Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy
Katedra fyziologie a vývojové biologie, Oddělení vývojové biologie a imunologie

Vektory pro transgenní RNAi v myších oocytech

Bakalářská práce

Lenka Sarnová

Ústav molekulární genetiky Akademie věd České republiky
Oddělení epigenetických regulací
2007

Obsah

1. Abstrakt 2

2. RNAi 3

2.1. RNAi v savčích buňkách 5

3. Vektory pro RNAi 6

4. Možné RNAi vektory pro experimenty v myších oocytech 8

4.1. Dosud používané vektory pro transgenní RNAi v myších oocytech 8

4.2. RNA pol III vektory exprimující krátké vlásenky 10

4.2.1. Tkáňově specifická exprese z pol III promotorů 10

4.2.2. Indukovatelná inaktivace genů zprostředkovaná pol III vektorem 11

4.3. RNA pol II vektory 12

5. Závěr 14

6. Poděkování 15

7. Použitá literatura 16

1. Abstrakt

RNA interference (RNAi) indukuje sekvenčně specifickou degradaci messenger RNA (mRNA). Narozdíl od časově náročné homologní rekombinace představuje rychlý způsob, jak genovou expresi redukovat. RNAi byla pozorována u mnoha rostlinných i živočišných druhů a se stala rozšířenou experimentální metodu využívanou ke studiu genové funkce u *Drosophila melnogaster*, *Caenorhabditis elegans* a také u savců. Byla vyvinuta řada systému indukujících RNAi v savčích buňkách, ale jen některé z nich byly otestovány i na oocytech. Cílem této práce je shrnout, jaké systémy se k navození RNAi používají, a zhodnotit jejich výhody a nevýhody s ohledem na využití v myších oocytech.

Abstract

RNAi interference (RNAi) induces sequence-specific degradation of mRNA. In contrast to homologous recombination, using RNAi to reduce gene expression is easy and fast solution. RNAi was observed in many species and became widespread experimental tool to study gene function in *Drosophila melnogaster*, *Caenorhabditis elegans* and mammals too. A number of systems inducing RNAi in mammalian cells has been developed but only few of them were tested in mouse oocytes. The purpose of this essay is to summarize systems potentially useful for transgenic RNAi and to evaluate their advantages and disadvantages with regard to mouse oocytes.

Klíčová slova: RNAi, miRNA, shRNA, oocyt

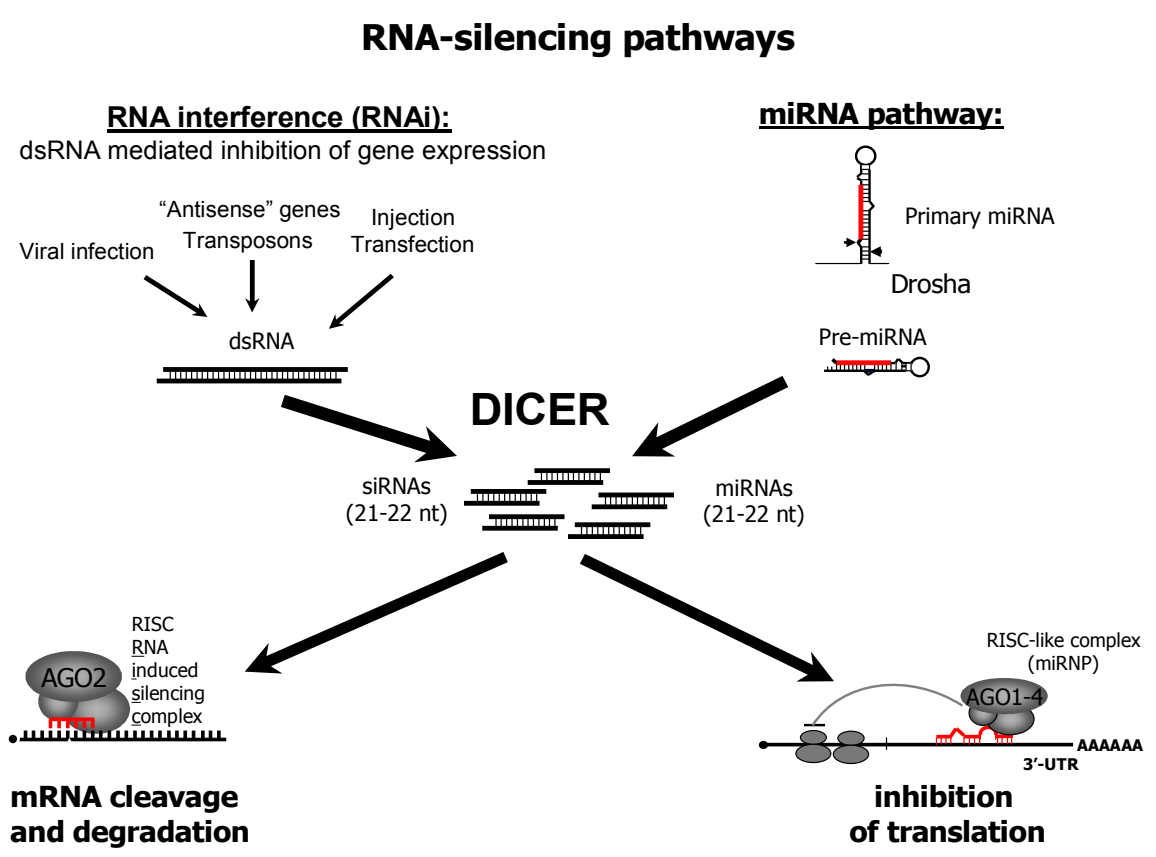
2. RNAi

RNAi, poprvé popsaná v roce 1998 (Fire et al., 1998), je evolučně konzervovaný mechanismus, ve kterém dvouvláknová RNA (dsRNA) indukuje degradaci komplementárních mRNA (shrnuto v Mello a Conte, 2004). RNAi se dnes běžně využívá k inhibici exprese genů při studiu jejich funkce. RNAi je často možné použít místo klasické, nejen časově, ale i finančně náročné, homologní rekombinace.

V prvním kroku RNAi je dsRNA naštěpena RNázou III Dicer na 21-23 nukleotidů dlouhé dvouvláknové fragmenty s krátkými 3´ přesahy nazývané small interfering RNA (siRNA) (Obr.1 a 2). SiRNA se integruje do ribonukleoproteinového komplexu RNA-induced silencing complex (RISC). RISC rozpozná mRNA se sekvencí homologní k jednomu z řetězců siRNA a zabrání její expresi. RNAi tedy reguluje expresi příslušného proteinu na posttranskripční úrovni (Obr. 1) (shrnuto v Wang a Carmichael 2004). Jaký je další osud cílové mRNA závisí na tom, jak jsou mRNA a siRNA komplementární. Pokud jsou sekvence těchto dvou RNA dokonale komplementární, dojde ke štěpení mRNA uprostřed homologní sekvence. Pokud ale komplementarita těchto sekvencí není dokonalá, k rozštěpení nedojde. V tomto případě RISC zablokuje translaci a celý mRNA-RISC komplex se přesune do cytoplazmatických struktur zvaných P-bodies (Liu et al., 2005).

Stejně jako siRNA mohou RNAi efekt způsobit i mikroRNA (miRNA). MiRNA jsou definovány jako jednořetězcové, přibližně 22 nt dlouhé RNA, které vznikají z transkriptů tvořících lokální vlásenkovou strukturu (Ambros et al., 2003). MiRNA se od siRNA liší především původem, nikoliv v konečném mechanismu mRNA represe.

MiRNA jsou transkribovány polymerázou II (pol II) jako dlouhý prekurzor (pri-miRNA). V jádře RNáza III Drosha odstřihne z primárního transkriptu asi 70-80 nt dlouhý vlásenkový meziprodukt (pre-miRNA). Při štěpení vznikne na 3´ konci vlásenky dvounukleotidový přesah. Pre-miRNA je následně exportinem 5 (Lund et al., 2004) transportována do cytoplazmy (podrobně shrnuto v Kim, 2005). Úspěšně může být transportována pouze vlásenka s dvouvláknovou oblastí delší než 16 párů bází a krátkým 3´ přesahem (Zeng a Cullen, 2004). V cytoplazmě Dicer odštípne terminální smyčku, čímž vznikne krátká dsRNA. Řetězec představující miRNA se zakomponuje do RISC komplexu (Obr.1), zbývající řetězec, tzv. passenger strand, je degradován. U savců existuje pouze jediný Dicer protein. Ten produkuje jak miRNA tak i siRNA. Ale například u Drosophily se vyskytují dva Dicer proteiny. Dicer-1 štěpí pre-miRNA, zatímco Dicer-2 vytváří siRNA (Lee et al. 2004).



Obr.1 Mechanismus vzniku a funkce siRNA a miRNA.

Který řetězec z siRNA duplexu se zakomponuje do RISC komplexu, závisí na stabilitě konců siRNA. RISC přednostně váže řetězec s méně stabilním 5´ koncem (Khvorova et al., 2003). Stabilitu konců ovlivňuje počet vodíkových můstků mezi párujícími bázemi, záleží tedy na poměru A-U a G-C párů. Protože A-U páry jsou vázány pouze dvěma vodíkovými můstky, je oblast se zvýšeným výskytem těchto párů méně stabilní. Tuto skutečnost je nutné zohlednit při výběru sekvence pro přípravu syntetických siRNA.

Dvounukleotidový přesah na 3´ konci siRNA/miRNA duplexu rozpozná PAZ doména Argonaut proteinu, který je základní komponentou RISC komplexu (Lingel et al., 2004). U savců existuje celkem osm Argonaut proteinů, ale jen čtyři vážou siRNA/miRNA, Ago 1-4. Všechny čtyři Ago proteiny mohou zprostředkovat represi translace, ale štěpení mRNA může zprostředkovat jen Ago2 (Obr.1) (Meister et al., 2004). U *Drosophila melanogaster* existují specifické Ago proteiny, Ago1 pro miRNA a Ago2 pro siRNA (Okamura et al.,2004).

Zda dojde k degradaci mRNA nebo k zablokování transkripce, závisí v savčích buňkách na míře komplementarity mezi miRNA/siRNA a mRNA (Hutvagner a Zamore, 2002). Úplná nebo téměř úplná komplementarita vede k rozštěpení mRNA. Endogenní

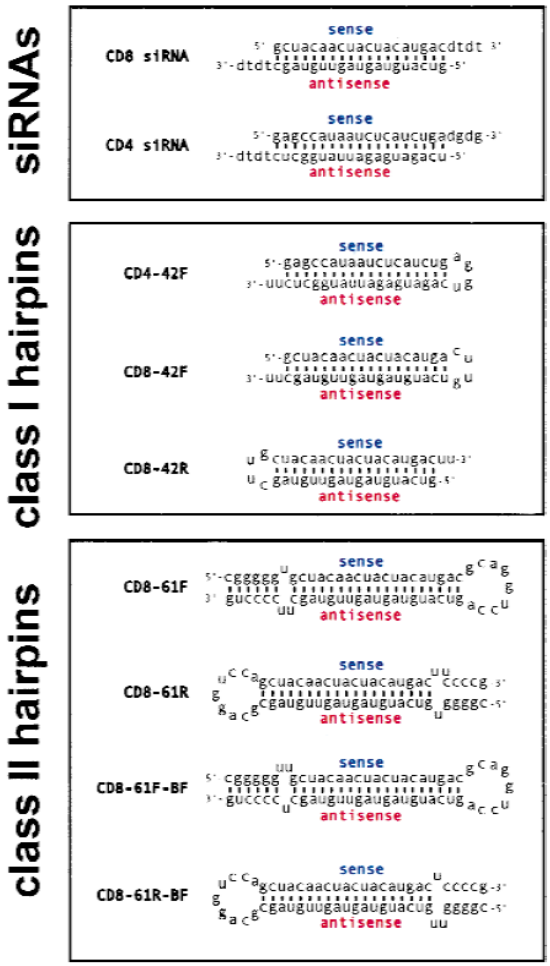
miRNA nejsou typicky dokonale komplementární a tak většinou po navázání na 3´UTR zablokují translaci (Olsen a Ambros, 1999). Savčí miRNA se velmi pravděpodobně nevyvinuly ze sekvencí regulovaných genů (Svoboda a Di Cara 2006) a proto nepárují s mRNA dokonale. Zajistíme-li ovšem, aby miRNA byla plně komplementární k cílové mRNA, ke specifickému štěpení mRNA prostřednictvím Ago2 dojde (Zeng et al., 2002). Naopak pokud porušíme perfektní komplementaritu mezi siRNA a mRNA, dojde k represi translace, nikoliv k degradaci mRNA.

2.1. RNAi v savčích buňkách

U savců byla RNAi poprvé vyvolána na myších oocytech a embryích (Wianny a Zernicka-Goetz, 2000, Svoboda et al., 2000). RNAi zde byla navozena mikroinjekcí dlouhých molekul dsRNA. Indukce RNAi pomocí dsRNA je ale možná pouze v oocytech, časných embryonálních stádiích nebo nediferencovaných kmenových buňkách. V savčích somatických buňkách vede přítomnost již malého počtu dsRNA delších než 30bp k aktivaci komplexu reakcí obecně nazývaných interferonová odpověď. Jedním z hlavních komponent je protein kináza R (PKR). PKR fosforylací inaktivuje translační faktor eIF2a, což vede k zastavení syntézy proteinů a případně až k apoptóze. DsRNA také aktivuje 2´,5´-oligoadenylát syntázu. 5´ terminální trifosfátové zbytky 2´,5´-oligoadenylátu indukují aktivaci RNázy, která je zodpovědná za degradaci RNA (shrnuto v Barber, 2001). Buňky se tímto způsobem brání invazi virů, v jejichž životním cyklu se dsRNA běžně vyskytuje.

3. Vektory pro RNAi

RNAi se dá indukovat transfekcí siRNA. Chceme-li, aby RNAi efekt byl trvalý, je třeba zajistit expresi siRNA z integrovaného vektoru. K indukci RNAi je možné použít expresi krátkých vlásenek, u nichž velmi záleží na sekvenci a strukturní konfiguraci neboť i nepatrná modifikace může ovlivnit jejich aktivitu (McManus et al., 2002). Existují tři typy RNA vlásenek úspěšně využívaných k indukci RNAi. Liší se od sebe délkou dvouvláknové oblasti, velikostí koncové smyčky a přítomností nepravidelností ve struktuře (Svoboda a Di Cara 2006).



Obr.2. Struktura si RNA a vlásenek typu I a II (převzato z McManus et al., 2002).

První typ vlásenky je přímo odvozen od siRNA (McManus et al., 2002). Sense a antisense řetězce siRNA, které tvoří dokonalou helikální strukturu dlouhou alespoň 19 bp, jsou spojeny smyčkou o délce 4 až 9 nukleotidů (Obr.2). Je-li propojen 5´ konec sense řetězce s 3´ koncem antisense řetězce, je vlásenka účinná téměř stejně jako siRNA. Při opačném spojení je efekt téměř nulový ve srovnání s siRNA (McManus et al., 2002). Tento typ vlásenek se obvykle označuje jako short hairpin RNA (shRNA). Na expresi tohoto typu

vlásenky se pravděpodobně vůbec nepodílí RNáza Dicer. Exprese shRNA je řízena pol III promotorem. Polymerázou III syntetizované vlásenky jsou rovnou exportovány do cytoplazmy a zde se vážou na RISC.

Vlásenka druhého typu se chová jako miRNA (McManus et al., 2002). Tvoří součást dlouhého transkriptu, z něhož ji vystřihne RNáza Drosha (Denli et al., 2004). Po exportu do cytoplazmy Dicer odštěpí smyčku od dvouvláknové části vlásenky. Tento typ vlásenky je označován jako mikroRNA-like. Stejně jako miRNA netvoří dokonalou helikální strukturu, ale obsahuje nepravidelnosti vzniklé tím, že v některých místech proti sobě leží nekomplementární nukleotidy (Obr.2). Expresi zajišťuje obvykle pol II promotor.

Třetí typ vlásenky vzniká přepisem dlouhé invertované repetice. Tak vznikne dlouhá vlásenka fungující stejně jako dlouhá dsRNA. V savčích buňkách je možné tyto vlásenky použít pouze v oocytech, časných embryích nebo nediferenciovaných kmenových buňkách. Běžně se také využívají k navození RNAi u rostlin a bezobratlých živočichů (shrnuto v Svoboda, 2004).

4. Možné RNAi vektory pro experimenty v myších oocytech

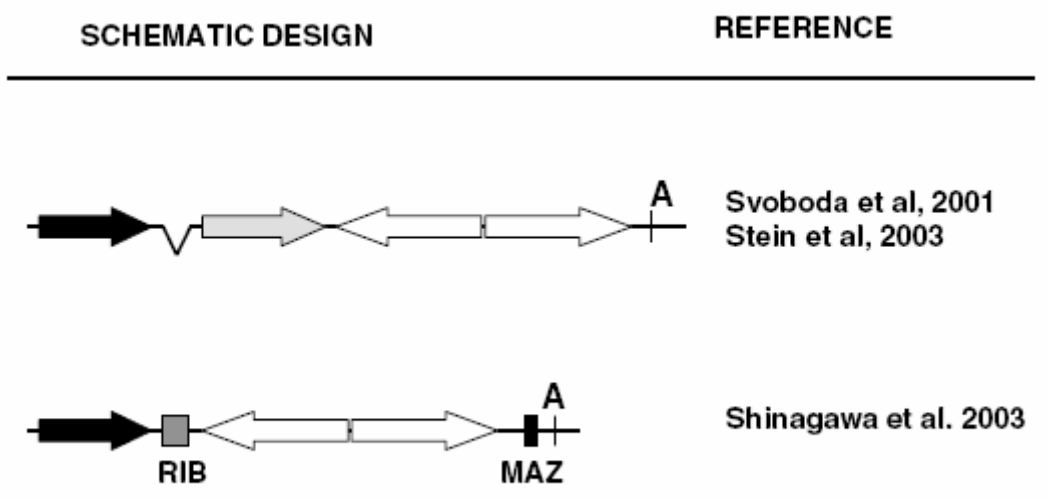
Oocyty jsou diferencované samičí pohlavní buňky, které po oplození a epigenetickém reprogramování dají vznik novým jedincům. V oocytech můžeme indukovat stabilní RNAi pomocí transgenů exprimujících jak krátké, tak i dlouhé vlásenky. Ke konstrukci transgenních vektorů lze teoreticky použít různé pol III nebo pol II systémy, jejichž volba bude záviset na studovaném genu. V případě, že existuje riziko, že by inaktivace genu měla nežádoucí efekty mimo oocyt, je nutné použít tkáňově-specifickou expresi RNA vlásenky. Je možné vytvořit transgeny, ve kterých oocyt-specifický promotor (typicky ZP3) kontroluje přímo expresi dlouhé RNA vlásenky nebo miRNA-like vlásenky. Tkáňově specifická exprese shRNA by vyžadovala poněkud komplikovanější přístup (viz dále).

Naprostá většina transgenních RNAi experimentů v myších oocytech dosud využívala expresi dlouhé RNA vlásenky kontrolovanou ZP3 promotorem (Obr. 3) (Stein et al., 2003, Yu et al., 2004, Ma et al., 2006, Fedoriw et al., 2004). Tento systém se ukázal jako funkční s minimem nespecifických efektů (Stein et al., 2005). Nicméně má určité nedostatky (viz dále) a bylo by výhodné jej nahradit tkáňově specifickým systémem exprimujícím shRNA nebo miRNA-like vlásenku. Diskuse tohoto problému je tématem zbývající části této práce.

4.1. Dosud používané vektory pro transgenní RNAi v myších oocytech

Jak již bylo zmíněno v oocytech můžeme RNAi indukovat dlouhou dvouvláknovou RNA. Exprese dlouhé vlásenky navodí RNAi efekt srovnatelný s mikroinjekcí dsRNA (Svoboda et al., 2001). Různé skupiny vyvinuly řadu systémů exprimujících dlouhé dsRNA. Nejjednodušší systémy se skládají pouze z promotoru a invertované repetice. Jiný systém zase zajišťuje expresi každého řetězce dsRNA z jiného promotoru (shrnuto např. v Svoboda 2004).

Zatímco delší 3´ přesah blokuje RNAi *in vitro* (Elbashir et al., 2001), interferenci *in vivo* nebrání ani 3´ ani 5´ přesah (Svoboda et al., 2001). Toto zjištění evokovalo myšlenku vyzkoušet plazmid, kde by jeden promotor řídil expresi jak vlásenky tak markeru. Testované plazmidy nesly buď CMV (cytomegalovirus) promotor, nebo pro oocyty specifický ZP3 promotor a byly testovány v oocytech nebo časných embryích. Degradace cílové mRNA byla stejně efektivní, ať ležela GFP sekvence před nebo za vlásenkou, zatímco fluorescence byla detekovatelná pouze, ležela-li markerová sekvence před vlásenkou. Hladinu exprese markeru a RNAi efekt ovlivnilo vložení intronu. Nacházel-li se intron vedle GFP, jeho exprese se zvýšila. Intron však nesměl ležet v sousedství vlásenkové sekvence, jinak došlo k zablokování RNAi (Svoboda et al., 2001). Systém složený z intronu a GFP sekvence následované invertovanou repeticí (Obr.3) byl použit pro transgenní RNAi (Stein et al., 2003).



Obr.3. Systémy využité k transgenní expresi dsRNA v savčích buňkách. Černá šipka představuje promotor, bílá sekvence řetězců dsRNA, šedá GFP sekvenci (převzato z Svoboda 2004).

Objevil se také systém generující dlouhou vlásenku, která by ani v pozdějších vývojových stádiích neměla vyvolávat interferonovou odpověď (Shinagawa a Ishii, 2003). Dlouhá vlásenka vyvolá interferonovou odpověď poté, co je transportována do cytoplazmy (Stark et al., 1998). Pokud ji však Dicer naštěpí už v jádře, dostanou se do cytoplazmy siRNA, které jsou příliš krátké na to, aby vyvolaly interferonovou odpověď. Aby se mohl dlouhý transkript dostat ven z jádra, musí být opatřen 5´ čepičkou a polyA 3´ koncem. Pokud se tyto struktury odstraní, zůstane mRNA v jádře. Byl tedy zkonstruován vektor složený z pol II promotoru a invertované repetice ohraničené ribozymovou sekvencí na 5´ konci a MAZ sekvencí na 3´ konci (Obr.3). Ribozym zprostředkoval odštěpení 5´ čepičky a MAZ sekvence předčasně ukončila transkripci. Tento transgenní RNAi systém byl úspěšně použit k zablokování exprese *Ski* genu v myších embryích (Shinagawa a Ishii, 2003).

RNAi představuje ideální nástroj ke studiu funkce maternálních mRNA (Svoboda et al., 2000). Redukce maternální mRNA pomocí transgenní RNAi byla úspěšně vyzkoušena na *Mos* mRNA. Translace *Mos* mRNA vede k aktivaci mitogen-activated protein (MAP) kinázy, jejímž úkolem je zastavit vývoj oocytu v metafázi II (Gebauer a Richter, 1997). Dělení je dokončeno až po splynutí oocytu se spermií. V případě, že *Mos* mRNA odstraníme, dojde k dokončení meiozy a partenogenetické aktivaci. V myších oocytech se podařilo pomocí transgenní RNAi inaktivovat řadu genů, vedle zmíněného *Mos* genu například *Msy2*, *Basonuclin* a *Ctcf* (Yu et al., 2004, Ma et al., 2006, Feridow et al., 2004).

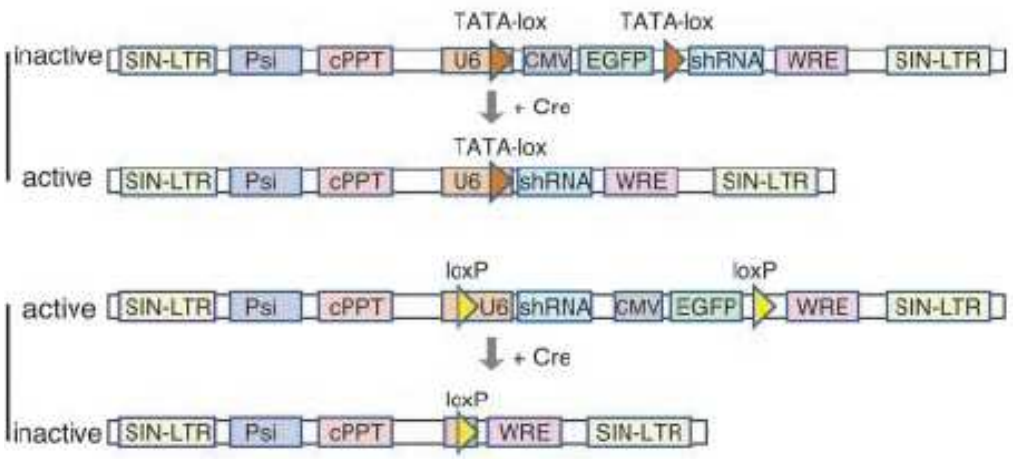
Práce s dlouhými invertovanými repeticemi je na druhou stranu obtížná a vektory pro transgenní RNAi nejsou snadno modifikovatelné pro použití v jiných běžných modelových systémech jako jsou například buněčné kultury. Proto by bylo výhodné vyvinout nový systém pro transgenní RNAi v myších oocytech založený na expresi krátkých vlásenek, který by tyto nedostatky odstranil.

4.2. RNA pol III vektory exprimující krátké vlásenky

Pol III vektory umožňují snadnou inaktivaci ve všech buňkách organismu. Pol III systémy nejčastěji využívají U6 nebo H1 promotor (Svoboda a Di Cara 2006). Za promotorem následuje vlásenková sekvence následovaná několika thymidiny, které slouží jako signál pro ukončení transkripce a umožní vznik 3´ přesahujícího konce. Pol III vektory mohou zajišťovat expresi shRNA i miRNA-like vlásenek. Každý pol III promotor zajistí expresi pouze jedné vlásenky. Vektory exprimující miRNA-like vlásenky inaktivují cílový gen efektivněji (Silva et al., 2005). Byly vyzkoušeny i vektory, které nezajišťovaly expresi vlásenky, ale přímo jednotlivých řetězců siRNA (Miyagishi et al., 2002). Tyto systémy však nebyly příliš úspěšné.

4.2.1. Tkáňově specifická exprese z pol III promotorů

Tkáňově specifickou expresi vlásenky mohou zajistit i vektory řízené pol III promotorem, např. Cre-lox regulované vektory (Ventura et al., 2004). Cre-lox regulované vektory jsou založené na modifikovaném myším U6 promotoru (Obr.4) a umožňují zahájení nebo ukončení exprese shRNA. Změnu exprese zprostředkuje Cre rekombináza, tím že odstraní část vektoru ohraničenou loxP místy. V případě Cre-aktivovatelného vektoru jsou loxP místa začleněna do TATA boxu (TATA lox). Mezi dvě TATA lox sekvence je vložena T_6 sekvence (Lox-STOP-lox kazeta), která slouží jako terminační signál pro RNA polymerázu III, a dále CMP-GFP kazeta. Za druhou TATA lox sekvencí pak následuje úsek kódující shRNA. V této podobě se exprimuje pouze GFP protein nikoliv shRNA. Po dodání Cre dojde k vyštěpení CMV-GFP kazety a začne se exprimovat shRNA (Obr.4). V případě Cre-inaktivovatelného vektoru je loxP sekvence vložena před PSE (proximal sequence element) U6 promotoru a za shRNA sekvenci následovanou GFP kazetou. Po aplikaci Cre se vyštěpí celá tato oblast včetně nepostradatelné části promotoru. Změnu exprese shRNA lze ovšem provést jen jednou a nevratně (Ventura et al., 2004).



Obr.4. Cre-lox regulované vektory před a po Cre zprostředkované rekombinaci (převzato z Ventura et al., 2004).

Cre-lox systémy představují řešení, jak indukovat tkáňově specifickou expresi shRNA. Pokud zkřížíme myš s neaktivovaným cre-lox vektorem s myší, u níž je ve vybrané tkáni exprimována Cre rekombináza, část potomstva bude vykazovat tkáňově specifickou expresi shRNA. Tato metoda je sice časově i finančně náročná, ale je dobrým řešením, pokud chceme inaktivovat vybraný gen v řadě různých tkáních. Cre-aktivovaný systém byl úspěšně použit k represi *Fgfr2* genu v transgenních myších (Coumoul et al., 2005).

4.2.2. Indukovatelná RNAi pomocí pol III vektoru

Existují systémy, kde promotor řídící expresi vlásenky je pod vlivem elementu, který umožní nebo blokuje transkripci v přítomnosti doxycyklinu nebo ekdysonu (van de Wetering et al., 2003, Gupta et al., 2004). Ekdysonem ovlivnitelné systémy představují lepší řešení při *in vivo* použití. Ekdyson je přirozený lipofilní steroid, snadno se dostává do tkání, je rychle odbouráván a narozdíl od doxycyklinu nepůsobí toxicky (Karns et al., 2001).

Systém, u něhož přítomnost muristeronu A (murA), analogu ekdysonu, vede k expresi shRNA, tvoří tři různé vektory (Gupta et al., 2004). Jeden vektor zajišťuje expresi vlásenky, zbylé dva produkují podjednotky transkripčního faktoru. Dimerní transkripční faktor se naváže na promotor řídící produkci aktivátoru. Aktivátor pak umožní zahájení transkripce shRNA. Dimerizaci transkripčního faktoru umožní právě murA. V jeho přítomnosti tedy dochází k inaktivaci vybraného genu. Tento systém umožňuje různou míru regulace. Záleží na tom, jaké množství indukující látky se podá (Gupta et al., 2004).

Indukovatelná inaktivace genu zprostředkovaná působením doxycyklinu je založena na modifikovaném promotoru, do něhož je vložen Tet operátor (tetO). Nasedne-li se na tetO

Tet represor (TetR), zamezí transkripci. Pokud dodáme doxycyklin, naváže se na Tet represor, zabrání jeho vazbě na tetO a zahájí se transkripce (van de Wetering et al., 2003).

Další doxycyklinem regulovaný systém využívá tTRKRAB (Szulc et al., 2006). Ten vznikne spojením KRAB (Krüppel-associated box) domény a TetR. KRAB doména je obsažena v DNA vazebných proteinech u mnoha obratlovců a podílí se na regulaci transkripce. Vytváří multimolekulární komplex, který deacetyluje a methyluje histony a váže heterochromatinový protein HP-1, čímž v dané oblasti vznikne heterochromatin, a to v rozsahu 2-3 kilobáze (Senatore et al., 1999). V nepřítomnosti doxycyklinu vazba komplexu tTRKRAB na TetO zablokuje transkripci. Po dodání doxycyklinu dojde k vyvázání tTRKRAB, což umožní zahájení transkripce, produkci shRNA a tedy RNA interferenci.

Tento systém se zdál být plně reverzibilní, ale ukázalo se, že pokud je tTRKRAB navázán během několika prvních dní embryonálního vývoje, vektor je nenávratně umlčen. Tomu se dá předejít tím, že v této kritické době nebude represor přítomen (Szulc et al., 2006). Otázkou je, zda by byl takto indukovatelný systém využitelný pro studium genů v myších oocytech.

4.3. RNA pol II vektory

Pol II řízené vektory představují rychlé a jednoduché řešení pro tkáňově specifickou inaktivaci genu. Pol II vektory se používají k produkci miRNA-like vlásenek, které jsou stejně jako endogenní formy miRNA syntetizovány polymerázou II (Lee et al., 2004). MiRNA-like vlásenka může být exprimována i z pol III promotoru, ale exprese s z pol II promotoru je efektivnější (Dickins et al., 2005). Některé miRNA jsou kódovány v intronech protein kódujících genů (Chung et al., 2006). Toho lze využít ke konstrukci vektoru, kde pol II promotor řídí produkci RNA vlásenky z intronu genu pro marker (Xia et al., 2006, Chung et al., 2006).

Většina pol II promotorem řízených vektorů je založena na studiích lidské miR-30 v laboratoři Briana Cullena. Prekurzor této miRNA obsahuje asi 80 nukleotidů dlouhou vlásenkovou strukturu. Část sekvence může být nahrazena podobně dlouhou sekvencí odpovídající genu, který chceme inaktivovat. Takto vzniklá expresní miR-30 kazeta vložená do intronu za pol II promotor zajistí produkci požadované RNA (Zeng et al., 2005). Aby mohlo dojít ke vzniku funkční siRNA, musí být vlásenka vystěpena z dlouhého transkriptu RNázou Drosha. Proto je třeba zachovat sekvence lemující vlásenku v délce alespoň 50 nt na každé straně. Právě ty totiž obsahují oblasti nutné pro štěpení RNázou Drosha (Chen et al., 2004). Za intronem odpovědným za expresi vlásenky následuje exon kódující markerový

protein např. GFP (Xia et al., 2006). Mikroinjekční aplikace vektoru do oplozeného vajíčka dá vznik trasngenní myši.

Prekurzor miR-30 stejně jako spousta dalších vlásenek netvoří dokonalou helikální strukturu, ale obsahuje místa, kde proti sobě leží nekomplementární nukleotidy. Takovéto nepravidelnosti patrně pomáhají předcházet nespecifickým reakcím jako je interferonová odpověď (Bridge et al., 2003) a je dobré zavádět je i do vlásenky s požadovanou sekvencí. Vlásenka, která se svou strukturou nejvíce podobá původní miRNA, je účinnější než strukturně pozměněná vlásenka (Zhou et al., 2005). Aby vnášené změny neovlivnily RNAi, provádějí se na 5´ koncovém, sense, řetězci (Zeng et al., 2005).

Místo vlásenky odvozené z miR-30 lze použít SIBR kazetou odvozenou z nekódující BIC sekvence (Chung et al., 2006). Zde se ve třetím exonu nachází miR-155, jejíž sekvence byly využity pro tvorbu SIBR kazety. SIBR kazety mohou být exprimovány i z exonu, nicméně jejich exprese z intronu efektivnější. Ještě účinnější je pak vektor, kde sekvence kódující miRNA-like vlásenku leží až ve druhém intronu (Chung et al., 2006).

Čím více SIBR kazet s požadovanou sekvencí se do vektoru vloží, tím silnější bude RNAi efekt. Systém s několika různými SIBR kazetami zároveň umožňuje redukovat expresi více genů a to stejně účinně, jako kdybychom použili více vektorů s jednotlivými kazetami (Chung et al., 2006). Vektor nesoucí SIBR kazety kódující různé miRNA-like homologní k jedné mRNA by mohl snižovat riziko off-target efektů neboť umožňuje snížit množství jednotlivých siRNA navázaných na RISC komplex.

Off-target efekty jsou způsobeny tím, že při vyšší koncentraci se individuální siRNA může začít chovat jako miRNA a způsobit tak nežádoucí represi dalších genů. Použití více různých siRNA při stejné celkové koncentraci proporčně snižuje koncentraci individuálních siRNA a tedy i riziko off-target efektů.

Pol II-kontrolované vektory představují asi nejlepší cestu pro vývoj nové generace vektorů pro transgenní RNAi v myších oocytech, neboť umožňují odstranit technické nedostatky předchozího systému využívajícího dlouhou dsRNA při zachování tkáňově specifické exprese RNA molekul aktivujících RNAi.

5. Závěr

Byla vyvinuta celá řada transgenních systémů indukujících RNAi v savčích buňkách prostřednictvím krátkých i dlouhých vlásenek. Na oocytech byly využívány přednostně systémy exprimující dlouhé vlásenky (typ III). Tkáňově specifický systém exprimující krátkou vlásenku v oocytech dosud vyvinut nebyl. Výhodou transgenní RNAi v myších oocytech prostřednictvím dlouhé vlásenky je vysoká účinnost a absence off-target efektů. Práce s dlouhými invertovanými repeticemi je ovšem komplikovaná a omezená na oocyty a buňky časných embryí. Z těchto důvodů je žádoucí otestovat vektory exprimující krátké vlásenky i na oocytech. Vývoj systému exprimujícího miRNA-like vlásenky v oocytech bude cílem mé diplomové práce.

6. Poděkování

Děkuji svému školiteli Mgr. Petru Svobodovi PhD. za pomoc při shánění informačních zdrojů a hlavně za pochopení, ochotu a velkou trpělivost.

7. Použitá literatura

Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G, Tuschl T: A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277-279 (2003)

Barber GN: Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death Differ*. **5**(2), 113-126 (2001)

Bridge AJ, Pebernard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R: Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nature Genetics* **34**(3), 263-264 (2003)

Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP: MicroRNAs Modulate Hematopoetic Lineage Differentiation. *Science* **303**, 83-86 (2004)

Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, Turner DL: Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acid Research* **34**(7), e53 (2006)

Coumoul X, Shukla V, Li C, Wang RH, Deng CX: Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acid Research* **33**(11), e102 (2005)

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231-235 (2004)

Dickins RA, Hemann MT, Zilfou JT, Simpson DR, Ibarra I, Hannon GJ, Lowe SW: Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nature Genetics* **37**, 1289-1295 (2005)

Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T: RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev***15**, 188-200 (2001)

Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS:Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. *Science* **303**, 238-240 (2004)

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC: Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans. Nature* **391**, 806-811 (1998)

Gebauer F, Richter JD: Synthesis and function of Mos: the control switch of vertebrate oocyte meiosis. *BioEssays* **19**, 23-28 (1997)

Gupta S, Schoer RA, Egan JE, Hannon GJ, Mittal V: Inducible, reversible and stable RNA interference in mammalian cells. *PNAS* **101**(7), 1927-1932 (2004)

Hutvagner G, Zamore PD: A microRNA in a multipleturnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056–2060 (2002).

Karns LR, Kisielewski A, Gulding KM, Seraj JM, Theodorescu D: Manipulation of gene expression by an ecdysone-inducible gene switch in tumor xenografts. *BMC Biotechnol.* **1**, 1-12 (2001)

Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216 (2003)

Kim VN: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 376-385 (2005)

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* **23**, 4051-4060 (2004)

Lee YS, Nakahara K, Pham JW, Kim K, He Z, Sontheimer EJ, Carthew RW: Distinct Roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA Silencing Pathways. *Cell* **117**, 69-81 (2004)

Lingel A, Simon B, Izaurralde E, and Sattler M: Nucleic acid 3_-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 576–577 (2004)

Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ: A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol.* **7**(12), 1261-6 (2005)

Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U: Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* **303**, 95-98 (2004)

Ma J, Zeng F, Schultz RM, Tseng H: Basonuclin: a novel mammalian maternal-effect gene. *Development.* **133**(10), 2053-62 (2006)

McManus MT, Petersen CP, Haines BB, Chen J, Sharp PA: Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **8**, 842-850 (2002)

Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T: Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* **15**, 185-197 (2004)

Mello CC, Conte D: Revealing the world of RNa interference. *Nature* **431**, 338-342 (2004)

Miyagishi M, Taira K: Development and application of siRNA expression vector. *Acid Research Supplement* **2**, 113-114 (2002)

Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC: Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* **18**, 1655-1666 (2004)

Olsen PH, Ambros V: The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev. Biol.* **216**, 671–680 (1999)

Senatore B, Cafieri A, Di Marino I, Rosati M, Di Nocera PP, Grimaldi G: A variety of RNA polymerases II and III-dependent promoter classes is repressed by factors containing the *Krüppel*-associated/finger preceding box of zinc finger proteins. *Gene* **234**, 381-394 (1999)

Shinagawa T, Ishii S: Generation of *Ski*-knockdown mice by expression a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promotor. *Genes Dev.* **17**, 1340-1345 (2003)

Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ, Hannon GJ: Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nature Genetics* **37**, 1281-1288 (2005)

Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 227-264 (1998)

Stein P, Svoboda P, Schultz RM: Transgenic RNAi in mouse oocytes: a simple and fast approach to study gene function. *Dev Biol.* **256**(1), 187-93 (2003)

Stein P, Zeng F, Pan H, Schultz RM: Absence of non-specific effects of RNA interference triggered by long double-stranded RNA in mouse oocytes. *Dev Biol.* **286**(2), 464-71 (2005)

Svoboda P: Long dsRNA and silent genes strike back:RNAi n mouse oocytes and early embryos, *Cytogenet Genome Res* **105**, 22-434 (2004)

Svoboda P, Di Cara A: Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 901-918 (2006)

Svoboda P, Stein P, Hayashi H, Schultz RM: Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* **127**, 4147-4156 (2000)

Svoboda P, Stein P, Schultz RM: RNAi in mouse oocytes and preimplantation embryos: Effectivnes of hairpin dsRNA. *Biochem Biophys Res Commun.* **287**, 1099-1104 (2001)

Szulc J, Wiznerowicz M, Sauvain MO, Trono D, Aebischer P: A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nature Methods* **3**(2), 109-116 (2006)

Van de Wetering M, Oving I, Muncan V, Pon Fong MT, Brantjes H, van Leenen D, Holstege FCP, Brummelkamp TR, Agami R, Clevers H: Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. *EMBO reports* **4**(6), 609-615 (2003)

Ventura A, Meissner A, Dillon CP, McManus M, Sharp PA, Van Parijs L, Jaenisch R, Jacks T: Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**,10380-10385 (2004)

Wang Q, Carmichael GG: Effects of Length and Location on the Cellular Response to Double-Stranded RNA. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68**, 432-452 (2004)

Wianny A, Zernicka-Goetz M: Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat. Cell Biol*. **2**(2), 70-75 (2000)

Xia XG, Zhou H, Samper E, Melov S, Xu Z: Pol II-expressed shRNA knock down *Sod2* gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *PLOS Genetics* **2**(1), 73-80 (2006)

Yang S, Tutton S, Pierce E, Yoon K: Specific double-stranded RNA interference in undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Biol.* **21**(22), 7807-16 (2001)

Yu J, Deng M, Medvedev S, Yang J, Hecht NB, Schultz RM: Transgenic RNAi-mediated reduction of MSY2 in mouse oocytes results in reduced fertility. *Dev Biol.* **268**(1), 195-206 (2004)

Zeng Y, Cai X, Cullen BR: Use of RNA polymerase II to transcribe artificial microRNAs. *Methods in enzymology* **392**, 371-380 (2005)

Zeng Y, Cullen BR: Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acid Research* **32**, 4776-4785 (2004)

Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR: Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Molecular Cell* **9**, 1327-1333 (2002)

Zhou H, Xia XG, Xu Z: An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acid Research* **33**(6), e62 (2005)