello C. "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans". Nature (1998) 391(6669): 806–11.
2. Grünweller A., Hartmann R. K. "RNA Interference as A Gene-Specific Approach for Molecular Medicine" Current Medicinal Chemistry (2005) 12: 3143-3161.
3. Sledz C. A., Bryan R. G. „RNA interference in biology and disease" Blood (2005) 106: 787-794.
4. Lu P. Y. et al. "Harnessing in vivo siRNA delivery for drug discovery and therapeutic development" Drug Discovery Today (2006) 11(1-2):67-73.
5. Griffiths-Jones S. "The microRNA Registry" Nucleic Acids Res. (2004) 32:D109-111.
6. Lewis B. P., Burge C. B., Bartel D. P. "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets" Cell (2005) 120:15-20.
7. Williams A. E. "Functional aspects of animal microRNAs" Cell. Mol. Life Sci. (2008) 65:545-562.
8. Erson A. E., Petty E. M. "MicroRNAs in development and disease" Clin Genet (2008) 74:296-306.
9. Bartel D. P. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell (2004) 116:281-297.
10. Zhang C. "MicroRNAs: role in cardiovascular biology and disease" Clin Sci (Lond) (2008) 114(12):699-706.
11. ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/mirbase/sequences/CURRENT/README.
12. Zhang C. "MicroRNomics: a newly emerging approach for disease biology" Physiol Genomics (2008) 33:139-147.
13. Sassen S., Miska A., Caldas C. "MicroRNA – implications for cancer" Virchows Arch (2008) 452:1-10.
14. Silvestri P., Di Russo C., Rigattieri S., Fedele S., Todaro D., Ferraiuolo G., Altamura G., Loschiavo P. "MicroRNAs and Ischemic Heart Disease: Towards a Better Comprehension of Pathogenesis, New Diagnostic Tools and New Therapeutic Targets" Recent Pat Cardiovasc Drug Discov (2009) 4(2):109-18.
15. Krützfeldt J., Rajewsky N., Braich R., Rajeev K. G., Tuschl T., Manoharan M., Stoffel M. "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'" Nature (2005) 438(7068):685-9.
16. Bernstein E., Kim S. Y., Carmell M. A., Murchison E. P., Alcorn H., Li M. Z., Mills A. A., Elledge S. J., Anderson K. V., Hannon G. J. "Dicer is essential for mouse development" Nat Genet. (2003) 35(3):215-7.
17. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M. "Frequent deletions and down-regulation of miRNA genes miR-15 and miR-16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci USA (2002) 99:15524-15529.
18. Cho W. C. S. "OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers" Molecular Cancer (2007) 6:60.
19. Woods K., Thomson J. M., Hammond S. M. "Direct regulation of an oncogenic microRNA cluster by E2F transcription factors" J Biol Chem (2007) 282:2130-2134.
20. Mayr C., Hemann M. T., Bartel D. P. "Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation." Science (2007) 315:1576-1579.
21. Kumar M. S., Lu J., Mercer K. L., Golub T. R., Jacks T. "Impaired miRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis." Nat Genet (2007) 39:673-689.
22. Ubich C., Kuehbacher A., Dimmeler S. "Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis" Cardiovascular Research (2008) 79:581-588.

23. Zhao Y., Samal E., Srivastava D. “Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis.” Nature (2005) 436:215-220.
24. Poliseno L., Tuccoli A., Mariani L., Evangelista M., Citti L., Woods K., Mercatanti A., Hammond S., Rainaldi G. “MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs.” Blood (2006) 108:3068-3071.
25. Scalbert E., Bril A. “Implications of microRNAs in the cardiovascular system” Curr Opin Pharmacol. (2008) 8(2):181-8.
26. Xu P., Vernooy S. Y., Guo M., Hay B. A. “The Drosophila microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism” Curr Biol. (2003) 13(9):790-5.
27. Sall A., Liu Z., Zhang H. M., Yuan J., Lim T., Su Y., Yang D. “MicroRNAs-Based Therapeutic Strategy for Virally Induced Diseases” Curr Drug Discov Technol. (2008) 5(1):49-58.
28. Cullen B. R. “Viruses and microRNAs” Nat Genet. (2006) 38 Suppl:S25-30.
29. http://regulusrx.com/ , http://www.santaris.com/Default.aspx .
30. Esau C. C., Monia B. P. „Therapeutic potential for microRNAs” Adv Drug Deliv Rev. (2007) 59(2-3):101-14.
31. Horwich M. D., Zamore P. D. „Design and Delivery of Antisense Oligonucleotides to Block microRNA Function in Cultured Drosophila and Human Cells” Nat Protoc. (2008) 3(10):1537-49
32. Davis S., Lollo B., Freier S., Esau C. “Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides” Nucleic Acids Res. (2006) 34(8):2294-304.
33. Elmén J, Lindow M, Schütz S, et al. “LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates.” Nature. (2008) 452(7189):896–899.
34. Shen J, Samul R, Silva RL, et al. “Suppression of ocular neovascularization with siRNA targeting VEGF receptor 1.” Gene Ther. (2006) 13:225–234.
35. Snyder L. L., Ahmed I., Steel L. F. “RNA polymerase III can drive polycistronic expression of functional interfering RNAs designed to resemble microRNAs.” Nucleic Acids Res. (2009) doi:10.1093/nar/gkp657 .
36. Kay M. A., Glorioso J. C., Naldini L. “Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.” Nat Med. (2001) 7(1):33-40.
37. Ylösmäki E, Hakkarainen T, Hemminki A, Visakorpi T, Andino R, et al. Generation of a Conditionally Replicating Adenovirus Based on Targeted Destruction of E1A mRNA by a Cell Type-Specific MicroRNA. Journal of Virology. (2008) 82:11009–11015.
38. Rubinson D. A., Dillon C. P., Kwiatkowski A. V., Sievers C., Yang L., Kopinja J., Rooney D. L., Zhang M., Ihrig M. M., McManus M.T., et al. “A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference.” Nat Genet. (2003) 33:401–406.
39. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, et al. “Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways.” Nature. (2006) 441:537–41.
40. Mack G. S., “MicroRNA gets down to business” Nat Biotechnol. (2007) 25(6):631-8.

Źródło: http://www.e-biotechnologia.pl/

http://laboratoria.net/home/16371.html
Informacje dnia: Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów

Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób Jazda na rolkach - Czy jest dobrym sportem? Polimer o właściwościach przeciwgrzybiczych Stypendia ministra nauki dla niemal 400 studentów Skuteczniejsze leczenie chorych na nowotwory krwi Tylko 36% transgranicznych wód podziemnych ma ochronę Technologia ultradźwiękowa w diagnostyce chorób

Partnerzy