

Abstrakt

Dvouvláknová RNA je cizorodá molekula, která se objevuje v buňce buď jako produkt replikace viru nebo vzniká párováním komplementárních RNA, a to v rámci jedné molekuly nebo mezi dvěma molekulami. Komplementární RNA často pocházejí z repetitivních sekvencí. U savců může dvouvláknová RNA vstupovat do jedné ze tří drah: sekvenčně specifického umlčování RNA (RNA silencing), sekvenčně nezávislé interferonové (IFN) odpovědi nebo editace pomocí adenosin deamináz.

Hlavním zaměřením mého PhD projektu bylo detailně zanalyzovat efekty dvouvláknové RNA produkované v savčích buňkách, a to v rámci celého organismu. Za tímto účelem jsme vytvořili konstrukt exprimující dvouvláknovou RNA ve formě mRNA, obsahující dlouhou a perfektně párující vlásenkovitou strukturu.

Transgenní myši, vytvářející dvouvláknovou RNA ve všech buňkách, byly životaschopné a, na rozdíl od výsledků dosavadních studií, neměly aktivovanou IFN odpověď. V somatických buňkách byla dvouvláknová RNA jen málo štěpena na krátké interferující RNA (siRNA), nezpůsobovala transkripční umlčování *in trans* a docházelo k mírné deaminaci adenosinu bez zadržování editované RNA v jádře. Shodné výsledky jsme získali v savčích buňkách, které byly tranzientně transfekovány plazmidem exprimujícím dvouvláknovou RNA. Naproti tomu ve vajíčcích způsobovala dvouvláknová RNA silnou RNA interferenci. Naše výsledky jako první ukazují, že exprimovaná dvouvláknová RNA, na rozdíl od mnoha jiných forem dvouvláknové RNA, je v savčích buňkách dobře tolerována a že myší vajíčka reprezentují zvláštní buněčný typ, ve kterém je dvouvláknová RNA cílena do RNA interferenční dráhy.

Pokusy založené na tranzientní transfekci dále ukázaly, že plazmidy produkující dvouvláknovou RNA tlumí expresi společně transfekovaných reportérových plazmidů, ale pouze minimálně působí na expresi endogenních genů nebo reportérů stabilně začleněných do genomu. K této inhibici pravděpodobně dochází na úrovni iniciace translace a je zprostředkována místní a přechodnou aktivací protein kinázy R. Naše výsledky naznačují, že buňka by mohla být schopna odlišit endogenní mRNA od exogenní a v přítomnosti dvouvláknové RNA tlumit translaci cizí mRNA.

Analýza transkriptomu buněk transfekovaných běžně používanými plazmidy ukázala, že transkripce plazmidů je komplexní a může způsobit vznik dvouvláknové RNA párováním komplementárních úseků transkriptů. Naše výsledky ukazují, že vznik dvouvláknové RNA nelze předpovídat a že přítomnost dvouvláknové RNA v buňce může vést ke špatné interpretaci dat založených na tranzientních transfekcích.