

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Využití RNA interference pro inhibici exprese genu u savců**

*in vivo*

**Jitka Šulcová**

**Školitel: RNDr. Karel Drbal, Ph.D.**

**Praha 2008**

Děkuji svému školiteli RNDr. Karlu Drbalovi, Ph.D. za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat svému příteli Miloslavu Merunkovi za podporu při psaní bakalářské práce.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala sama z uvedené literatury a na základě konzultací se svým školitelem.

Praha 2008.

## Osnova

<b>1</b>	<b>Abstrakt</b> .....	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Abstract</b> .....	<b>4</b>
<b>3</b>	<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>5</b>
<b>4</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>5</b>	<b>„Knock-outované“ (KO) organismy</b> .....	<b>7</b>
5.1	Úvod do historie .....	7
5.2	Klasický postup přípravy knock-out myši.....	8
5.3	Tkáňově specifický a inducibilní KO.....	9
5.4	Problémy a řešení tkáňově specifického a inducibilního KO.....	10
<b>6</b>	<b>RNA interference (RNAi)</b> .....	<b>11</b>
6.1	Úvod do RNAi.....	11
6.2	miRNA – genomová organizace, transkripce a jaderné zpracování.....	12
6.3	Zpracování pre-miRNA a dlouhých dsRNA v cytoplazmě a sestavení RISC.....	13
6.4	Funkce RISC .....	14
6.5	Tkáňově specifický a inducibilní knock-down.....	15
6.6	Problémy a řešení RNAi experimentů.....	16
6.6.1	Sekvenčně nezávislé „off-target“ efekty .....	16
6.6.2	Sekvenčně závislé „off-target“ efekty .....	17
6.6.3	Specifita RNAi experimentů.....	18
<b>7</b>	<b>RNAi <i>in vivo</i></b> .....	<b>18</b>
7.1	Krátkodobý knock-down <i>in vivo</i> .....	19
7.2	Dlouhodobý knock-down .....	20
7.2.1	Systémy využívající RNA polymerázu III.....	23
7.2.1.1	Knock-down ES buněk a vznik chimerních myši.....	23
7.2.1.2	Vznik transgenních myši s RNAi.....	23
7.2.1.3	Knock-down hematopoetických kmenových buněk .....	26
7.2.1.4	Knock-down u dospělých zvířat .....	27
7.2.1.5	Inducibilní knock-down .....	28
7.2.2	Systémy využívající RNA polymerázu II.....	31
7.2.2.1	Transgenní myši.....	31
7.2.2.2	Knock-down v dospělých zvířatech.....	32
7.2.2.3	Inducibilní knock-down .....	33
<b>8</b>	<b>RNAi knihovny</b> .....	<b>34</b>
<b>9</b>	<b>Lidská terapie</b> .....	<b>35</b>
<b>10</b>	<b>Závěr</b> .....	<b>35</b>
<b>11</b>	<b>Použitá literatura</b> .....	<b>37</b>

## 1 Abstrakt

Knock-out (KO) a RNA interference (RNAi) jsou zavedené metody, které umožňují systematickou analýzu funkce genů a jejich exprese. Zatímco KO je spíše neflexibilní metoda, která vede k cílené delecii genu pomocí homologní rekombinace na úrovni DNA, RNAi inhibuje expresi genů na úrovni transkripční i posttranskripční a nechává gen neporušený. Tento evolučně konzervovaný systém umlčení genové exprese využívá krátkých dvouřetězcových RNA, které cílí požadovaný gen na základě své sekvenční komplementarity. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o využití RNAi *in vivo* u savců, a to v klasickém i inducibilním systému. Důraz je kladen na efektivitu ztráty genové exprese při studiu funkce genů v transgenních zvířatech i v konkrétních somatických buněčných typech. Účinný a specifický knock-down (KD) byl dosažen za použití syntetických siRNA (small interfering RNA) pro krátkodobý KD a integrovaných shRNA (short hairpin RNA) či miR-shRNA (microRNA-based shRNA) pro dlouhodobý KD. Organismy s KO letálním fenotypem lze připravit pomocí inducibilních KD systémů (Cre/loxP nebo tet), které nezahlcují RNAi dráhu během vývoje a zabraňují vzájemné kompenzaci genových produktů. Tet inducibilní systém je navíc reverzibilní, tj. umožňuje zapínat a vypínat expresi vlásenek dle přítomnosti induktoru. Použití vektorů obsahujících více vlásenek proti stejnému genu, resp. proti různým genům, vede ještě k větší efektivitě KD, resp. KD několika genů současně. Vedle náhodné integrace konstruktů do genomu použitím klasických metod transgeneze, hlavně lentivirovou infekcí, je slibnou metodou cílená integrace konstruktů do definovaného lokusu v genomu např. *Rosa26* či *Hprt* a takový KD je stabilní a dobře reprodukovatelný. Navíc při použití RMCE strategie společně s tetraploidní agregací lze vytvořit transgenní zvířata s vysoce účinným KD už za 3 měsíce oproti KO metodě, která trvá v průměru 12 a více měsíců. RNAi je dnes dostatečně účinnou a zároveň rychlou metodou, kterou je možné zkoumat funkce genů a zahajuje novou éru v základním výzkumu a lidské terapii.

## Klíčová slova

Knock-out (KO), RNA interference (RNAi), knock-down (KD), inducibilní KD, siRNA, shRNA, miR-shRNA, Cre rekombináza, tetracyklinový represor (tetR).

## 2 Abstract

Knock-out (KO) and RNA interference (RNAi) are established methods that allow a systematic analysis of gene expression and function. While KO is a rather non-flexible method leading to fixed gene deletion via homologous recombination on the level of DNA, RNAi inhibits the gene expression on transcriptional and post-transcriptional levels leaving the gene itself unaffected. This evolutionary conserved system of gene expression silencing employs short double stranded RNAs that target the genes of interest in a sequence-specific manner. This thesis summarizes the current knowledge about RNAi for *in vivo* application in mammals in both stable and inducible systems. Major emphasis is put on *in vivo* loss-of-function efficiency in transgenic animals as well as in specific somatic cell types. Effective and specific knock-down (KD) is mediated either by the use of synthetic siRNAs (short interfering RNAs) for short-term KD or by host genome integrated shRNAs (short hairpin RNAs) or miR-shRNAs (microRNA-based shRNAs) for long-term KD. Cre/loxP or tetracycline (tet) inducible KD allows to produce phenotypes that are lethal in other circumstances, does not overload RNAi pathway during the specific developmental stages and avoids mutual compensation effects of other gene products. The tet KD is reversible i.e. allows to switch on and off the expression of hairpins depending on the presence of an inductor. The use of the polycistronic vectors containing more hairpins directed to the same gene or different genes leads to even more efficient KD or KD of multiple genes at the same time. Lentiviral infection is the widely used traditional method of random transgenesis. Novel methods of transgenesis based on site-directed integration into host genome such as *Rosa26* or *Hprt* loci lead to more reproducible expression and stable KD. Moreover, RMCE strategy together with tetraploid aggregation enable the generation of RNAi transgenic mice with highly specific KD within 3 months in comparison to classic KO lasting 12 and more months on average. In summary, RNAi technology is currently an effective and fast method for gene function study and has started new era in both basic research and human therapy.

## Keywords

Knock-out (KO), RNA interference (RNAi), knock-down (KD), inducible KD, siRNA, shRNA, miR-shRNA, Cre recombinase, tetracyclin repressor (tetR).

### 3 Seznam zkratek

3' UTR	3' nepřekládaná oblast
CMV promotor	cytomegalovirus promotor
dsRNA	dvouřetězcová RNA
EGFP	enhanced green fluorescent protein
ES buňky	embryonální kmenové buňky
GFP	green fluorescent protein
<i>Hprt</i> lokus	hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase lokus
HS buňky	hematopoetické kmenové buňky
IFN odpověď	interferonová odpověď
KD	knock-down
KO	knock-out
Lucifer	luciferáza
MAR	matrix attachment region
miRNA	microRNA
miR-shRNA	microRNA-based shRNA
MOI	multiplicity of infection
nt	nukleotidy
ORF	open reading frame = čtecí rámec genu
PTGS	posttranskripční genové umlčení
RISC	RNA-induced silencing complex
RMCE strategie	recombinase mediated cassette exchange strategie
RNA pol II	RNA polymeráza II
RNA pol III	RNA polymeráza III
RNAi	RNA interference
rtetR	reverzní tetracyklinový represor
SAR	scaffold attachment region
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
tetO	tetracyklinový operon
tetR	tetracyklinový represor
TGS	transkripční genové umlčení
wt	wild type = divoký fenotyp

## 4 Úvod

Studium funkce genů *in vivo* bylo dlouhou dobu omezeno a to díky nedokonalým technologiím neumožňujícím účinnou cílenou mutaci genů. Vědci tak byli při studiu funkce genů odkázáni na sledování účinků náhodných změn v DNA vlivem přirozených mutací či mutací způsobených aplikací mutagenních látek. Cílená mutageneze čili funkční inaktivace jakéhokoliv vybraného genu pomocí metody „gene targeting“, tzv. knock-out (KO), zcela změnila možnosti zkoumání funkce genů. Další revolucí v tomto směru byl objev RNA interference (RNAi), která spočívá ve specifickém snížení exprese vybraného genu, tzv. knock-down (KD), jako rychlé alternativy klasického „gene targeting“ postupu. O významu obou metod svědčí fakt, že v roce 2006 byla udělena Nobelova cena za objev RNAi a v roce 2007 za objev dřívější „gene targeting“.

„Gene targeting“ je dnes běžně využívanou metodou, která dává vzniknout knock-out (KO) organismům, tj. organismům deficitním pro daný gen, jehož funkce je předmětem zkoumání, a která umožňuje studovat roli specifických genů, resp. jejich produktů, v embryonálním vývoji, fyziologických a patologických procesech a stárnutí. Vedle nesporně univerzální možnosti „gene targeting“ metody cíleně modifikovat téměř jakýkoliv gen, je určitou nevýhodou její komplikovanost (je nutný unikátní přístup k vyřazení každého jednotlivého genu), neflexibilita, dlouhá doba přípravy (kolem 1 roku) a v neposlední řadě i finanční náročnost (dnes komerčně dostupná služba – cca 20000 EUR/KO zvíře).

Proto objev RNAi mechanismu, který dává vzniknout knock-down (KD) organismům, tj. organismům se sníženou expresí specifického genu, vedl k možnosti použití RNAi místo klasického KO. RNAi má oproti klasické KO metodě řadu výhod, ovšem i nevýhod. Je to metoda méně komplikovaná, rychlá i podstatně levnější. Umožňuje inhibovat expresi jakéhokoliv transkripčně aktivního genu a je flexibilní, tj. exprese interferujících RNA se při použití inducibilních systémů může zapínat a vypínat. Velkým přínosem RNAi je její schopnost vytvořit odstupňovaný KD, což umožňuje studium dominantně dědičných poruch, zatímco KO metoda vytváří zvířata jen s 0% (u homozygotních jedinců) či 50% expresí genu (u heterozygotních jedinců). Vektory nesoucí několik různých interferujících RNA současně umožňují inhibici exprese více genů současně. RNAi metoda pomohla vytvořit transgenní zvířata u savců, kde klasické techniky reverzní genetiky jsou velice omezené (krysa, koza a další). Velkou výhodou je možnost její aplikace v lidské terapii, kde KO metoda není eticky možná. Nevýhodou RNAi je však nemožnost docílit 100% snížení exprese genu jako je tomu u KO, avšak řada experimentů s drobnými rozdíly zopakovala KO fenotyp a zdá se, že použití vektorů nesoucích více interferujících RNA proti totožné mRNA může tento problém vyřešit. Další nevýhodou RNAi je řada možných „off-target“ efektů, ať již sekvenčně specifických či nespecifických, kterých se lze částečně vyvarovat optimálním výběrem účinné sekvence a nastavením experimentálních podmínek. Všechny interferující RNA se proto nejdříve experimentálně ověřují *in vitro*, jelikož účinnost KD je velmi individuální a nelze ji předem určit.

RNAi je dnes běžně používanou metodou *in vitro*, avšak její *in vivo* aplikace je stále ještě omezená. Účelem této bakalářské práce je shrnout dosavadní poznatky o aplikaci RNAi *in vivo* u savců. Ve své práci se zabývám experimentálním myším modelem. Popisuji aplikace a efektivnost siRNA pro krátkodobý KD a shRNA, miR-shRNA integrovaných do genomu pro dlouhodobý KD. Rutinně lze dosáhnout vysoce účinného KD na úrovni celého organismu i ve specifických tkáních. V dnešní době se na přípravu RNAi transgenních zvířat převážně používá injekce do prvojádra či infekce lentiviry, které však ústí v náhodnou integraci vektorů způsobující individuální expresní profil interferujících RNA. Integrace a exprese shRNA/miR-shRNA z předem definovaného a všudypřítomně transkripčně aktivního *Rosa26* či *Hprt* lokusu vede ke stejné účinnému KD jako je KD dosažený klasickými metodami a navíc je tento KD reprodukovatelný několika nezávislými experimenty. Rovněž zavedení S/MAR do blízkosti promotorů řídicích expresi interferujících RNA je slibnou možností pro získání stabilnějšího KD. Inducibilní KD pomocí Cre/loxP systému či tetracyklinového (tet) systému umožňuje přípravu organismů s KO letálním fenotypem, nezatěžuje RNAi dráhu během vývoje, zabraňuje vzájemné kompenzaci mezi geny a v případě tet systému je tento KD reverzibilní. Existence vektorů nesoucích několik shRNA/miR-shRNA umožňuje mnohem efektivnější KD či KD několika různých genů zároveň. RNAi je tedy dostatečně účinnou, specifickou a rychlou metodou s řadou aplikací pro studium funkce genů *in vivo*.

## 5 „Knock-outované“ (KO) organismy

### 5.1 Úvod do historie

Mario R. Capecchi, Martin J. Evans a Oliver Smithies obdrželi v říjnu 2007 Nobelovu cenu v oblasti fyziologie nebo medicíny za objev "Principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells". Ukázali, že embryonální kmenové (ES) buňky mohou být specificky geneticky upraveny a poté injikovány do myší blastocysty za účelem vytvoření potomstva, které bude mít změny v DNA neseny v zárodečných buňkách, a tyto budou předávány na další generace.

Tento nový nástroj otevřel dveře neuvěřitelně mocné technologii dnes známé pod pojmem „gene targeting“, která dává vzniknout KO organismům. Kombinací metod „gene-targeting“ (cílený KO) a „gene-trap“ (náhodný KO) (Zambrowicz et al., 1998) je dnes vytvořeno a publikováno přibližně 11 000 KO myší, avšak z toho je klasických cílených KO jen 3200. Navíc většina těchto myší není veřejně dostupná (přibližně jen 740 cílených KO myší je uloženo v „International Mouse Strain Resource“ (IMSR)<sup>1</sup>), jelikož byly vytvořeny v nespolupracujících laboratořích či z komerčního účelu. Z tohoto důvodu bylo vytvořeno „The International Mouse

---

<sup>1</sup> IMSR je dostupná na <http://www.informatics.jax.org/imsr/index.jsp>



Knockout Consortium“ (IKMC), které sdružuje světové agentury a jejich programy<sup>2</sup> a které se zavázalo vytvořit konstitutivní, kondiciované i reporterové KO myši pro všechny protein-kódující geny, které jsou klonovatelné. Tyto myši budou dostupné celé vědecké veřejnosti, aby se tím urychlilo studium funkce jednotlivých genů (Collins et al., 2007a; Collins et al., 2007b). Alternativou klasického „gene targeting“ jsou BAC vektory, které umožňují cílený KO či různé mutace rozsáhlých sekvencí až do velikosti 70 kbp bez standardní složité přípravy dedikovaných cílících vektorů (Valenzuela et al., 2003). Náhodné KO myši mohou vznikat ve velkém rozsahu i chemickou mutagenézí (Hrabe de Angelis et al., 2000), avšak kvůli náročnosti následné identifikace vyřazeného genu se dnes tato metoda široce nepoužívá. Nicméně s rozvojem nových celogenomových sekvenčních technik může dojít k jejímu oživení.

Alternativu ke KO představuje knock-in, kdy je původní gen pomocí homologní rekombinace nahrazen mutovaným nebo jiným genem. Tím je vnesený gen vložen pod promotor a regulační sekvence původního genu, je exprimován místo něho a není tak vystaven pozičním efektům náhodné integrace. Vnesený gen bývá nejčastěji původní pozměněný gen či jeho paralog, ale může to být i úplně cizí gen, např. reportérový *LacZ* či *GFP*, který pomáhá určit expresní profil původního genu v organismu či osud modifikovaných buněk letálního fenotypu (tzv. reportérový KO) (Cohen-Tannoudji a Babinet, 1998).

V následujících kapitolách se budu výhradně zabývat vytvořením cíleného KO, jelikož tato metoda poskytuje 100% inhibici exprese cílového genu (delece na úrovni genomu). Metoda „gene trap“ oproti tomu inhibuje expresi na transkripční úrovni (změnou sestřihu mRNA), a tak nemusí dojít vždy ke 100% inhibici exprese genu<sup>3</sup>.

## 5.2 Klasický postup přípravy knock-out myší

KO myši jsou připravovány ve 2 etapách:

ES buňky jsou transfekovány vektorem obsahujícím nefunkční alelu cíleného genu díky vloženému genu pro antibiotikum pro pozitivní selekci ES buněk. Vně ramének pro homologní rekombinaci vektor nese virovou sekvenci (HSV-tk) pro negativní selekci ES buněk, ve kterých se vektor integroval náhodně, tudíž celý a tyto ES nejsou schopné žít na mediu s antivirovou substancí (ganciklovir). Na plotně s antibiotikem a antivirovou substancí tedy vyrostou pouze ES buňky geneticky modifikované pomocí homologní rekombinace (většinou méně než 0,1-1% všech ES buněk).

---

<sup>2</sup> Agentura NIH s programem KOMP: <http://www.knockoutmouse.org>;

Agentura EC s programem EUCOMM: <http://www.eucomm.org>;

Agentura Genome Canada s programem NorCOMM: <http://norcomm.phenogenomics.ca/index.htm>;

Texas institute for genomic medicine: <http://www.tigm.org>

<sup>3</sup> Více informací na <http://www.genetrap.org/>

V druhé etapě jsou ES buňky heterozygotní pro daný gen (frekvence homologní rekombinace na obou alelách současně je 0,0001-0,01%) injikovány do recipientní blastocysty a přeneseny do náhradní matky. Vzniklé chimerní myši se zpětně kříží s homozygotními myšmi, aby se určilo, zda je mutace inkorporována do pohlavních buněk. Část potomků je opět heterozygotní pro danou genetickou modifikaci a tito potomci se mezi sebou navzájem dále kříží. Dle Mendelových zákonů dědičnosti poté vznikají vedle normálních (wild type) potomků bez modifikací a heterozygotů i homozygotní myši, které mají modifikované obě dvě alely příslušného genu, a to v poměru 1:2:1.

Alternativní metodou přípravy KO myši je tzv. tetraploidní agregace, při které vznikají chimerní embrya, jež mají téměř striktně rozdělené populace buněk. Zatímco z tetraploidního embrya vzniká pouze trofoblast a entoderm žloutkového váčku, z KO ES buněk vzniká celé embryo a mezoderm žloutkového váčku. Tato metoda je mnohem rychlejší než klasická příprava KO, jelikož není nutná selekce chimerních zvířat s cílenou alelou v zárodečných buňkách. Nevýhodou je fakt, že tato metoda pracuje pouze s některými hybridními ES buňkami a vysoké procento embryí je nespécificky letálních či abnormálních.

V poslední době se objevila další alternativa přípravy transgenních myši, která spočívá v laserem asistovaném vpíchnutí libovolných rekombinantních ES buněk do 8-buněčného embrya. Takto připravená zvířata vznikají pouze z ES buněk, jsou minimálními chimérami (0,1% oproti 2% při tetraploidní agregaci), jsou plně zdravá a vnesený gen je 100% dědičný (Poueymirou et al., 2007).

### 5.3 Tkáňově specifický a inducibilní KO

KO životně důležitých genů většinou vede k letálnímu fenotypu či arteficiálně vývojově defektnímu organismu v mnoha irelevantních tkáních, přičemž nás primárně zajímá pouze KO fenotyp v určité tkáni. Tato limitace byla překonána s objevem místně-specifických rekombináz: Cre rekombinázy z bakteriofágu P1, která rozpoznává místa ohraničená *loxP* sekvencemi, a Flp rekombinázy z *S.cerevisiae*, která rozeznává *FRT* místa (Cohen-Tannoudji and Babinet, 1998). Díky těmto rekombinázám byla vymyšlena metoda tkáňově specifického a inducibilního KO. Tato metoda je založena na principu aktivace rekombinázy, která je přepisována pod specifickým promotorem a dokáže vyštěpit jen určitý gen ohraničený rekombinačními místy. Takový promotor může být tkáňově specifický a pak vzniká tkáňově specifický KO, kdy je rekombináza exprimována konstitutivně pouze v určité tkáni. Druhou možností je inducibilní KO, při kterém dojde k expresi rekombinázy ve všech tkáních, kde je vnesen *Cre* gen, pouze po expozici specifické látky (tzv. induktor).

Tkáňově specifický či inducibilní KO vzniká v několika krocích. V prvním kroku si musíme vytvořit pomocí homologní rekombinace homozygotní *loxP* myš, ve které všechny buňky mají 2 *loxP* místa vložena do intronů okolo důležitého exonu zacíleného genu. V druhém kroku si připravíme transgenní *Cre* myš, která je homozygotní pro *Cre* gen pod specifickým promotorem. Jelikož jsou však

tyto Cre transgenní myši běžně dostupné, můžeme tento experimentální krok vynechat. Zkřížením loxP myši s Cre myši vznikají potomci loxP-Cre, u kterých probíhá rekombinace mezi *loxP* místy ve všech buněčných typech, kde dochází k expresi Cre rekombinázy. Aktivita rekombinázy je limitujícím faktorem pro účinný KO a nemusí vždy dostačovat pro 100% efekt. Proto se Cre myši nebo loxP-Cre myši kříží s myšmi heterozygotními pro cílený gen (úplný KO jedné alely), což ve výsledku vede k úplné ztrátě funkce daného genu. Díky použití tkáňově specifických promotorů mohou být studovány efekty KO různých genů v různých tkáních.

Existuje mnoho inducibilních systémů využívající k aktivaci antibiotika, signalizační molekuly, metabolicky aktivní látky, různé malé molekuly (např. dimerizery) a jiné látky. Dnes se nejčastěji používají tetracyklinové induktory. Inducibilní promotor pro rekombinázu funguje ve dvou systémech: tet-on (transkripce genu běží pouze v přítomnosti induktoru) a tet-off (transkripce neběží v přítomnosti induktoru). V promotoru se nachází jedno či více *tetO* vazebných míst pro tetracyklinový represor (tetR), který se v nepřítomnosti induktoru váže na promotor a fyzicky tak blokuje transkripci Cre rekombinázy. Po přidání tetracyklinu se represor uvolní, Cre rekombináza je exprimovaná a KO proběhne ve všech tkáních, kde je *Cre* gen přítomen. Obráceně působí reverzní tetracyklinový represor (rtetR), který se váže na promotor a blokuje transkripci až po přidání induktoru.

Oba výše zmíněné kondiciované postupy je možné kombinovat pro přípravu tkáňově specifického inducibilního KO. Ten je založen na vzniku fúzního proteinu z Cre rekombinázy a ligand-vázající domény steroidního receptoru. Takový fúzní protein je exprimován ve specifické tkáni, avšak je inaktivní. Teprve po přidání ligandu, který se váže na protein, a tím mění jeho konformaci, se aktivuje Cre rekombinázová aktivita (Babinet and Cohen-Tannoudji, 2001).

## 5.4 Problémy a řešení tkáňově specifického a inducibilního KO

Díky limitované aktivitě Cre rekombinázy se vytvoření kondiciovaného KO musí řídit následujícími pravidly (Cohen-Tannoudji a Babinet, 1998): 1) exon, který je ohraničen *loxP* místy, musí zůstat funkční, 2) exprese Cre rekombinázy musí být přísně kontrolována, tj. omezena jen na určité buňky nebo tkáň a 3) Cre rekombináza musí být schopná vyrekombinovat daný exon ve všech buňkách dané tkáně.

Nejpoužívanějším řešením je integrace konstruktů obsahující *Cre* gen pod expresí specifického promotoru náhodně do genomu, ale v tomto případě je *Cre* gen vystaven pozičnímu efektu. Druhou možností je knock-in *Cre* genu do jedné alely endogenního genu se specifickou expresí v daném typu buněk, která je však komplikovanější (Cohen-Tannoudji a Babinet, 1998).

Hlavním problémem inducibilních systémů závislých na represoru je nekompletní stérická represe transkripce, a tak může docházet ke slabé expresi i v neindukovaném stavu. Pro překonání této komplikace se do promotoru vkládá více *tetO* sekvencí. Nevýhodou takové multiplikace je fakt, že se promotor oslabí a nepřitahuje tak efektivně RNA polymerázu. Přičemž platí, že čím více vložených

*tetO* míst, tím více dochází k oslabení jeho aktivity (Zhang et al., 2007). Další možností je zvýšit expresi samotného represoru tetR (Zhang et al., 2007) či použití fúzního proteinu složeného z DNA vazebné domény tetR a domény ovlivňující transkripci. Tento protein může mít na transkripci pozitivní vliv, tj. pomáhat sestavení iniciačního komplexu, tzv. tet-transkripční aktivátor (tTA), resp. reverzní transkripční aktivátor (rtTA) (Babinet and Cohen-Tannoudji, 2001), či negativní vliv, tj. transkripci blokovat, např. tTRKRAB fúzní protein (Szulc et al., 2006).

## 6 RNA interference (RNAi)

### 6.1 Úvod do RNAi

V roce 2006 byla udělena Nobelova cena v oblasti fyziologie a medicíny za objev “RNA interference – gene silencing by double-stranded RNA“ Andrew Z. Firovi a Craigu C. Mellovi. Tito laureáti ukázali, že krátké dvouřetězcové RNA (dsRNA) jsou v *C. elegans* schopné umlčovat geny na základě své sekvenční komplementarity procesem zvaným RNA interference (RNAi). Tento objev otevřel možnost využití této metody jako alternativy ke klasickému KO. Zároveň vzbudil zájem o pochopení jejího mechanismu a určení procesů, kterých se v organismu účastní. Zjistilo se, že dsRNA molekuly syntetizované uvnitř buňky, tzv. microRNA (miRNA), mohou snížit či dokonce zrušit expresi endogenních genů a jejich správná funkce je nutná nejen při vývoji organismu a diferenciaci buněk, ale také pro udržení fyziologických funkcí buněk a tkání. V různých organismech zprostředkovávají interferující RNA rezistenci vůči exogenním patogenním virům a brání množení parazitickým mobilním genetickým elementům uvnitř genomu.

Dnes je známo, že efektorový komplex RNAi, tzv. RISC (RNA-induced silencing complex), může kontrolovat genovou expresi na úrovni transkripční, tzv. transkripční genové umlčení (TGS), nebo na postranskripční úrovni, tzv. post-transkripční genové umlčení (PTGS).

Transkripční genové umlčení bylo poprvé pozorováno u rostlin, ale od té doby byla jeho funkce prokázána u *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* a také u savců. TGS je způsobeno jedním řetězcem siRNA, tzv. „guide“ řetězcem, který je zainkorporován do chromatin remodelačního komplexu a který ho cílí do promotorových oblastí dle své komplementarity. Toto cílení způsobí metylaci cytosinů a histonů v promotorových oblastech a následnou tvorbu heterochromatinu a umlčení genu komplementárního k danému „guide“ řetězci.

Post-transkripční genové umlčení bylo pozorováno u všech známých organismů. První dráhou PTGS je sekvenčně specifická degradace cílových mRNA pomocí k nim zcela komplementárních siRNA. Tato dráha je nejčastěji používaná KD metodou, ve které se využívá transfekovaných syntetických siRNA pro krátkodobý KD nebo vektorů kódujících vlásenky shRNA/miR-shRNA pro dlouhodobý KD. shRNA jsou vlastně siRNA, jejichž řetězce jsou spojeny smyčkou. miR-shRNA mimikují strukturu prekurzorů miRNA, tzv. pri-miRNA, a jsou tudíž zpracovávány stejnou dráhou

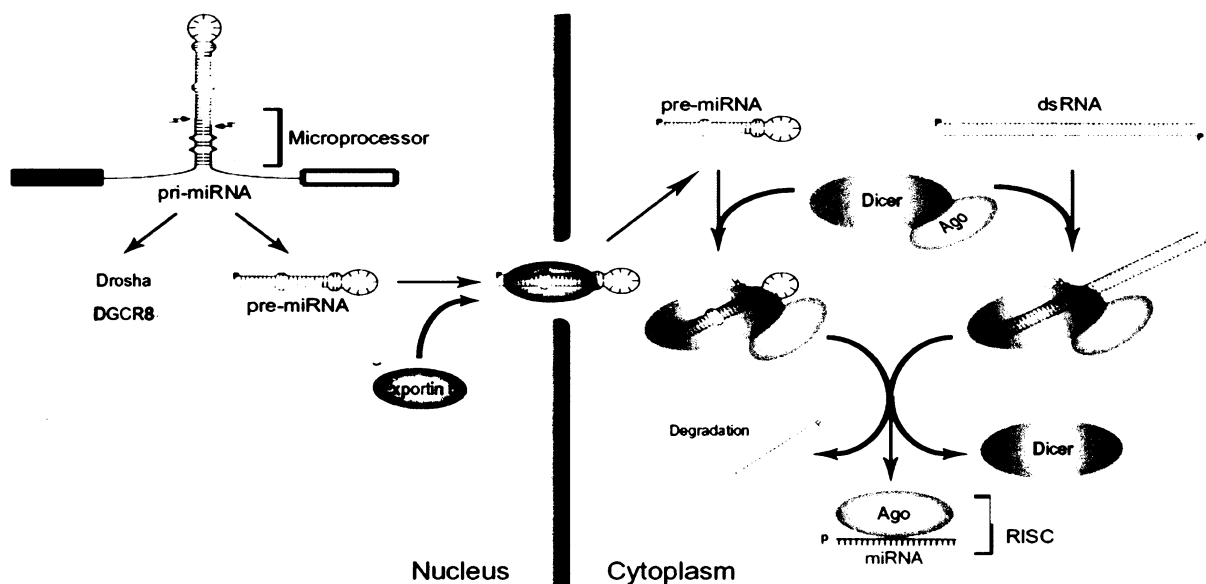
jako endogenní miRNA, ale štěpí cílové mRNA shodně jako siRNA. Alternativní dráhou PTGS je pouhá blokáce translace a regulace stability mRNA, nikoliv tedy degradace cílové mRNA, pomocí pouze částečně komplementárních miRNA. U savců existuje jediný RISC a o PTGS způsobu umlčení genové exprese tedy rozhoduje pouze komplementarita mezi „guide“ řetězcem a cílovými mRNA, nezáleží tedy na původu krátkých dsRNA.

## 6.2 miRNA – genomová organizace, transkripce a jaderné zpracování

miRNA jsou endogenní regulační RNA molekuly, které regulují nejméně 30% protein-kódujících genů (Martin and Caplen, 2007).

Většina genů pro miRNA je přepisována RNA polymerázou II. Primární transkripty miRNA se nazývají pri-miRNA. Mnoho genů pro miRNA se vyskytuje na chromozomech vedle sebe a přepisují se jako polycistronní transkripty. Velký počet savčích miRNA leží v intronech protein-kódujících genů a mají tedy stejnou regulaci transkripce jako dotyčné proteiny (Liu et al., 2008).

Typická monocistronní pri-miRNA je tvořena vlásenkou sestávající se z 33 nt dlouhého dvouřetězcového úseku s terminální smyčkou a dvou nestrukturovaných jednořetězcových konců. Tento primární transkript je v jádře rozpoznán multiproteinovým komplexem. Hlavními komponentami tohoto komplexu jsou dsRNA vázající protein DGCR8 a RNáza III Drosha. DGCR8 váže pri-miRNA a přivádí je do blízkosti RNázy Drosha, která štípe dvouřetězcový úsek pri-miRNA a tvoří tak 70 nt pre-miRNA s dvouřetězcovým úsekem a smyčkou (Liu et al., 2008) (viz Obr. 1).



Obr. 1: miRNA dráha (převzato z Liu et al., 2008)

Hotové pre-miRNA jsou exportovány z jádra do cytoplasmy k dalšímu zpracování pomocí RanGTP a exportinu-5 (Exp-5). V cytoplasmě je RanGTP hydrolyzován na RanGDP, což způsobí jeho disociaci společně s Exp-5 od pre-miRNA. V Exp-5 KD pokusu byly snižené koncentrace pre-

miRNA nejen v cytoplazmě, ale i v jádře. Z toho vyplývá, že Exp-5 je důležitý i pro stabilitu pre-miRNA v jádře a jejich ochranu před degradací (Liu et al., 2008).

### **6.3 Zpracování pre-miRNA a dlouhých dsRNA v cytoplazmě a sestavení RISC**

V cytoplazmě jsou pre-miRNA rozpoznávány další RNázou III zvanou Dicer, která je štípe na zralé 22 nt dlouhé miRNA s 3' koncovými 2 nt přesahy. Zároveň je Dicer schopen vázat i dlouhé dsRNA a štěpit je na 21-23 nt dlouhé siRNA rovněž s 3' koncovými 2 nt přesahy (Liu et al., 2008) (viz Obr. 1).

Samotný Dicer se sestává z několika domén. Nejdůležitější je PAZ doména, která rozpoznává 3' koncové 2 nt přesahy pre-miRNA a dsRNA-vázací doména, která váže dlouhé dsRNA (Liu et al., 2008). Aktivními doménami Diceru jsou dvě RNázové domény, jejichž každé nezávislé katalytické místo štěpí jeden řetězec pre-miRNA/dlouhé dsRNA a to přesně 22nt od 3' konce a tvoří tak 3' koncové 2 nt přesahy (Filipowicz et al., 2005). V případě dlouhých dsRNA se proces může několikrát opakovat a vytvořit mnoho funkčních siRNA.

Dicer v cytoplazmě interaguje s TRBP a pomáhá navázání „guide“ řetězce miRNA/siRNA na enzymatický aparát RNAi RISC (Tolia and Joshua-Tor, 2007). TRBP slouží jako senzor stability, který rozpozná 5' konec s větší termodynamickou stabilitou párování bází a váže se na něj, zatímco Dicer se váže na opačný konec. Zdá se, že výběr „guide“ řetězce je závislý právě na termodynamické stabilitě párování bází na 5' konci. „Guide“ řetězec, který má menší stabilitu, je zabudován do zralého RISC, zatímco druhý, tzv. „passenger“ řetězec, je degradován. Během vazby siRNA/miRNA na Argonaut protein (Ago) dochází k disociaci „passenger“ řetězce od „guide“ řetězce 2 způsoby (Tolia a Joshua-Tor, 2007). První, tzv. „passenger strand cleavage mechanism“, zahrnuje přenos celé dvouřetězcové siRNA/miRNA na Ago, následné štěpení „passenger“ řetězce Ago proteinem a disociaci rozštěpeného řetězce od „guide“ řetězce. Druhý, tzv. „bypass mechanism“, jehož mechanismus zatím není přesně znám, předpokládá existenci helikázy, která rozdělí dvouřetězcové siRNA/miRNA od sebe a na Ago se váže už jen „guide“ řetězec. První způsob využívají siRNA/miRNA, které se vážou na enzymově aktivní Ago jako je Ago2, druhý využívají miRNA vážící se na neaktivní Ago (Preall a Sontheimer, 2005).

Složení RISC je u savců společné pro miRNA i siRNA. Funkční RISC byl izolován v různých formách o různých velikostech a komponentách (Filipowicz et al., 2005). Rozdíl může spočívat v použití rozdílných buněk pro izolaci či v rozdílných technikách izolace RISC nebo v obojím. Minimální aktivní RISC je složen z jednoho člena proteinové rodiny Argonaut a „guide“ řetězce miRNA/siRNA (Filipowicz et al., 2005). Nedávno však byl izolován lidský RISC, který se skládal z Diceru, TRBP a Ago2. Tento komplex byl desetinásobně efektivnější v umlčování genů díky štěpení pre-miRNA než při použití už krátkých hotových siRNA (Preall and Sontheimer, 2005). To dokazuje, že nejmenší dostatečně efektivní RISC se patrně skládá z Diceru, TRBP a Ago2 s navázanou „guide“ RNA.

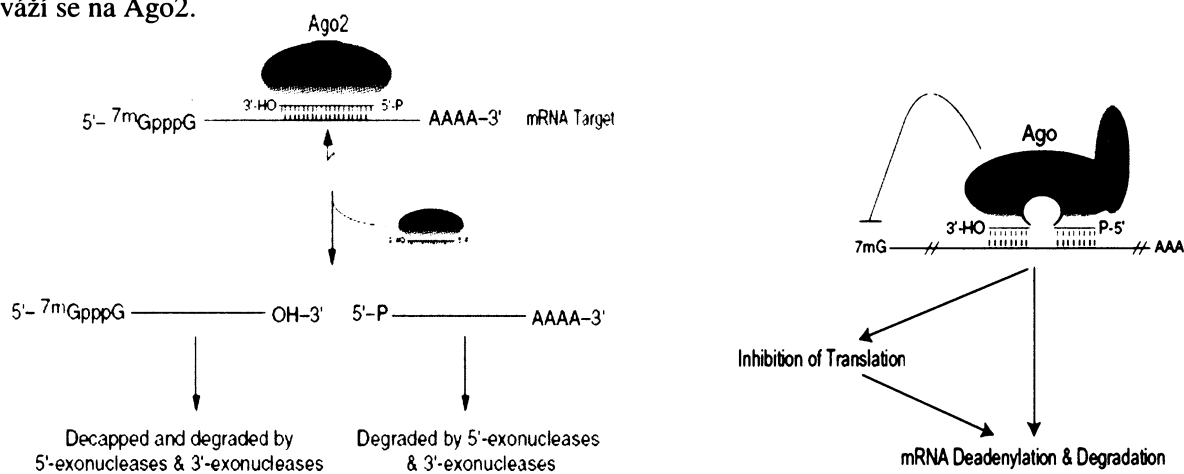
Argonaut protein (Ago) má endonukleázovou aktivitu a je štěpící komponentou RISC. Všechny Ago se skládají ze 4 domén: N-koncové, PAZ domény, střední domény a PIWI domény. PAZ doména stejně jako u Diceru rozpoznává 3' koncové 2 nt přesahy siRNA/miRNA a váže je nezávisle na sekvenci. Střední doména svými aminokyselinovými zbytky interaguje s bází a fosfátem na 5' konci siRNA/miRNA prostřednictvím iontových interakcí. PIWI doména má strukturu i funkci podobnou RNáze H, avšak konzervovaným funkčním motivem je zde Asp-Asp-His, který je zodpovědný za štěpení specifických mRNA komplexem RISC. Tento konzervovaný motiv může částečně vysvětlit rozdílné aktivity Ago proteinů. Jakékoliv mutace v tomto motivu mohou vést ke ztrátě endonukleázové aktivity (Tolia a Joshua-Tor, 2007).

## 6.4 Funkce RISC

SiRNA a miRNA mají odlišné mechanismy umlčení genů v závislosti na míře komplementarity bází mezi „guide“ řetězcem a cílovými mRNA a na povaze Ago uvnitř RISC.

Všechny siRNA jsou zcela komplementární k cílovým mRNA a jsou navázány na enzymaticky aktivní Ago2. Po navázání RISC na příslušnou mRNA způsobí Ago2 její rozštěpení mezi 10. a 11. nt od 5' konce „guide“ řetězce, zatímco „guide“ řetězec zůstane neporušen a může navést RISC na další cílovou mRNA. Jednou složený aktivní RISC může tedy rozštípat několik desítek cílových mRNA. Při štěpení mRNA vznikají 5' fosfátové a 3' hydroxylové konce, které jsou rozpoznány exonukleázami, což vede k následné degradaci cílových mRNA (Liu et al., 2008) (viz Obr. 2 vlevo).

Většina savčích miRNA se váže na 3' nepřekládanou oblast (3'UTR) cílových mRNA a není s nimi absolutně komplementární, obsahuje několik „mismatch“ nukleotidů. Navíc se miRNA vážou na enzymaticky neaktivní Ago, což způsobuje, že tyto RISC pouze inhibují translaci mRNA či je destabilizují indukci deadenylace, ale přímo je neštěpí (viz Obr. 2 vpravo). Existuje však i několik výjimek, kdy savčí miRNA přímo štěpí cílové mRNA v případě, že jsou k nim zcela komplementární a váží se na Ago2.



Obr. 2: Štěpení cílové mRNA pomocí siRNA (vlevo) a inhibice translace či indukce deadenylace cílové mRNA pomocí miRNA (vpravo) (převzato z Liu et al., 2008)

Experimentální a bioinformatické přístupy ukázaly, že pro rozpoznání cílové mRNA RISC komplexem je důležitá perfektní či téměř perfektní komplementarita mezi 5' koncem „guide“ řetězce miRNA a cílovou mRNA v tzv. „seed“ regionu. Párování bází na 3' konci miRNA není pro rozpoznání klíčové, avšak může pomoci rozpoznání cílové mRNA za předpokladu nižší komplementarity na 5' konci či umocnit její inhibici translace. Na 3'UTR mRNA se může vyskytovat více vazebných míst pro několik RISC obsahující stejnou miRNA či rozdílné miRNA, což umocňuje inhibici cílových mRNA (Liu et al., 2008).

Ačkoliv původní studie ukazovaly, že miRNA navázané na RISC pouze inhibují translaci cílových mRNA bez ovlivnění jejich stability, od té doby bylo prokázáno, že určitá část cílových mRNA je degradována díky zvýšené deadenylaci jejich poly(A) konců způsobené RISC. Zároveň tato studie prokázala, že tato deadenylace není důsledkem snížené translace a naopak poly(A) konec není nutný pro inhibici cílových mRNA (Wu et al., 2006). To ukazuje na možnost, že miRNA snižují expresi cílového genu pomocí dvou mechanismů: inhibice translace a napomáhání degradace cílových mRNA pomocí jejich deadenylace, čímž se mRNA stávají nestabilní a cílem cytosolických exonukleáz. Navíc je dokázáno, že RISC komplexy s navázanými cílovými mRNA lokalizují do tzv. „P-bodies“, což jsou místa v cytoplazmě, která obsahují nadbytek enzymů pro tzv. „decapping“, deadenylaci a degradaci mRNA (Liu et al., 2008).

Původně se předpokládalo, že RISC je přítomen pouze v cytoplazmě. V poslední době však bylo dokázáno, že RISC je přítomen také v jádře a již zde štípe cílové mRNA. Experiment navíc překvapivě ukázal, že přibližně 40% cílových mRNA je štěpena v jádře a zbylých 60% v cytoplazmě (Robb et al., 2005).

Zatím není známo, jak je RISC regulovaný, jakým způsobem interaguje s dalšími proteiny ovlivňující mRNA a jak funguje „bypass mechanismus“. To vše zatím čeká na odpovědi.

## 6.5 Tkáňově specifický a inducibilní knock-down

Kondicionovaný KD má stejné uplatnění i problémy jako tkáňově specifický a inducibilní KO (viz kap. 5.3 a 5.4). Použití RNAi současně přináší řadu dalších výhod a nevýhod. Zvláště je třeba dávat pozor v souvislosti s konstitutivní expresí interferujících RNA na možnost saturace RNAi dráhy, která způsobí nejen sníženou efektivitu KD, ale i smrt buněk v důsledku porušení rovnováhy udržované endogenními miRNA. Omezení tohoto negativního účinku exprese shRNA/miR-shRNA můžeme docílit nízkým počtem integrovaných vektorů do genomu či inducibilním KD.

KD je nevratný v případě použití rekombináz Cre či Flp. Tento KD se používá ve dvou variantách, které mají opačný efekt. První spouští expresi interferujících RNA po vyštěpení *loxP/FRT*-ohraničené sekvence (tzv. stop sekvence) ležící uvnitř promotoru, resp. uvnitř smyčky pro shRNA, která ruší aktivitu promotoru a tím brání expresi interferujících RNA, resp. vzniká pouze jedno vlákno shRNA a RNAi je nefunkční. Naopak druhá varianta, kdy rekombináza vyštěpne samotnou *loxP/FRT*-



ohraňovanou sekvencí obsahující interferující RNA, ukončí konstitutivní KD a buňka se vrátí ke svému wild-type fenotypu (Wiznerowicz et al., 2006). Příprava těchto myší i mechanismus jsou analogické jako u KO (viz kap. 5.3). Konkrétní příklady využití tohoto systému *in vivo* popisuje kap. 7.2.1.5.

Velkou výhodou RNAi je možnost vratného KD v případě použití farmakologických látek ovlivňujících expresi interferujících RNA. Stejně jako u inducibilního KO jsou konstrukty založeny na vazbě tetR či rtetR na *tetO* sekvenci a regulaci exprese interferujících RNA induktorem. Konkrétní *in vivo* aplikace popisují kap. 7.2.1.5 a 7.2.2.3.

## 6.6 Problémy a řešení RNAi experimentů

Všechny RNAi experimenty směřují ke stejnému cíli – maximalizaci účinnosti KD a minimalizaci tzv. „off-target“ efektů. Pro maximální účinek KD při minimálním počtu kopií interferujících RNA v genomu je vytvořena řada algoritmů, které predikují vhodné siRNA. Přestože se kritéria u jednotlivých predikčních programů částečně liší, základní principy jsou vždy stejné. Konkrétně se jedná o zastoupení GC párů v siRNA v rozmezí 55-60%, siRNA je přednostně namířena do takové oblasti mRNA, kde není predikovaná žádná sekundární struktura, a proto je přístupná pro RISC. Základní kontrola specifity siRNA ovšem spočívá ve velmi přísném prohledání komplementárních sekvencí BLAST algoritmem tak, aby se vyloučila možnost, že predikovaná siRNA bude rozpoznávat i jiné mRNA než žádané cílové mRNA.

### 6.6.1 Sekvenčně nezávislé „off-target“ efekty

Obecným nežádoucím efektem RNAi experimentů je inhibice vnitřní aktivity RNAi dráhy díky saturaci Exp-5 při nadměrné expresi shRNA či miR-shRNA (Cullen, 2006). Obě vlásenky ho potřebují pro svůj export z jádra, a proto při jeho saturaci je jednak snižena efektivita KD, tak i funkčnost endogenních miRNA. Tento fakt byl potvrzen při experimentu, kdy nadměrná exprese Exp-5 vedla ke zvýšení aktivity RNAi a obnovení funkce endogenních miRNA (Martin a Caplen, 2007). Toxicita vysokých koncentrací shRNA byla prokázána *in vivo* úmrtností myší nezávisle na sekvenci shRNA (Martin a Caplen, 2007). Proto je pro efektivní a netoxický KD nutné použít interferující RNA v co nejnižší účinné koncentraci, která nesaturuje RNAi dráhu. Nesmíme však zapomenout, že je tato koncentrace individuální pro jednotlivé buněčné typy (Cullen, 2006). Alternativní metodou vyvarování se saturace RNAi dráhy je použití inducibilních promotorů.

Druhým sekvenčně nezávislým efektem je stimulace interferonové (IFN) odpovědi typu I díky přítomnosti dsRNA (Cullen, 2006), např. při virové infekci. Původně se předpokládalo, že siRNA menší než 30 nt nespustí imunitní odpověď, dodnes byla publikována řada studií, kde se tato skutečnost vyvrátila (Martin a Caplen, 2007). Produkce IFN typu I je indukována prostřednictvím aktivace dsRNA-dependentní protein kinázy (PKR) nebo TLR receptorů v endozomech a na povrchu buněk. V obou případech je závislá na koncentraci shRNA, miR-shRNA či siRNA a na buněčném typu. Proto i zde platí používání co nejnižších koncentrací interferujících RNA. Navíc k minimalizaci

těchto nežádoucích efektů může přibýt i možnost chemické modifikace siRNA, která zabrání aktivaci PKR (Martin a Caplen, 2007). Skutečnost, že i cytosolické dsRNA vázající receptory RIG-1/MDA-5 spouští IFN odpověď v přítomnosti interferujících RNA, zatím nebyla prokázána.

## 6.6.2 Sekvenčně závislé „off-target“ efekty

Zásadním sekvenčně závislým „off-target“ efektem je částečná komplementarita mezi cílovými mRNA a „off-target“ mRNA (Cullen, 2006). „Off-target“ mRNA jsou obohaceny o ty, které obsahují komplementární báze mezi jejich 3'UTR a hexamerem či heptamerem (pozice 2-7 či 2-8) „seed“ sekvence na 5' konci „guide“ řetězce siRNA (Martin a Caplen, 2007). Na základě tohoto zjištění vznikl nový algoritmus, který tuto skutečnost bere v úvahu, a byla vytvořena nová databáze s validovanými siRNA pod názvem siR<sup>4</sup>. Tato databáze je tak dalším zdrojem publikovaných siRNA vedle už existujících databází siRecords<sup>5</sup> a HuSiDa<sup>6</sup>. Použitelnost těchto zdrojů je však nízká, jelikož nejsou pravidelně aktualizovány. Při návrhu siRNA je třeba brát v úvahu možnost, že se i „passenger“ řetězec může zainkorporovat do RISC a nespecificky štěpit jiné mRNA, a proto je nutné interferující RNA vymyslet tak, aby se tomuto efektu zabránilo. Většina predikčních programů však s touto možností počítá, a tak ji nemusíme řešit. Pokud si přeci jen nejsme jisti, lze zabránit vazbě „passenger“ řetězce na RISC jeho chemickou modifikací. I zde platí použití co nejnižších koncentrací interferujících RNA k vyvarování se „off-target“ efektů (Martin a Caplen, 2007). Navíc lze tento efekt ještě minimalizovat použitím směsi interferujících RNA proti stejné mRNA, aniž bychom snížili efektivitu KD. Principem této možnosti je fakt, že nespecifické „off-target“ efekty založené na částečné komplementaritě se snižují několikanásobně rychleji než specifické efekty, a tak použitím nižších koncentrací několika interferujících RNA místo jen jediné snížíme možnost „off-target“ efektů na minimum. Tohoto efektu využívají jak firemní syntetické siRNA (společnosti Dharmacon, Ambion, Qiagen), tak i široké genomové knihovny (Kittler et al., 2007).

Dalším sekvenčně závislým „off-target“ efektem RNAi experimentů je opět spuštění IFN odpovědi typu I. Tentokrát však efekt probíhá v závislosti na schopnosti TLR receptorů rozpoznat určité nukleotidové motivy v sekvenci siRNA, zvláště pak motivy bohaté na GU. Jelikož se TLR nacházejí na povrchu buněk a v endozomech, tento efekt se netýká vnitřně exprimovaných shRNA a miR-shRNA (Cullen, 2006). Při aplikaci siRNA můžeme tomuto „off-target“ efektu zabránit nepoužíváním stimulačních motivů pro TLR či použitím chemicky modifikovaných interferujících RNA (Martin a Caplen, 2007). V současné době není známo, zda také RIG-1/MDA-5 jsou schopny rozpoznat určité nukleotidové motivy v sekvencích interferujících RNA stejně jako TLR.

---

<sup>4</sup> Databáze je přístupná na <http://biotools.swmed.edu/siRNA/>

<sup>5</sup> Databáze je přístupná na <http://sirecords.umn.edu/siRecords/>

<sup>6</sup> Databáze je přístupná na <http://www.human-siRNA-database.net/>

### 6.6.3 Specifita RNAi experimentů

Ačkoliv je důležité minimalizovat možnosti „off-target“ efektů, tato optimalizace v žádném případě nenahrazuje potvrzení specifity KD. Tu lze určit několika způsoby a jejich současné použití dokazuje hodnověrnost sledovaného fenotypu.

Účinnost KD se vždy potvrzuje specifickým snížením koncentrace cílové mRNA nebo proteinu pomocí real-time PCR či Western blotu oproti nezměněné koncentraci „housekeeping“ kontrolní mRNA či proteinu. Všechny RNAi experimenty by měly obsahovat jednu nebo více negativních kontrol. Avšak tyto kontroly by neměly být prázdné, ale vždy nést siRNA, shRNA či miRNA proti nezávislému genu, např. GFP, aby se vyloučila možnost obecné inhibice RNAi dráhy. O specifitě fenotypu tyto kontroly však příliš nevypráví (Cullen, 2006). Použití celogenomových expresních čipů má výrazně lepší vypovídací hodnotu, avšak díky jejich finanční náročnosti stále většina laboratoří dává přednost pouze několika negativním kontrolám.

Lepší metodou pro zjištění specifity KD je použití 3 a více rozdílných interferujících RNA proti rozdílným úsekům cílové mRNA. Pokud jejich nezávislé použití vede ke vzniku stejného fenotypu, je pravděpodobné, že sledovaný fenotyp je způsobený inhibicí daného genu (Cullen, 2006).

Klíčovou kontrolou pro všechny RNAi experimenty je obnovení fenotypu po expresi rezistentní formy mRNA proti RNAi z vneseného vektoru, tzv. „rescue“ experiment. Nejjednodušší možností je použití interferující RNA cílené do 3' UTR, pak pro obnovení wild-type (wt) fenotypu stačí v buňce exprimovat mRNA bez 3' UTR. Alternativně může tzv. „rescue“ mRNA obsahovat synonymní mutace v cílové sekvenci uvnitř své kódující sekvence. Z tohoto důvodu již nadále není cílem specifické interferující RNA, ale díky degeneraci genetického kódu může vznikat původní protein, který obnoví wt fenotyp. Je nutno však poznamenat, že existuje možnost, že se „rescue“ mRNA nebude dostatečně exprimovat z vneseného vektoru, a tím se stává tato kontrola nepoužitelná (Cullen, 2006). Rovněž je možné, že pozorovaný fenotyp je výsledkem kooperace mezi cílovou a nspecifickou mRNA a tuto interakci neodhalíme ani tímto „rescue“ experimentem. Pro potvrzení fenotypu je proto nutné použít různé experimentální podmínky (např. jiná metoda transfekce buněk, použití siRNA jako kontrolu fenotypu shRNA) (Martin a Caplen, 2007).

## 7 RNAi *in vivo*

S objevem fungující RNAi v savcích somatických buňkách se otevřela možnost použití této metody také v *in vivo* experimentálních modelech a lidské medicíně. Zacílit můžeme jak zárodečné buňky, tak i kmenové somatické buňky a jejich následné diferencované buněčné linie. Z hlediska účinku můžeme stejně jako v buněčných kulturách rozdělit KD na krátkodobý a dlouhodobý. Krátkodobý KD je zprostředkován syntetickými siRNA, zatímco dlouhodobý KD využívá shRNA či miR-shRNA integrovaných do genomu, které jsou většinou do buněk virově transfekovány. Specifita a dostatečná účinnost KD se u všech *in vivo* experimentů nejprve ověřuje na úrovni *in vitro* pomocí

kotransdukce vektoru exprimujícího sledovaný gen s vektorem exprimujícím specifickou interferující RNA. Jako negativní kontrola slouží nejčastěji kotransdukce vektoru obsahujícího luciferázu (*luc*) či „green fluorescent protein“ (*GFP*) spolu s vektorem exprimujícím příslušnou interferující RNA.

## 7.1 Krátkodobý knock-down *in vivo*

Poprvé byl KD použit *in vivo* k transientní inhibici exprese genů v játrech dospělé myši (Lewis et al., 2002; McCaffrey et al., 2002; Song et al., 2003). Všechny tři experimenty využily syntetických siRNA, které byly dopraveny do hepatocytů pomocí hydrodynamických metod, tj. vstříknutím velkého objemu fyziologického roztoku s siRNA proti konkrétnímu genu do ocasní žíly. Lewis a McCaffrey použili pro ověření účinnosti KD *in vivo* současnou koinjekci plazmidu exprimující *luc* společně s siRNA proti *luc* genu. Oba dosáhli specifického 81% (McCaffrey et al., 2002) a 80-90% (Lewis et al., 2002) KD *luc* genu. Lewis pozoroval navíc stejně účinný KD i v ostatních orgánech – slezině, plicích, ledvinách a slinivce břišní (Lewis et al., 2002). McCaffrey doplnil tento experiment o terapeutickou možnost specifického KD virových mRNA. Plasmid nesoucí fúzovaný *luc* s regionem kódujícím HCV polymerázu byl injikován společně s siRNA proti genu HCV polymerázy do ocasní žíly, což vedlo k 75% redukci aktivity *luc* díky specifickému KD virové mRNA (McCaffrey et al., 2002). Lewis a Song dále sledovali i inhibici exprese endogenního genu a oba získali signifikantní redukci mRNA i proteinu až téměř ke 100% (Lewis et al., 2002; Song et al., 2003). Všichni tři ukázali, že míra inhibice je závislá na koncentraci siRNA injikované do žíly, čím více siRNA je aplikováno, tím účinnějšího KD je docíleno (Lewis et al., 2002; McCaffrey et al., 2002; Song et al., 2003). Zároveň sledovali i poločas RNAi, který se v obou studiích lišil. Zatímco Lewis sledoval inhibici jen pár dní díky KD vneseného exogenního genu exprimovaného na plazmidu (Lewis et al., 2002), Song pozoroval RNAi stabilní i po deseti dnech, jelikož studoval inhibici endogenního Fas receptoru (Song et al., 2003). Možný rozdíl v délce trvání je nejspíše způsoben nižší fyziologickou hladinou mRNA v druhém případě. Avšak oba sledovali aktivitu RNAi podstatně déle než je tomu u buněčných linií, které se více dělí a siRNA se tak rychleji vyředuje a snižuje svoji aktivitu. Existuje tu tedy možnost, že pro krátkodobé terapeutické využití nebude potřeba použití expresních vektorů pro stabilní KD, ale pouze opakované systémové podání siRNA *in vivo*.

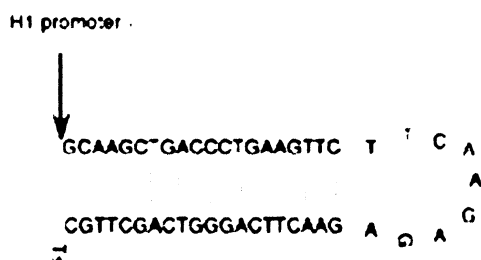
Této možnosti se ujala řada laboratoří a vymýšlejí nové postupy, jak dopravit syntetické siRNA do cílových orgánů. Začínající experimenty využívaly pouze holé siRNA, avšak ty jsou v krevním řečišti velmi nestabilní, a proto se používají pouze v případě možnosti přímého vpíchnutí do orgánu - oči, plíce či CNS. Při systémovém podání je nutné v krevním řečišti ochránit siRNA proti exonukleázám, musí se zajistit jejich stabilita (dvouřetězcová struktura), dobrý tropismus a zabránit nespecifické imunitní odpovědi. Dodnes byla vymyšlena řada možností, jak toho docílit, a v současné době se intenzivně pracuje na dalších a ještě efektivnějších metodách. siRNA vytváří komplexy s nejrůznějšími polyvalentními a nabitými látkami a máme tak na výběr jejich dopravu pomocí nabitých či nenabitých lipozomů a lipoplexů, polymerů na bázi dynamických polykonjugátů,

nanočástic odvozených od cyklohextrinu, chitosanu. Dále můžeme siRNA konjugovat s cholesterolem, což zajistí její inkorporaci do LDL partikulí a částečně ovlivní i její tropismus, nebo ji konjugovat s aptamery a neposlední řadě máme na výběr peptidové a proteinové komplexy. Pro více informací odkazují na souhrnný článek, který detailně popisuje výše zmíněné způsoby dopravy syntetických siRNA a možnosti jejich aplikace v lidské medicíně (de Fougerolles, 2008).

## 7.2 Dlouhodobý knock-down

Dlouhodobý KD je umožněn expresí interferujících RNA uvnitř buněk podmíněné jejich integrací do genomu hostitelské buňky. Tato exprese je stabilní, tj. s věkem se nesnižuje, a je dědičná. Pro absolutně stabilní KD je však nezbytné omezit epigenetickou regulaci na minimum (viz konec této kapitoly). Velkou výhodou této jednorázové aplikace je i menší finanční náročnost než je tomu u syntetických siRNA. Interferující RNA založené na vlásenkách mohou být rozděleny do dvou kategorií podle toho, kterou RNA polymerázou (RNA pol) jsou přepisovány (Svoboda, 2008).

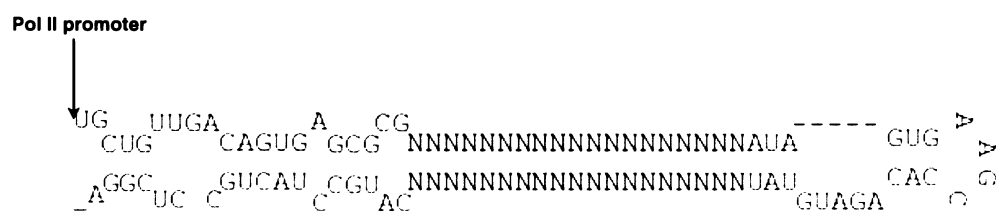
RNA pol III používají promotory H1 či U6 a přepisují shRNA, které jsou zakončeny několika thymidiny pro ukončení transkripce. Jedná se o jednoduché vlásenky o 19-21 nt dlouhém dsRNA úseku s 4-9 nt dlouhou spojující smyčkou a 3' koncovým 2 nt přesahem, který je nutný pro export z jádra a rozpoznání „guide“ řetězce komplexem RISC (Svoboda, 2008) (viz. Obr. 3). Tyto krátké shRNA nejsou v cytoplazmě štěpeny Dicerem, jelikož jejich dsRNA úsek je kratší než v jaké vzdálenosti od 3' konce štěpí dsRNA Dicer. Předpokládá se, že tyto shRNA jsou v cytoplazmě rozpoznávány endonukleázou, která štěpí jednořetězcovou oblast smyčky, a tím vznikají z shRNA funkční siRNA (Siolas et al., 2005). Výhodou RNA pol III promotorů je jejich vysoká aktivita ve většině buněk a vysoké hodnoty KD pomocí shRNA i možnost indukibilního KD. Proto se tyto promotory využívají k vytvoření transgenických zvířat, ve kterých chceme docílit KD na úrovni celého organismu, tj. ve všech buněčných typech. Pro docílení exprese interferujících RNA pouze v určité tkáni se používají promotory RNA pol II, které umožňují tkáňový i indukibilní KD (Svoboda, 2008).



Obr. 3: Struktura shRNA (převzato z Tiscornia et al., 2003).

RNA pol II přepisují miR-shRNA, které mimikují strukturu endogenních pri-miRNA (nejčastěji miR-30 či miR-155), avšak na rozdíl od nich jsou zcela komplementární k cílovým mRNA, a tak zprostředkují jejich štěpení. Skládají se z 5' a 3' konců mimikujících endogenní pri-miRNA a

místo jejich dsRNA úseku se smyčkou (pre-miRNA) je vložena arteficiální shRNA s 27-33 nt dlouhým dsRNA úsekem a smyčkou pocházející opět z miRNA (viz Obr. 4). Tyto miR-shRNA tedy vstupují do RNAi dráhy ještě před zpracováním komplexem Drosha/DGCR8 a jsou rozpoznávány a štěpeny stejně jako endogenní miRNA, a proto jsou lépe zainkorporovány do RISC. Stejným způsobem jako geny pro miRNA jsou miR-shRNA vloženy do intronových oblastí protein-kódujících genů, nejčastěji do reportérových genů, které spolehlivě identifikují buňky exprimující tyto miR-shRNA. Promotory RNA pol II (CMV či ubiquitin C) umožňují KD v celém organismu, obdobně jako promotory RNA pol III, ale mají větší variabilitu v expresi mezi buněčnými typy než promotory RNA pol III. Jiné specifické promotory RNA pol II však umožňují na rozdíl od promotorů RNA pol III i tkáňově specifický KD, což dovoluje sledovat funkce genu pouze v určité tkáni (Svoboda, 2008). Navíc promotory RNA pol II dovolují exprimovat několik miR-shRNA, a to i rozdílných specifit, z jednoho polycistronního transkriptu. Účinnost a specifitu KD lze tedy regulovat množstvím a specifitou miR-RNA vložených do jediného vektoru.



Obr. 4: Struktura miR-shRNA, červeně označené sekvence pochází z endogenních miRNA, černě označené sekvence představují vloženou siRNA (převzato z Wang et al., 2007).

Dnes se ukazuje, že účinnost KD závisí na místě vstupu dsRNA do RNAi dráhy. Zabudování siRNA do RISC je zpraženo s jejich předešlým štěpením z prekurzorů (Preall and Sontheimer, 2005). Tento fakt potvrdil i srovnávací experiment, kdy syntetické 29 nt dlouhé shRNA s 3' koncovým 2 nt přesahem, které mimikovaly pre-miRNA vznikající z pri-miRNA či miR-shRNA, byly dvojnásobně účinnější v indukci KD a to v 20 krát nižších koncentracích než syntetické siRNA, které byly přímo zainkorporovány do RISC. Z tohoto experimentu i vyplynulo, že syntetické 19 nt dlouhé shRNA s 3' koncovým 2 nt přesahem, které mimikovaly shRNA exprimované s RNA pol III promotorů, měly stejnou účinnost jako siRNA, což potvrzuje, že se na zpracování shRNA nepodílí Dicer (Siolas et al., 2005). Tento fakt potvrdilo i přímé porovnání efektivity KD pomocí shRNA a miR-shRNA, kdy miR-shRNA snížily koncentraci specifického proteinu na úplné minimum, zatímco shRNA způsobily 70% KD (Dickins et al., 2005). Přesto nelze říci, že RNA pol II promotory jsou lepší celkově, jsou jen vhodnější pro konkrétní případy.

Přestože je ve většině případů možné měřit účinek interferujících RNA přímo, většina konstruktů využívá exprese interferujících RNA společně s GFP, ať už ze stejného promotoru (miR-

shRNA) nebo z nezávislých promotorů (shRNA), pro účinné a výhodné monitorování transfekovaných buněk, zjištění chimérismu u transgenních zvířat a pro zjištění celkové exprese.

Způsobů, jakým jsou interferující RNA dopraveny do buněk, je mnoho a v podstatě kopírují metodiku přípravy transgenních organismů. Jedná se o elektroporaci embryonálních kmenových buněk, přímé vpíchnutí konstruktů do prvojádra oplodněného vajíčka či infekce virovými expresními vektory. V současné době převažuje použití integrujících se vektorů odvozených od retrovirů a lentivirů, které díky svému zabudování do hostitelského genomu zaručí stabilní expresi interferujících RNA. Jelikož je však tato integrace náhodná, může dojít k umlčení exprese těchto interferujících RNA během vývoje. Proti tomuto efektu jsou více rezistentní lentivirové expresní vektory než retrovirové (Lois et al., 2002). Další velkou výhodou lentivirů je jejich schopnost infikovat nedělící se buňky. Lentiviry ke své infekci navíc používají endogenní receptory, a proto mají široký tropismus a infikují mnoho buněčných typů. Výraznou výhodou je jejich nízká imunogenicita (Abordo-Adesida et al., 2005). Díky těmto důležitým vlastnostem se dnes používají převážně lentivirové expresní vektory. Dále se využívají i E1 odvozené adenovirové, „helper-dependent“ adenovirové a adeno-asociované vektory (AAV), které infikují hodně buněčných typů, jsou nezávislé na aktivním dělení buněk a umožňují použití vysokých titrů. Avšak tropismus těchto vektorů je závislý na zajištění ektopické exprese příslušného receptoru v cílových buňkách. Z poslední studie vyplynulo, že adenovirové a „helper-dependent“ vektory spouští IFN typu I imunitní odpověď jako následek infekce organismu viry. AAV proti tomu způsobují mnohem menší změny v hostitelských programech, a proto se pro použití *in vivo* hodí lépe (McCaffrey et al., 2008).

Elektroporace, infekce lentivirovými vektory či pronukleární injekce vede k náhodné a i vícenásobné integraci konstruktů do hostitelského genomu. Následným nutným krokem těchto metod je pracná analýza a identifikace transgenních linií, které nesou integrované konstrukty ve vhodném genomovém prostředí (nepřerušeni důležitých endogenních genů) a v dostatečném počtu k dosažení účinného KD. Náhodnou integrací tedy vznikají unikátní a jen stěží reprodukovatelné expresní profily shRNA/miR-shRNA. Naproti tomu integrace konstruktů do všudypřítomně transkripčně aktivních lokusů jako jsou *Rosa26* či *Hprt*, která zajistí expresi ve všech buněčných typech a která docílí i při pouhé jediné kopii shRNA, resp. miR-shRNA na genom 70-95% KD (Seibler et al., 2005), resp. 97% KD (Wang et al., 2007), který je reprodukovatelný. Pro urychlení vzniku rekombinantních ES buněk je možné použít RMCE strategii (recombinase mediated cassette exchange strategy) s použitím místně specifických rekombináz, při které dochází pomocí homologní rekombinace k výměně sekvencí mezi donorovým vektorem (nesoucí antibiotickou rezistenci a miR-shRNA/shRNA pod RNA pol II/III promotorem) a akceptorovou alelou uvnitř rekombinačních míst v *Rosa26/Hprt* lokusu. Gen pro antibiotickou rezistenci nemá vlastní promotor, jeho exprese je řízena z přilehlého *Rosa26/Hprt* promotoru, a tak slouží jako pozitivní selekce správné integrace do lokusu. Zatímco samotná homologní rekombinace probíhá s pravděpodobností 0,1-1%, pomocí RMCE strategie vznikne až 95%

správně zrekombinovaných ES buněk (Seibler et al., 2005). Následné vytvoření transgenních myší pomocí tetraploidní agregace pak zkrátí dobu celé přípravy na přibližně 3 měsíce (Seibler et al., 2007; Seibler et al., 2005; Steuber-Buchberger et al., 2008). Další možností tkáňově shodné a stabilní exprese shRNA/miR-shRNA je zavedení tzv. „scaffold/matrix attachment region“ (S/MAR) vedle promotorových oblastí (Girod et al., 2007). Tyto oblasti v důsledku omezení místního složení heterochromatinu zabráňují epigenetickému umlčení a udržují stálou transkripční aktivitu transgenu. Zajišťují tak stabilní expresi interferujících RNA a reprodukovatelnější KD (Kissler et al., 2006).

V následujících kapitolách popisují konkrétní aplikace RNAi *in vivo*. Pokud nebude uvedeno jinak, shRNA a miR-shRNA odpovídají svou délkou a strukturou výše uvedenému popisu.

## 7.2.1 Systémy využívající RNA polymerázu III

### 7.2.1.1 Knock-down ES buněk a vznik chimerních myší

Prvním pokusem o potvrzení dědičnosti RNAi i u savců bylo vytvoření chimerních myší. Carmell a kol. do ES buněk vnesli expresní plazmid s shRNA proti *Neill* genu pod U6/H1 promotorem a pro vytvoření RNAi transgenních myší použili analogický postup přípravy KO. Analýza prokázala u poloviny F1 potomků shRNA expresní plazmidy, byly nalezeny specifické siRNA i snížená koncentrace mRNA i proteinu Neill (Carmell et al., 2003). Tento prvotní pokus dokázal, že RNAi je rychlým alternativním způsobem ke KO.

Rubinson a kol. naopak ověřovali udržení aktivity RNAi během vývoje a pro tento účel vytvořili lentivirový expresní vektor pLL3.7, který je lepší díky své účinnější integraci do genomu než pouhý expresní plazmid. Vektorem nesoucím shRNA proti *CD8* genu pod U6 promotorem a EGFP pod CMV promotorem infikovali ES buňky. Pouze EGFP pozitivní ES buňky poté injikovali do *RAG*<sup>-/-</sup> recipientních blastocyst, které postrádají T i B lymfocyty. Specifický KD *CD8* genu ve vyvíjejících se thymocytech, které pocházely pouze z transgenních ES buněk, dosahoval 89% a tento KD byl stabilní, tj. nebyl umlčen během vývoje ani v dospělosti (Rubinson et al., 2003).

Kunath a kol. jako první dokázali, že KD rekapituluje KO fenotyp. K tomuto účelu použili expresní plazmid, který nesl shRNA proti genu pro p120-Ras GTPázu aktivující protein (RasGAP) pod H1 promotorem, a pomocí elektroporace ho vnesli do ES buněk. Transgenní myši nesoucí shRNA byly vytvořeny tetraploidní agregací (viz kap. 5.2). Tyto myši vykazovaly specifický a téměř úplný KD RasGAP genu a zároveň vykazovaly plno znaků charakteristických pro KO myši stejného genu (Kunath et al., 2003).

### 7.2.1.2 Vznik transgenních myší s RNAi

Rychlejším způsobem přípravy zvířat, které exprimují interferující RNA ve všech tkáních je injekce virových konstruktů přímo do prvojádra oplodněného vajíčka nebo injekce virových partikul pod zonu pellucidu jednobuněčného embrya. Jelikož je první metoda technicky náročná a drahá, druhá



metoda se zdá být výhodnější. Tato metoda je i méně invazivní, tudíž více embryí pokračuje ve svém vývoji i po zákroku. Alternativou druhé metody je odstranění zony pellucidy embryí a inkubace těchto embryí s lentivirovými vektory. Velkou výhodou tohoto přístupu je technická nenáročnost a víceméně jednotný počet integrovaných provirů do genomu u jednotlivých zvířat oproti injekci pod zonu pellucidu. Při ní se obtížně kontroluje vstříknutý objem s virovými vektory, což vede k individuálnímu počtu integrovaných provirů u jednotlivých zvířat (0-20 provirů/genom) (Lois et al., 2002). Nevýhodou inkubace s lentivirovými vektory je fakt, že odstranění zony pellucidy vede k opožděnému vývoji embryí a k jejich zvýšené úmrtnosti. Limitací virových transgenezí je omezená velikost exogenní sekvence vložené do vektoru a nutnost vytvořit homozygotní transgenní linii při vícenásobné integraci provirů do genomu. Pokud proto experiment vyžaduje vložení velké sekvence do genomu či větší množství integrovaných provirů pro dostatečnou expresi transgenů, je pro tento účel výhodnější injekce do prvojádra (Lois et al., 2002). Komplikací vzniku transgenních myší pomocí infekce viry je skutečnost, že existuje možnost, že se virový expresní vektor dostane do jádra až poté, co embryo prodělá další dělení. Pokud virový vektor neinfikuje obě buňky, narozená myš je chimérou, která nese zaintegrovaný vektor pouze v některých buňkách (Lois et al., 2002; Lu et al., 2004). Proto je třeba vždy ověřit potenciální chimérismus před vnesením transgenní blastocysty do náhradní matky, aby nevznikl nesprávný závěr o pozorovaném fenotypu.

V poslední době se ukázala také jako vhodná metoda integrace konstruktů do všudypřítomně transkripčně aktivních lokusů *Rosa26* či *Hprt*, které i při jedné kopii konstruktů na genom zajistí stejně účinný specifický KD jako náhodná integrace a navíc mnohem lépe reprodukovatelný.

Způsob přípravy transgenních zvířat exprimujících shRNA proti konkrétním mRNA pomocí již zmíněné injekce lentivirových expresních vektorů využilo více laboratoří ke svým *in vivo* experimentům. Transgenní zvířata byla identifikována pomocí exprese GFP z vneseného vektoru. Všichni potvrdili, že exprese shRNA je stabilní, tj. neměnná během ontogeneze, a dědičná (Dann et al., 2006; Hou et al., 2007; Kissler et al., 2006; Lu et al., 2004; Rubinson et al., 2003; Tiscornia et al., 2003).

Rubinson použil svůj vytvořený pLL3.7 vektor s shRNA proti *CD8* genu. Prokázal expresi EGFP i přítomnost specifické siRNA u transgenních myší i jejich potomků ve všech testovaných tkáních (mozek, srdce, ledviny, játra, varlata) a specifický 91% KD *CD8* genu ve vyvíjejících se thymocytech (Rubinson et al., 2003).

Hou a kol použili ke svému experimentu vektor FUGW s vloženou shRNA proti claudinu-16 genu pod U6/H1 promotorem. Transgenní myši měly 100 krát sníženou koncentraci mRNA i proteinu claudin-16 (Hou et al., 2007). Hlavním přínosem jejich experimentu však bylo zjištění exprese GFP a tedy i shRNA v nejrůznějších buněčných typech. Pro tento účel dále upravili již použitý FUGW vektor přidáním jaderného lokalizačního signálu k GFP sekvenci. Tím docílili lokalizace GFP do jádra, kde je lépe detekovatelný než je tomu v cytoplazmě. U transgenních zvířat zjistili, že GFP je exprimováno

skoro ve všech buňkách, ale méně je ho v pankreatických fibroblastech a endoteliálních buňkách, v některých částech ledvin, jaterním endotelu a Kupferových buňkách a v pohlavních buňkách ve vaječnicích a varlatech. Prokázali tedy, že exprese shRNA je tkáňově rozdílná pravděpodobně z příčiny epigenetického umlčení (Hou et al., 2007).

Tiscornia a kol. použili lentivirový vektor, do jehož unikátního restriční místa v U3 regionu na LTR (long terminal repeat) vložili shRNA proti *GFP* genu pod H1 promotorem (Tiscornia et al., 2003). Tento vektor bude při každé integraci do genomu exprimovat dvě shRNA a takto zvýší účinnost KD. Oocyty oplodnili GFP pozitivními spermii a F1 potomci transgenních myší byli analyzováni. U některých byla prokázána přítomnost specifické shRNA a v těchto případech byla fluorescence snížena na minimum (Tiscornia et al., 2003).

Lu a kol. potvrdili možnost vzniku chimérisnu při lentivirové transgenezi, kde použili lentivirový vektor FUGW, do kterého vnesli shRNA proti *Ryk* genu pod H1 promotorem. To potvrdili pomocí FACS analýzy, když jen 30% leukocytů bylo GFP pozitivních. Nicméně následná analýza čistě transgenních myší prokázala 5-10 krát specifické snížení *Ryk* proteinu (Lu et al., 2004). Tento potenciální chimérismus je nutné vždy ověřit před vyslovením závěru o fenotypu.

Kissler a kol. se zajímali o roli proteinu *Nramp1* v náchylnosti k diabetu typu I, což je komplexní autoimunitní nemoc, na jejímž vzniku a průběhu se podílí mnoho genů. Zprvu pro studium použili pLL3.7 vektor s shRNA proti *CD8* genu. Přestože exprese *CD8* byla snížena u transgenních zvířat, při detailním rozboru jejich leukocytů zjistili, že jen málo buněk exprimuje shRNA a exprese se liší mezi buněčnými typy. Jelikož měli však stejnou variaci i jejich potomci, zdá se, že tento efekt způsobuje epigenetické umlčení spíše než chimérismus buněk (Kissler et al., 2006). Proto upravili původní vektor o 2 elementy snižující epigenetické umlčení – fragment antirepresoru vložili před U6 promotor a tzv. „scaffold-attachment region“ (SAR) za GFP – a tento nový lentivirový vektor pojmenovali pLB. Dle předpokladu tento nový vektor způsobil rovnoměrnější expresi transgenu ve všech buňkách, 70% oproti původním 11-34% periferních leukocytů exprimovalo stabilně GFP i shRNA (Kissler et al., 2006). Nestudovali sice expresi v dalších buněčných typech, ale v dnešní době se zdá, že zavedení epigenetických regulátorů do konstruktů přinese lepší expresi v celém organismu. S novým vektorem potvrdili 70% specifický KD genu *Nramp1*. Navíc tyto myši byly méně náchylné k diabetu typu I. Jako první tedy demonstrovali možnost využití RNAi při studiu komplexních genetických nemocí a k vytipování kandidátních genů, které hrají významnou roli při vzniku a průběhu onemocnění (Kissler et al., 2006).

RNAi se prokázala jako velice účinná metoda při vytvoření transgenních krys, které mají jen omezené možnosti reverzní genetiky. Byl vytvořen nový lentivirový vektor pLLU2G, který vznikl modifikací původního pLL3.7. Tento vektor nesl shRNA proti genu *Dazl* a došlo k záměně CMV promotoru za ubiquitin C promotor, který má rovnoměrnější expresi GFP. U transgenních zvířat byla prokázána přítomnost specifických siRNA a došlo ke 70% KD genu *Dazl* (Dann et al., 2006). Proto

RNAi jako alternativa ke klasickému KO se zdá být řešením u experimentálních zvířat, kde homologní rekombinace nefunguje s dostatečnou účinností nebo nejsou dostupné ES buňky.

Poprvé byla integrace konstruktů do *Rosa26* lokusu použita pro transgenní myši klasickým postupem injekcí ES buněk exprimujících gen pro luciferázu i H1/U6-shRNA proti němu do recipientních blastocyst. U6 i H1 promotor dosáhly stejně účinného 70-95% specifického KD *luc* genu ve všech orgánech kromě sleziny a varlat (40% KD). Důvodem sníženého KD v těchto tkáních může být epigenetické umlčení. Alternativně použili RMCE strategii, kdy do *Rosa26* pomocí Flp rekombinázy vložili shRNA proti genu pro leptinový receptor pod H1 promotorem. Transgenní myši následně vytvořili pomocí tetraploidní agregace. Specifický KD genu pro leptinový receptor dosáhl více jak 80%, přičemž v srdci, mozku, svalech, pankreatu a žluté tukové tkáni dosáhl až 95-99%. V tomto experimentu celá příprava transgenních zvířat trvala pouhé 2 měsíce (Seibler et al., 2005).

### 7.2.1.3 Knock-down hematopoetických kmenových buněk

Transplantace transgenních či KO hematopoetických kmenových buněk (HS buněk) do připraveného příjemce je široce používanou metodou k určení funkční role leukocytárních genů *in vivo*. Použití RNAi tento velmi zdlouhavý a náročný proces výrazně urychlilo.

První experiment na toto téma udělali Hemann a kol. když dokázali, že stabilní exprese shRNA v HS buňkách rekapituluje fenotyp KO HS buněk (Hemann et al., 2003). K tomuto účelu si vybrali *Trp53* gen, který kóduje nádorový „supresor“ p53 a jehož KO fenotyp byl dobře známý a tudíž výsledky dosažené pomocí RNAi bylo možné snadno srovnávat s výsledky KO. Většina nádorů nese mutace v *Trp53* genu způsobující jeho nefunkčnost při reparaci genomové nestability. Hemann a kol. zkonstruovali různé retrovirové vektory, které nesly shRNA (27-29 nt dsRNA s 8 nt smyčkou) proti *Trp53* genu pod U6 promotorem a infikovali jimi HS buňky z *Eμ-Myc* transgenních myši. Tyto myši exprimují Myc onkogen a tudíž samotné tyto buňky způsobují nádory. Dle předpokladu by ztráta p53 však vedla ještě k většímu rozmachu nádorů. Po 3-5 týdnech rekonstituované kontrolní myši nevykazovaly žádnou proliferativní nemoc, zatímco myši rekonstituované infikovanými HS buňkami měly uzliny hmatatelné. Při detailnějším studiu se ukázaly rozdílné účinnosti vektorů. Některé vektory způsobily jen hyperplazii bez vzniku nádorů, jiné vektory způsobily malé maligní nádory, které vykazovaly nízkou proliferaci a invazivitu a vysoké hladiny apoptózy. Jiné vektory měly nádory porovnatelné s nádory, které vznikly u myši rekonstituovaných *Trp53*<sup>-/-</sup> HS buňkami, tj. vysokou proliferaci a invazivitu a nízké hladiny apoptózy. Zbyteková aktivita p53 u shRNA myši však způsobila, že na rozdíl od KO, který způsobuje aneuploidii, byla DNA z shRNA *Trp53* KD myši normální. Tudíž malá aktivita p53 zabrání odchylkám v DNA, ale není dostačující na spuštění apoptózy (Hemann et al., 2003). Nebyla zde ověřena účinnost KD *in vivo*, což je velkým nedostatkem. Autoři předpokládali stejný účinek jako *in vitro*. V tomto experimentu byly použity delší shRNA, a tak byl KD účinnější než u klasických 19 nt shRNA. Tento experiment prokázal, že různé shRNA mohou

způsobit rozdílný KD, který se projeví rozdílným fenotypem, a proto je RNAi možné využít k tvorbě odstupňovaného KD a ke konstrukci hypomorfních mutací.

Vylepšení přinesli Bot a kol., kteří ke stejnému účelu použili lentivirové vektory, které nevyžadují manipulaci s HS buňkami, aby se zvýšila jejich dělicí schopnost, jako je tomu v případě retrovirů. Lentivirovým vektorem, který nesl shRNA proti *CCR2* genu pod H1 promotorem, infikovali HS buňky a ty pak přenesli do ozářeného příjemce. *CCR2* je chemokinový receptor, který hraje hlavní roli v přitahování monocytů do místa zánětu. Proto dle předpokladu po jeho KD nastalo 70% snížení přitahování makrofágů do místa stimulu, stejně jako tomu bylo po transferu *CCR2*<sup>-/-</sup> HS buněk. Při analýze těchto makrofágů se zjistil specifický KD *CCR2* genu na hladinu 0,4% mRNA oproti wt myším. Navíc v tomto případě sledovali i IFN odpověď, která nebyla indukována (Bot et al., 2005).

Možnost využití tohoto postupu při léčbě lidských krvetvorných onemocnění demonstroval Schomber a kol. *in vitro*. Pro svůj účel upravil lentivirový vektor pWPXL, do kterého vnesl shRNA proti *Trp53* genu pod H1 promotorem. Specifický KD *Trp53* genu prokázal nejen v lidských CD34<sup>+</sup> buňkách (3% mRNA oproti wt), ale také u CD34<sup>+</sup> buněk diferenciovaných z transfekovaných tzv. „colony-forming unit cell“ progenitorů (8-10 krát méně mRNA oproti wt) i HS buněk (9% mRNA oproti wt). Tento KD byl stabilní po několik týdnů a CD34<sup>+</sup> buňky vykazovaly sníženou apoptózu (Schomber et al., 2004). Tento postup může být aplikován v lidské terapii, kde může pomoci při léčbě krvetvorných nemocí, při které budou HS buňky modifikované *ex vivo* a pak přeneseny nazpět do ozářeného pacienta.

#### 7.2.1.4 Knock-down u dospělých zvířat

Lentivirové vektory lze použít i pro KD v dospělých zvířatech, jelikož mají schopnost infikovat i nedělicí se buňky, např. terminálně diferenciované buňky. Tuto schopnost mají i adenovirové, „helper-dependent“ adenovirové a AAV, ale jak již bylo zmíněno výše, z adenovirových vektorů jsou nejvhodnější AAV. Využití virových vektorů je dodnes velmi omezené z důvodu jejich nedostatečné kontroly. Proto se vyvíjejí převážně nové techniky na doručování syntetických siRNA do míst svého účinku, třebaže přechodného, ale bez dlouhodobého nebezpečí.

Lasek a Babcock použili shRNA pod pol III promotorem ke studiu funkce genu v mozku dospělé myši (Babcock et al., 2005; Lasek et al., 2007). Lasek použil ke studiu vlivu mu opioidního receptoru (MOR) na konzumaci alkoholu lentivirový vektor pLL3.7 (Lasek et al., 2007), Babcock využil pro studium Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependentní protein kinázy II (CAMK II) AAV (Babcock et al., 2005). Oba vektory byly vpíchnuty do určených oblastí mozku a jejich účinnost byla monitorována pomocí exprese GFP. S prodlužující se dobou po vpichu se infekce mírně rozšířila, ale neopustila hranice určených oblastí, přičemž nejvíce infikovaných buněk bylo v centru a na okrajích byly pouze roztroušeně. To potvrzuje, že infekce je v mozku pouze lokální a nerozšiřuje se příliš od místa své aplikace. Analýza infikovaných buněk potvrdila specifické snížení koncentrace mRNA MOR o 88-

97% i specifické snížení koncentrace proteinu CAMK II o 50% (Babcock et al., 2005; Lasek et al., 2007). GFP se z vneseného vektoru exprimoval stabilně po 6 týdnů, což potvrzuje jeho stabilitu v čase (Lasek et al., 2007; Babcock et al., 2005). Obě skupiny však opomenuly možnost indukce IFN odpovědi.. Jelikož však nedetekovaly žádnou nekrózu zapříčiněnou touto odpovědí, je tato možnost minimální. Zároveň ukázali, že specifický KD vede k behaviorálním změnám, a tak poukazují na možnost využití RNAi ke studiu funkce genů ovlivňujících chování a možnost určení částí mozku, které jsou za daný proces odpovědné (Lasek et al., 2007; Babcock et al., 2005).

Sun a kol. demonstrovali použití virových vektorů ke studiu C5aR v plicích. Pro svůj účel si vybrali adenovirový vektor, do kterého vložili shRNA proti *C5aR* genu pod U6 promotorem. Tento vektor byl vpíchnut do trachey dospělé myši. Čtyři dny po injekci byla zjištěna snížená koncentrace C5aR mRNA v buňkách plic. Stejný výsledek zjistili i při vyvolání sepse, což znamená, že C5aR je účinně snížen za normálních i zánětlivých podmínek (Sun et al., 2006). Opět však nezkoumali, jestli samotný virový vektor indukoval IFN odpověď, což v případě adenovirového vektoru je vysoce pravděpodobné (McCaffrey et al., 2008).

Úspěšný KD byl docílen i v játrech (Witting et al., 2008). Jelikož adenoviry mají vysoký tropismus k hepatocytům, ale obsahují stále virové proteiny, Witting a kol. použili pro svůj experiment „helper-dependent“ adenovirový vektor, který je zbaven virových sekvencí a je tudíž méně toxický a IFN odpověď na něj je transientní. Do vektoru vložili shRNA proti *fabp5* genu pod U6 promotorem a rekombinantní vektor vpíchl do ocasní žíly. Po 1 týdnu byly analyzovány hepatocyty, u kterých bylo nalezeno specifické 75% snížení koncentrace proteinu fabp5. Na druhou stranu však z histologických preparátů jater byla patrná zánětlivá infiltrace lymfocytů a nekróza hepatocytů, avšak histologie ostatních orgánů byla normální. To ukazuje, že vysoké koncentrace vpíchnutého viru jsou toxické pouze pro játra. Hledali tedy koncentraci virů, při které se dosáhne maximálního KD a přitom nebude pro játra toxická. Ukázalo se, že v játrech existuje určitý práh RNAi, kterého je možno dosáhnout, a při vyšších koncentracích virů se zvyšuje už jen toxicita bez žádného zlepšení KD. Při hledání příčiny toxicity vyloučili možnost saturace RNAi dráhy, jelikož referenční jaterní endogenní miRNA i jejich regulované proteiny zůstaly nezměněny i při vysokých koncentracích virů. Jako příčina se ukázala IFN odpověď, jelikož důležité proteiny v této dráze byly vysoce exprimované (Witting et al., 2008). Tento pokus tedy jasně demonstroval, že při aplikaci virových vektorů *in vivo* je nutné sledovat IFN odpověď, jelikož existuje tenká hranice mezi účinným KD a nespecifickými efekty RNAi.

### 7.2.1.5 Inducibilní knock-down

Promotory RNA pol III využívají oba systémy, nevratný KD založený na použití místně specifických rekombináz Cre či Flp i vratný při použití induktorů.

Ventura a kol. použili lentivirové vektory pro inducibilní aktivaci, resp. inaktivaci, exprese shRNA pod U6 promotorem pomocí Cre rekombinázy (viz kap. 6.5). Pro zachování aktivity

promotoru je nutné dodržet vzdálenosti mezi jeho regulačními oblastmi. Aby tato vzdálenost zůstala po vyštěpení stop kazety (EGFP pod CMV promotorem) uvnitř promotoru neporušena, vytvořili bifunkční *loxP* místo (tzv. TATAlox), které podléhá rekombinaci a zároveň obsahuje funkční TATA box. Tato záměna neovlivnila aktivitu U6 promotoru. Tento vektor pro inducibilní aktivaci exprese shRNA nazvali pSico. Vektor pro inducibilní inaktivaci exprese shRNA nazvaný pSicoR má *loxP* místy ohraničenou sekvenci DNA obsahující shRNA pod U6 promotorem a EGFP pod CMV promotorem, která je celá vyštěpena po přidání Cre rekombinázy. V obou vektorech EGFP slouží jako značka pro infikované buňky a jeho ztráta indikuje úspěšnou rekombinaci. Účinnost těchto vektorů ověřili *in vitro* koinfekcí MEF buněk pSico, resp. pSicoR vektorem s shRNA proti *Trp53* genu a Cre-expressním vektorem. Po týdně byla prokázána u pSico MEF infikovaných buněk dramatická redukce mRNA i proteinu p53, zatímco u pSicoR infikovaných buněk byl p53 protein přítomen ve wt koncentraci. Pro ověření inducibility systému *in vivo* byly ES buňky infikované pSico s shRNA proti *CD8* genu injikovány do blastocyst. Chimérické myši byly následně kříženy a čistě transgenní myši byly dále kříženy s myši exprimujícími Cre rekombinázu pod specifickými promotory. Bylo tak docíleno rekombinace v celém organismu, resp. pouze v thymu. V obou případech bylo prokázáno snížené množství CD8<sup>+</sup> T lymfocytů (Ventura et al., 2004).

Coumoul a kol. vytvořili inducibilní transgenní myši pomocí injekce konstruktů nesoucího shRNA (21-26nt dsRNA se smyčkou) proti *Fgfr2* genu pod U6 promotorem se stop kazetou do prvojádra oplodněného vajíčka. Vzniklé transgenní myši křížili s Ella-Cre myši, které exprimují Cre rekombinázu v zárodečných buňkách, a tudíž detekovali specifický 95% KD *Fgfr2* genu ve všech buněčných typech. Jiné křížení transgenních myši s AP2-Cre myši, které exprimují Cre rekombinázu v končetinách, vedlo k rozsáhlým abnormalitám ve vývoji prstů (Coumoul et al., 2005), avšak samotnou efektivitu KD nesledovali.

Integrace do specifického akceptorového *Rosa26* lokusu pro vytvoření inducibilního KD pomocí Cre/*loxP* systému využilo několik laboratoří (Hitz et al., 2007; Steuber-Buchberger et al., 2008; Yu and McMahon, 2006). Všechny vytvořily konstrukty založené na expresi U6-shRNA se stop kazetou. Ta byla vložena do U6 promotoru (Yu and McMahon, 2006) či do oblasti smyčky shRNA (Hitz et al., 2007; Steuber-Buchberger et al., 2008). Ani v jednom případě nebyla snížena aktivita promotoru, ani efektivita KD oproti neinducibilnímu KD. V tomto směru jsou však rozdílné výsledky (Coumoul et al., 2005; Hitz et al., 2007; Ventura et al., 2004). Pro vytvoření transgenních ES buněk byla použita RMCE strategie za použití exogenní integrázy (Hitz et al., 2007; Steuber-Buchberger et al., 2008) nebo samotná homologní rekombinace (Yu and McMahon, 2006). Transgenní myši byly pak připraveny přes stádium chiméry a následným křížením (Hitz et al., 2007; Yu and McMahon, 2006) či přímo tetraploidní agregací (Steuber-Buchberger et al., 2008). Inducibilního KD bylo dosaženo křížením transgenní myši s Cre-myši exprimující Cre rekombinázu pouze ve specifických tkáních (Hitz et al., 2007; Steuber-Buchberger et al., 2008), resp. aktivací Cre rekombinázy

induktorem (Yu and McMahon, 2006). Pomocí této metody byl dosažen 70% KD *Braf* genu pouze v předním mozku dospělé myši a 65% KD *Mek* genu v celé nervové soustavě (Hitz et al., 2007), 92% KD exogenního *YFP* genu a 60% KD *Smo* genu v celém zvířeti (Yu and McMahon, 2006). Zatímco Hitz a Yu potlačovali expresi pouze jediného genu v čase, Steuber-Buchberger inhibovala expresi 2 genů současně z jediného konstruktů. Dosáhla 60% KD *Gsk-3 $\alpha$*  genu společně s 50% KD *Gsk-3 $\beta$*  genu v nervové soustavě a třebaže byl tento KD nízký, použitím pouze jediné shRNA v konstruktů se dosáhlo stejně efektivního KD (Steuber-Buchberger et al., 2008). Důvodem nízké účinnosti KD byly proto nejspíše špatně navržené struktury shRNA.

Vratný inducibilní KD závislý na přítomnosti induktoru *in vivo* poprvé demonstroval Seibler a kol. Ukázali dva postupy, při kterých konstrukty integrovali do *Rosa26* lokusu a vznikaly chimerní, resp. plně transgenní myši. V obou případech na vyřešení minimalizace bazální transkripce v neindukovaném stavu použili kodon-optimalizovaný tetR (itetR), který se mnohem lépe váže na *tetO* místo v promotoru a je lépe exprimován než wt tetR (Seibler et al., 2007). Stačí tedy jediné *tetO* místo, které snižuje aktivitu promotoru minimálně (80% aktivita) (Zhang et al., 2007). Pro expresi shRNA použili tet-regulovatelný H1 promotor, který vykazoval pevnou kontrolu transkripce, zatímco tet-regulovatelný U6 promotor měl reziduální transkripci i bez induktoru (Seibler et al., 2007). Při prvním postupu integrovali do *Rosa26* pomocí pouhé homologní rekombinace 2 plazmidy: součástí prvního byla shRNA proti *luc* genu pod tet-regulovatelným H1 promotorem, součástí druhého byl *luc* gen a gen pro itetR pod konstitutivně aktivním CAGGS promotorem. Plazmidy transdukovali ES buňky a rekombinované buňky injikovali do blastocyst. Chimerní myši následně analyzovali a zatímco v neindukovaném stavu vykazovaly nulový KD, po přidání doxycyklinu KD dosáhl 50-90% úrovně ve všech orgánech kromě mozku. Příčinou nedostatečného KD v mozku je patrně špatná difúze doxycyklinu. Druhý postup, kterým vytvořili reverzibilní model diabetes mellitus typu II, zahrnoval přípravu konstruktů nesoucího shRNA proti genu pro insulinový receptor (INSR) pod tet-regulovaným H1 promotorem, gen pro itetR pod CAGGS promotorem a gen pro neomycinovou rezistenci. Tento postup byl mnohem rychlejší, jelikož zahrnoval RMCE strategii pro vytvoření rekombinantních ES buněk, jejíž účinnost byla více než 90%, a tetraploidní agregaci pro vznik transgenních myší, které tímto postupem vznikly během 3 měsíců. U těchto myší byl po podání doxycyklinu zjištěn se zvyšující se koncentrací doxycyklinu zvyšující se KD, který dosáhl téměř 100% ve všech orgánech. Zároveň byla zjištěna progresse nemoci v závislosti na množství doxycyklinu. Po odstranění doxycyklinu po několika dnech odezněly všechny příznaky nemoci a v játrech byl opět patrný INSR. Potomci těchto myší vykazovali stejný fenotyp jako jejich rodiče, tudíž je KD dědičný (Seibler et al., 2007).

Zhang a kol. použili pro překonání stérické slabosti inducibilního KD závislému na induktoru nadměrnou expresi tetR přes bicistronní konstrukt. Připravili jediný lentivirový vektor, který nesl tetR pod CMV promotorem, který řídil ještě expresi puromycinu přes IRES, a do 3' UTR vložili shRNA proti *Trp53* genu pod tet-regulovaným U6 promotorem. Tímto docílili, že infikované buňky, které

přežijí vysokou koncentraci puromycinu, exprimují mnohonásobně více tetR (15krát více mRNA a 50krát více tetR proteinu než buňky infikované komerčním vektorem pro tetR expresi). Žádný vedlejší účinek na morfologii či transkripční aktivitu buněk nadměrná exprese tetR neměla. Infikované MCF-7 buňky vykazovaly minimální transkripci shRNA bez doxycyklinu a vzrůstající KD se zvyšující se koncentrací doxycyklinu, který se zastavil na 80%. Po odebrání doxycyklinu se opět vrátila koncentrace p53 na původní hodnotu před indukci (Zhang et al., 2007). Použití lentivirů však zahrnuje náhodnou integraci, a tudíž je nutná analýza klonů, která je však s použitím jediného vektoru časově méně náročná než při použití obvyklých 2 vektorů (první exprimující shRNA a druhý exprimující tetR).

Doxycyklin má navíc u RNAi i jedno další využití. Byl připraven fúzní protein složený z KRAB domény s tetR či rtetR DNA vázající doménou (tzv. tTRKRAB) (Szulc et al., 2006), který po vazbě na *tetO* sekvenci (tetR či rtetR doména) umlčuje transkripci pomocí přivádění chromatin remodelačního komplexu k DNA (KRAB doména). Tento komplex způsobí deadenylaci a metylaci histonů, vazbu heterochromatin proteinu 1 a lokální formování heterochromatinu až do vzdálenosti 3 kilobází od místa vazby. To umožňuje reverzibilní kontrolu aktivity jakéhokoliv promotoru v blízkosti *tetO* sekvence pomocí doxycyklinu a to buď v tet-on či tet-off systému. Touto metodou docílili vysoké regulace exprese shRNA (29 nt dsRNA se smyčkou) z promotoru RNA polymerázy III i transgenu z promotoru RNA polymerázy II pomocí obou systémů a to reversibilně a s vysokou citlivostí na přítomnost doxycyklinu. Funkčnost této metody prokázali v buněčných liniích, v embryonálních a hematopoetických kmenových buňkách, v nádorech, lokálně v mozku dospělých krys i v celých transgenních zvířatech (Szulc et al., 2006). Tento způsob ovlivnění exprese transgenu a KD je tedy vysoce účinný a univerzální a pokud transgenem bude reporterový gen, usnadní se detekování buněk s aktivními interferujícími RNA.

## 7.2.2 Systémy využívající RNA polymerázu II

### 7.2.2.1 Transgenní myši

Xia a kol. použili miR-shRNA pro přípravu transgenních zvířat vykazujících specifický KD na úrovni celého organismu. Vytvořili konstrukt nesoucí miR-shRNA proti *Sod2* genu pod ubiquitin C promotorem, která je vložena do intronu pro EGFP, a za druhý exon EGFP vložili poly(A) signál. Konstrukt injikovali do prvojádra oplodněného vajíčka. U transgenních myší byla prokázána přítomnost specifických siRNA, které způsobily 60-90% snížení koncentrace mRNA, proteinu i enzymové aktivity *Sod2* genu ve všech buněčných typech. Tento KD byl stabilní, tj. stabilita se neměnila během ontogeneze, a dědičný. Expresní profil se však u transgenních zvířat lišil od tkáňových kultur. Zatímco u zvířat byly detekovány pouze siRNA, u linií byl detekován EGFP, shRNA i siRNA. Chybění shRNA lze vysvětlit rychlým zpracováním shRNA *in vivo*. Nepřítomnost EGFP může mít dvě příčiny. První, kdy je transgen změněn, ale tato možnost byla pomocí PCR



vyloučena. Druhá, kdy pri-miRNA sestřih je natolik rychlý, že proběhne ještě před sestřihem pre-mRNA, a tak nemůže vznikat funkční mRNA pro EGFP. Druhá možnost se potvrdila jako správná, když při zavedení shRNA proti Drosha se obnovila exprese EGFP. Přestože tato transgenní zvířata nesou řadu vlastností jako KO zvířata pro daný gen, řada jim i chybí. Pro úplnou rekapitulaci KO byly tyto myši navzájem zkříženy, což vedlo k úplnému snížení koncentrace mRNA i proteinu téměř na úroveň pozadí (Xia et al., 2006a). Tímto prokázali, že i miR-shRNA mohou vést k dostatečnému KD na úrovni celého organismu.

Lepší exprese EGFP docílili *in vitro* Du a kol., když miR-shRNA byly vloženy do chimérického intronu složeného z účinnějšího 5' donorového sestřihového místa intronu za prvním exonem, místa větvení sestřihu za miR-shRNA a účinnějšího 3' akceptorového sestřihového místa intronu před kódující sekvencí pro EGFP. Tyto vektory nazvali pSM30 a pSM155. Dle předpokladu by nejdříve mělo dojít k sestřihu pre-mRNA, tudíž by měl vznikat funkční EGFP, a až poté k sestřihu pri-miRNA. Tyto vektory opravdu podstatně zlepšily expresi EGFP dle fluorescence i Western blotu (Du et al., 2006). Přestože tyto efekty byly ověřeny pouze *in vitro* a výsledky byly pouze transientní, možné zavedení těchto konstruktů do lentivirových vektorů či přímo do transkripčně aktivních lokusů na genomu povede k dlouhodobé expresi miR-shRNA a reportérových genů *in vivo*.

Využití RNA pol II k vytvoření tkáňově specifického KD pomocí miR-shRNA bylo poprvé demonstrováno při použití tkáňově specifického promotoru aktivního pouze v Sertoliho buňkách (Rao et al., 2006) či myeloidní linii (Cullere et al., 2008), který řídil expresi miR-shRNA vloženou do intronu. Tento konstrukt byl injikován do prvojádra oplodněného vajíčka. Transgenní myši i jejich potomci exprimovali specifickou miR-shRNA a docílili specifického KD pouze v konkrétních tkáních, kde je promotor aktivní. KD byl v obou případech velice účinný, dosahoval 50-75% snížení koncentrace proteinu WT1 (Rao et al., 2006), resp. 75-95% CD18 (Cullere et al., 2008) oproti wt zvířatům. Tkáňově specifický KD je možný vytvořit i standardním způsobem pomocí Cre rekombinázy a *loxP* míst, avšak tento způsob vyžaduje mnohonásobné křížení a je závislý na efektivitě Cre rekombinázy. Proto využití tkáňově specifických promotorů RNA pol II je mnohem rychlejší a jednodušší, jelikož spočívá v přípravě jediného transgenního zvířete, a tak se tento postup zdá být ideálním k vytvoření specifických KD v různých tkáních.

### 7.2.2.2 Knock-down v dospělých zvířatech

První experiment využívající promotor RNA polymerázy II k expresi interferující RNA v dospělé myši provedli v roce 2002 Xia a kol. Tato shRNA (21 nt dsRNA se smyčkou) je však identická k shRNA exprimovanými z RNA pol III promotorů, a tudíž nemimikuje pri-miRNA. Adenovirový vektor nesoucí shRNA se syntetickým poly(A) koncem proti *EGFP* genu (exogenní), resp. genu pro  $\beta$ -glukosidázu (endogenní) pod CMV promotorem byl injikován do mozku transgenních myší exprimujících EGFP, resp. jater vysoce exprimujících  $\beta$ -glukosidázu. KD obou

genů byl velice účinný a závisel na multiplicitě infekce (MOI – multiplicity of infection), tj. počtu integrovaných vektorů na genom (Xia et al., 2002). Nesledovali však IFN odpověď, jejíž spuštění je velice pravděpodobné při použití adenovirového vektoru.

### 7.2.2.3 Inducibilní knock-down

RNA pol II promotory mají potenciál používat oba systémy inducibilního KD, vratný i nevratný, avšak dosud byl *in vivo* aplikován pouze vratný, jelikož je při možnosti použití tkáňově specifických promotorů pro expresi miR-shRNA použití Cre rekombinázy zbytečně složité (viz výše).

Dickins a kol. demonstrovali, že miR-shRNA pod promotorem RNA pol II jsou mnohem účinnější ve specifickém KD než klasické shRNA exprimované RNA pol III (Dickins et al., 2005). Zároveň dokázali účinnost reverzibilního specifického KD *in vitro* pomocí doxycyklinu v HeLa buňkách i primárních buňkách a to v tet-on i tet-off systému. Tyto transgenní primární buňky obsahující vektor s miR-shRNA proti *Trp53* genu a vektor exprimující tTA vpíchnuli do podkoží *nu/nu* myši a pozorovali rychlý vznik nádorů. Důležitým zjištěním byl fakt, že po podání doxycyklinu tyto nádory rychle mizely, někdy úplně a po opětovném odebrání doxycyklinu se nádory obnovily (Dickins et al., 2005). Z toho vyplývá, že pro pokračující růst nádorů je nutná trvalá inaktivace *Trp53* genu. Tato metoda má velký potenciál k identifikaci příčinných souvislostí v biologických procesech a experimentálnímu potvrzení genů, které jsou zodpovědné za patologické jevy. Též může přispět k testování nových látek účinných při jejich léčbě.

Transgenní myši s inducibilním a reverzibilním celkovým i tkáňově specifickým KD vytvořili Dickins a kol. v roce 2007. Konstrukt obsahující miR-shRNA proti *Trp53* genu pod tet-regulovaným CMV promotorem injikovali do prvojádra oplodněného vajíčka. Pro vytvoření inducibilního KD ve většině tkání zkřížili transgenní myši s myšmi exprimujícími rtTA (tet-on systém) pod CMV promotorem. Po přidání doxycyklinu detekovali specifické siRNA proti *Trp53* genu ve všech tkáních (Dickins et al., 2007), účinnost KD však netestovali. Pro získání myši s tkáňově specifickým KD zkřížili transgenní myši nesoucí miR-shRNA s LAP-tTA transgenními myšmi, které exprimují tTA (tet-off systém) jen v hepatocytech. Pouze v játrech byly detekovány specifické siRNA a dle předpokladu nastal specifický KD *Trp53* genu exprimovaného z arteficiálně vneseného plazmidu pouze v játrech. Tento KD byl zrušen přidáním doxycyklinu. Stejným postupem vytvořili i myši se specifickým KD endogenního *Trp53* genu v B lymfocytech. Pro kontrolu sledovali v obou případech koncentraci miRNA specifické pro daný buněčný typ, která zůstala nezměněna, tudíž exprese miR-shRNA nesaturuje RNAi dráhu (Dickins et al., 2007). Existence mnoha myších linií, které exprimují tTA či rtTA z tkáňově specifických promotorů, výrazně usnadňuje přípravu myši s tkáňově specifickým a inducibilním KD, a proto má tato metoda velký potenciál do budoucna.

Xia a kol. a Wang a kol. prokázali *in vitro* v NF-1 buňkách (Xia et al., 2006b), resp. Ainv15 ES buňkách (Wang et al., 2007) možnost inducibilní exprese více miR-shRNA z jediného konstruktu

závislou na přítomnosti induktoru. Vytvořili plazmid, který nesl tet-regulovaný ubiquitin C promotor, který řídil expresi až tří miR-shRNA vložených do intronů EGFP (Xia et al., 2006b). Tento plazmid se však integroval do hostitelského genomu náhodně, a tudíž mohl podléhat transkripčnímu umlčení z příčiny chromozomálního pozičního efektu. Zatímco Wang použil speciálně modifikované ES buňky (obsahující tet-regulovatelný element s *tetO* místy, gen pro neomycinovou rezistenci a gen pro rtTA exprimovaný z *Rosa26* lokusu) a pomocí Cre rekombinázy integroval pLox-targeting vektor nesoucí až tři miR-shRNA do blízkosti všudypřítomně transkripčně aktivního *Hprt* lokusu, který řídil expresi vlásenek (Wang et al., 2007). Oba přístupy způsobily účinný specifický KD na úrovni proteinu. Vložené miR-shRNA mohou být specifické pro stejný gen, a tím zvyšovat efektivitu KD. 97% KD *Nanog* genu při jedné integrované kopii miR-shRNA do genomu, 99% KD při dvou kopiích a 100% KD při třech kopiích (Wang et al., 2007). Nebo mohou mít integrované miR-shRNA různou specifitu a způsobit účinný 80% KD všech genů současně (Xia et al., 2006b). Wang docílil vyšší efektivity KD díky specifické integraci konstruktů do předem známého lokusu, který není umlčován. Zatímco přístup, který použila Xia nezabrání umlčení exprese plazmidu vlivem náhodné integrace. Možnost exprese více miR-shRNA z jediného konstruktů má velké využití při studiu redundance, příbuznosti proteinů a jejich signálních drah. Tato metoda je navíc mnohonásobně rychlejší než křížení myší pro přípravu trojitěho KO, které trvá měsíce až roky.

## 8 RNAi knihovny

Většina experimentů využívá KD jednoho či jen několika genů, které se přímo vztahují ke zkoumané biologické otázce. Naproti těmto úzce zaměřeným aplikacím stojí použití rozsáhlých celogenomových RNAi analýz. Výsledkem snahy o vytvoření shRNA knihoven proti všem lidským i myším genům přístupných pro vědeckou komunitu je „The RNAi Consortium“ (TCR)<sup>7</sup>, které sdružuje řadu laboratoří po celém světě. Dnes je zacíleno na 15 000 myších a 15 000 lidských genů a připravují se shRNA ještě s efektivnějším KD. Používají se různé RNAi knihovny: syntetické siRNA knihovny<sup>8</sup>, esiRNA (Kittler et al., 2007), expresní shRNA<sup>9</sup> a miR-shRNA<sup>10</sup> knihovny a všechny jsou běžně komerčně dostupné. Omezené RNAi knihovny mohou být zacílené proti všem genům účastnícím se zkoumaného procesu nebo jen proti určité proteinové rodině. Rozsáhlejší celogenomové RNAi knihovny mohou sloužit k nalezení nových genů účastnících se určitého procesu, objevení nových funkcí již známých genů či k nalezení genů, které zvýší účinek již existujících terapeutik.

<sup>7</sup> [http://www.broad.mit.edu/genome\\_bio/trc/](http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/)

<sup>8</sup> Syntetické siRNA knihovny komerčně dostupné od Ambion <http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/> či Qiagen <http://www1.qiagen.com/Products/RNAi/>

<sup>9</sup> Expresní shRNA knihovny komerčně dostupné od TCR [http://www.broad.mit.edu/genome\\_bio/trc/](http://www.broad.mit.edu/genome_bio/trc/) či Sigma Aldrich [http://www.sigmaaldrich.com/Area\\_of\\_Interest/Life\\_Science/Functional\\_Genomics\\_and\\_RNAi.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Functional_Genomics_and_RNAi.html)

<sup>10</sup> Expresní miR-shRNA knihovny komerčně dostupné od Openbiosystems <https://www.openbiosystems.com/Products/>

Celogenomové RNAi analýzy jsou dnes časově i finančně dostupné pro akademické laboratoře (Martin and Caplen, 2007).

## 9 Lidská terapie

S dokončeným osekvenováním lidského a myšního genomu mohou vědci nyní systematicky hledat molekulární příčiny lidských onemocnění. KO technologie se v lidské terapii nemůže používat z etických a technických důvodů. Proto se s objevem RNAi otevřela možnost terapeutického umlčování specifických genů v lidských buňkách. Na úrovni *in vivo* napomáhají studiu lidských onemocnění myší modely, které ukázaly použitelnost RNAi k léčbě virových infekcí, neurodegenerativních onemocnění, rakoviny a dominantně dědičných onemocnění. RNAi se také ukázala jako vhodnou metodou při studiu multigenových onemocnění a odhalení potenciálně důležitých genů, stejně jako při modelování lidských onemocnění založených na hypomorfních mutacích. V neposlední řadě se ukázala i možnost úpravy povrchových antigenů tak, aby po transplantaci nebyly orgány rozpoznány a odhojovány imunitním systémem příjemce. V dnešní době už první klinické studie probíhají a řada skupin je ve fázi preklinického vývoje. Velkým příslibem je použití RNAi knihoven v experimentech, které urychlí hledání molekulárních příčin onemocnění a povedou i k vývoji nových léků, které se pak vyhnou vysokým dávkám a vedlejším efektům na pacienta (Martin and Caplen, 2007).

Dnes však nadále zůstává hlavním problémem způsob dopravy interferujících RNA. Existuje variabilita v transfekovatelnosti orgánů, některé přijímají efektorové molekuly účinněji než ostatní, a to se netýká pouze interferujících RNA. Závažnou otázkou je bezpečnost aplikace, a proto se dnes v lidské terapii stále dává přednost syntetickým siRNA před virově dopravenými shRNA či miR-shRNA (de Fougères, 2008).

## 10 Závěr

Přínos KO a RNAi technologie ke studiu funkce genů je nepopiratelná. V této práci jsem shrnula současné poznatky o aplikaci RNAi *in vivo* u savců v klasické i indukibilní variantě. Z mé práce vyplývá, že geny lze účinně a specificky umlčet pomocí krátkodobého i dlouhodobého knock-downu (KD) *in vivo*. Ke krátkodobému KD se využívají siRNA, které jsou různými způsoby dopraveny do místa svého účinku. K dlouhodobému KD se používají shRNA nebo miR-shRNA, které se integrují do hostitelského genomu, a tak se zajistí jejich dlouhodobá exprese.

Specifický, stabilní a dědičný KD byl prokázán u transgenních zvířat nesoucích interferující RNA i jejich potomků. Stejně tak byl dlouhodobý stabilní a specifický KD prokázán u buněčných linií diferenciovaných z transgenních HS buněk i v konkrétních somatických buněčných typech u dospělých zvířat. Z porovnání účinnosti specifického KD pomocí shRNA exprimované z promotoru

RNA pol III a miR-shRNA z promotoru RNA pol II vyšly miR-shRNA účinnější a byly schopny snížit koncentraci specifické mRNA a proteinu až ke 100%. Promotory RNA pol II umožňují nejen KD na úrovni celého organismu, ale i tkáňově specifický v závislosti na použitém promotoru. Navíc RNA pol II promotory mohou přepisovat i polycistronní transkripty, které mohou kódovat stejné či rozdílné miR-shRNA, a tím zvýšit efektivitu KD pro daný gen či umožnit specifický KD více genů současně. Těto vlastnosti lze využít při studiu multigenové redundance. To vše ukazuje na to, že miR-shRNA mají velký potenciál. Přesto se pro vytvoření transgenních zvířat se specifickým KD na úrovni celého organismu dodnes používají především shRNA, jejichž nespornou výhodou je rovnoměrnější a obecně vyšší exprese než je tomu u miR-shRNA. RNA pol II promotory jsou však nepostradatelné při tvorbě tkáňově specifického KD. Pro vyvození jednoznačného závěru existuje stále příliš málo publikací. Proto záleží na cíli experimentu, jaký RNA pol systém a interferující RNA zvolit. Oba systémy umožňují vytvoření inducibilního KD pomocí Cre/loxP systému či tet systému, který dovoluje připravit organismy s jinak letálním fenotypem, nezatěžuje RNAi dráhu během vývoje organismu a zabraňuje vzájemné kompenzaci mezi geny. V případě tet systému je navíc tento KD reverzibilní, tj. exprese interferujících RNA lze zapnout či zastavit. Výhodou RNAi je i možnost rychlé přípravy myšího modelu s kombinovaným KD pro více specifických genů, a to pouhým zkřížením transgenních myší mezi sebou. Tato příprava se ještě může urychlit použitím polycistronních transkriptů. RNAi rovněž umožňuje vytvořit odstupňovaný KD, který umožňuje sledovat korelaci mezi postupnou ztrátou funkčního genu a výsledným fenotypem. Velmi důležitou aplikací RNAi je na rozdíl od KO technik její možnost využití v lidské terapii k léčbě nejrůznějších chorob. V dnešní době již probíhá řada preklinických a klinických studií.

Metod pro přípravu RNAi transgenních zvířat je řada, v dnešní době převažuje infekce virovými vektory. Nejvhodnější jsou lentivirové expresní vektory. Tyto vektory mají schopnost infikovat i nedělící se buňky, jsou více rezistentní vůči epigenetickému umlčení než retrovirové vektory, mohou se používat ve vysokých titrech a mají nízkou imunogenicitu, tj. schopnost stimulovat buňky imunitního systému. Velmi slibná je integrace konstruktů do všudypřítomně transkripčně aktivních lokusů jako je *Rosa26* či *Hprt*, které zajistí velice účinný a dobře reprodukovatelný KD i při pouhé jedné kopii shRNA/miR-shRNA na genom. Stejně účinnou metodou k zajištění rovnoměrnější exprese interferujících RNA by mohlo být i zavedení S/MAR do blízkosti promotorů. Navíc při použití RMCE strategie, při které se dosáhne až 95% správně rekombinovaných ES buněk, následovanou tetraploidní agregací, je možné získat RNAi transgenní zvířata za pouhé 3 měsíce. Až čas ukáže, zdali je RNAi skutečně tak efektivním prostředkem, jakým se zdá být dnes.

## 11 Použitá literatura

- Abordo-Adesida, E., Follenzi, A., Barcia, C., Sciascia, S., Castro, M.G., Naldini, L., and Lowenstein, P.R. (2005). Stability of lentiviral vector-mediated transgene expression in the brain in the presence of systemic antivector immune responses. *Hum Gene Ther* 16, 741-751.
- Babcock, A.M., Standing, D., Bullshields, K., Schwartz, E., Paden, C.M., and Poulsen, D.J. (2005). In vivo inhibition of hippocampal Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II by RNA interference. *Mol Ther* 11, 899-905.
- Babinet, C., and Cohen-Tannoudji, M. (2001). Genome engineering via homologous recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study of mammalian biology. *An Acad Bras Cienc* 73, 365-383.
- Bot, I., Guo, J., Van Eck, M., Van Santbrink, P.J., Groot, P.H., Hildebrand, R.B., Seppen, J., Van Berkel, T.J., and Biessen, E.A. (2005). Lentiviral shRNA silencing of murine bone marrow cell CCR2 leads to persistent knockdown of CCR2 function in vivo. *Blood* 106, 1147-1153.
- Carmell, M.A., Zhang, L., Conklin, D.S., Hannon, G.J., and Rosenquist, T.A. (2003). Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol* 10, 91-92.
- Cohen-Tannoudji, M., and Babinet, C. (1998). Beyond 'knock-out' mice: new perspectives for the programmed modification of the mammalian genome. *Mol Hum Reprod* 4, 929-938.
- Collins, F.S., Finnell, R.H., Rossant, J., and Wurst, W. (2007a). A new partner for the international knockout mouse consortium. *Cell* 129, 235.
- Collins, F.S., Rossant, J., and Wurst, W. (2007b). A mouse for all reasons. *Cell* 128, 9-13.
- Coumoul, X., Shukla, V., Li, C., Wang, R.H., and Deng, C.X. (2005). Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res* 33, e102.
- Cullen, B.R. (2006). Enhancing and confirming the specificity of RNAi experiments. *Nat Methods* 3, 677-681.
- Cullere, X., Lauterbach, M., Tsuboi, N., and Mayadas, T.N. (2008). Neutrophil-selective CD18 silencing using RNA interference in vivo. *Blood* 111, 3591-3598.
- Dann, C.T., Alvarado, A.L., Hammer, R.E., and Garbers, D.L. (2006). Heritable and stable gene knockdown in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 11246-11251.
- de Fougères, A.R. (2008). Delivery vehicles for small interfering RNA in vivo. *Hum Gene Ther* 19, 125-132.
- Dickins, R.A., Hemann, M.T., Zilfou, J.T., Simpson, D.R., Ibarra, I., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2005). Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. *Nat Genet* 37, 1289-1295.
- Dickins, R.A., McJunkin, K., Hernando, E., Premsrirut, P.K., Krizhanovsky, V., Burgess, D.J., Kim, S.Y., Cordon-Cardo, C., Zender, L., Hannon, G.J., et al. (2007). Tissue-specific and reversible RNA interference in transgenic mice. *Nat Genet* 39, 914-921.
- Du, G., Yonekubo, J., Zeng, Y., Osisami, M., and Frohman, M.A. (2006). Design of expression vectors for RNA interference based on miRNAs and RNA splicing. *FEBS J* 273, 5421-5427.
- Filipowicz, W., Jaskiewicz, L., Kolb, F.A., and Pillai, R.S. (2005). Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 15, 331-341.
- Girod, P.A., Nguyen, D.Q., Calabrese, D., Puttini, S., Grandjean, M., Martinet, D., Regamey, A., Saugy, D., Beckmann, J.S., Bucher, P., et al. (2007). Genome-wide prediction of matrix attachment regions that increase gene expression in mammalian cells. *Nat Methods* 4, 747-753.
- Hemann, M.T., Fridman, J.S., Zilfou, J.T., Hernando, E., Paddison, P.J., Cordon-Cardo, C., Hannon, G.J., and Lowe, S.W. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet* 33, 396-400.
- Hitz, C., Wurst, W., and Kuhn, R. (2007). Conditional brain-specific knockdown of MAPK using Cre/loxP regulated RNA interference. *Nucleic Acids Res* 35, e90.

- Hou, J., Shan, Q., Wang, T., Gomes, A.S., Yan, Q., Paul, D.L., Bleich, M., and Goodenough, D.A. (2007). Transgenic RNAi depletion of claudin-16 and the renal handling of magnesium. *J Biol Chem* 282, 17114-17122.
- Hrabe de Angelis, M.H., Flaswinkel, H., Fuchs, H., Rathkolb, B., Soewarto, D., Marschall, S., Heffner, S., Pargent, W., Wuensch, K., Jung, M., et al. (2000). Genome-wide, large-scale production of mutant mice by ENU mutagenesis. *Nat Genet* 25, 444-447.
- Kissler, S., Stern, P., Takahashi, K., Hunter, K., Peterson, L.B., and Wicker, L.S. (2006). In vivo RNA interference demonstrates a role for Nramp1 in modifying susceptibility to type 1 diabetes. *Nat Genet* 38, 479-483.
- Kittler, R., Surendranath, V., Heninger, A.K., Slabicki, M., Theis, M., Putz, G., Franke, K., Caldarelli, A., Grabner, H., Kozak, K., et al. (2007). Genome-wide resources of endoribonuclease-prepared short interfering RNAs for specific loss-of-function studies. *Nat Methods* 4, 337-344.
- Kunath, T., Gish, G., Lickert, H., Jones, N., Pawson, T., and Rossant, J. (2003). Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol* 21, 559-561.
- Lasek, A.W., Janak, P.H., He, L., Whistler, J.L., and Heberlein, U. (2007). Downregulation of mu opioid receptor by RNA interference in the ventral tegmental area reduces ethanol consumption in mice. *Genes Brain Behav* 6, 728-735.
- Lewis, D.L., Hagstrom, J.E., Loomis, A.G., Wolff, J.A., and Herweijer, H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat Genet* 32, 107-108.
- Liu, X., Fortin, K., and Mourelatos, Z. (2008). MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 18, 113-121.
- Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295, 868-872.
- Lu, W., Yamamoto, V., Ortega, B., and Baltimore, D. (2004). Mammalian Ryk is a Wnt coreceptor required for stimulation of neurite outgrowth. *Cell* 119, 97-108.
- Martin, S.E., and Caplen, N.J. (2007). Applications of RNA interference in mammalian systems. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 8, 81-108.
- McCaffrey, A.P., Fawcett, P., Nakai, H., McCaffrey, R.L., Ehrhardt, A., Pham, T.T., Pandey, K., Xu, H., Feuss, S., Storm, T.A., et al. (2008). The Host Response to Adenovirus, Helper-dependent Adenovirus, and Adeno-associated Virus in Mouse Liver. *Mol Ther*.
- McCaffrey, A.P., Meuse, L., Pham, T.T., Conklin, D.S., Hannon, G.J., and Kay, M.A. (2002). RNA interference in adult mice. *Nature* 418, 38-39.
- Poueymirou, W.T., Auerbach, W., Frendewey, D., Hickey, J.F., Escaravage, J.M., Esau, L., Dore, A.T., Stevens, S., Adams, N.C., Dominguez, M.G., et al. (2007). F0 generation mice fully derived from gene-targeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nat Biotechnol* 25, 91-99.
- Preall, J.B., and Sontheimer, E.J. (2005). RNAi: RISC gets loaded. *Cell* 123, 543-545.
- Rao, M.K., Pham, J., Imam, J.S., MacLean, J.A., Murali, D., Furuta, Y., Sinha-Hikim, A.P., and Wilkinson, M.F. (2006). Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. *Genes Dev* 20, 147-152.
- Robb, G.B., Brown, K.M., Khurana, J., and Rana, T.M. (2005). Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat Struct Mol Biol* 12, 133-137.
- 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. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33, 401-406.
- Seibler, J., Kleinriders, A., Kuter-Luks, B., Niehaves, S., Bruning, J.C., and Schwenk, F. (2007). Reversible gene knockdown in mice using a tight, inducible shRNA expression system. *Nucleic Acids Res* 35, e54.
- Seibler, J., Kuter-Luks, B., Kern, H., Streu, S., Plum, L., Mauer, J., Kuhn, R., Bruning, J.C., and Schwenk, F. (2005). Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res* 33, e67.

- Schomber, T., Kalberer, C.P., Wodnar-Filipowicz, A., and Skoda, R.C. (2004). Gene silencing by lentivirus-mediated delivery of siRNA in human CD34+ cells. *Blood* 103, 4511-4513.
- Siolas, D., Lerner, C., Burchard, J., Ge, W., Linsley, P.S., Paddison, P.J., Hannon, G.J., and Cleary, M.A. (2005). Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers. *Nat Biotechnol* 23, 227-231.
- Song, E., Lee, S.K., Wang, J., Ince, N., Ouyang, N., Min, J., Chen, J., Shankar, P., and Lieberman, J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat Med* 9, 347-351.
- Steuber-Buchberger, P., Wurst, W., and Kuhn, R. (2008). Simultaneous Cre-mediated conditional knockdown of two genes in mice. *Genesis* 46, 144-151.
- Sun, L., Gao, H., Sarma, V.J., Guo, R.F., and Ward, P.A. (2006). Adenovirus-Mediated In Vivo Silencing of Anaphylatoxin Receptor C5aR. *J Biomed Biotechnol* 2006, 28945.
- Svoboda, P. (2008). RNA silencing in mammalian oocytes and early embryos. *Curr Top Microbiol Immunol* 320, 225-256.
- Szulc, J., Wiznerowicz, M., Sauvain, M.O., Trono, D., and Aebischer, P. (2006). A versatile tool for conditional gene expression and knockdown. *Nat Methods* 3, 109-116.
- Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M., and Verma, I.M. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 1844-1848.
- Tolia, N.H., and Joshua-Tor, L. (2007). Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol* 3, 36-43.
- Valenzuela, D.M., Murphy, A.J., Frendewey, D., Gale, N.W., Economides, A.N., Auerbach, W., Poueymirou, W.T., Adams, N.C., Rojas, J., Yasenchak, J., et al. (2003). High-throughput engineering of the mouse genome coupled with high-resolution expression analysis. *Nat Biotechnol* 21, 652-659.
- Ventura, A., Meissner, A., Dillon, C.P., McManus, M., Sharp, P.A., Van Parijs, L., Jaenisch, R., and Jacks, T. (2004). Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10380-10385.
- Wang, J., Theunissen, T.W., and Orkin, S.H. (2007). Site-directed, virus-free, and inducible RNAi in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 20850-20855.
- Witting, S.R., Brown, M., Saxena, R., Nabinger, S., and Morral, N. (2008). Helper-dependent adenovirus-mediated short hairpin RNA expression in the liver activates the interferon response. *J Biol Chem* 283, 2120-2128.
- Wiznerowicz, M., Szulc, J., and Trono, D. (2006). Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods* 3, 682-688.
- Wu, L., Fan, J., and Belasco, J.G. (2006). MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 4034-4039.
- Xia, H., Mao, Q., Paulson, H.L., and Davidson, B.L. (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo. *Nat Biotechnol* 20, 1006-1010.
- Xia, X.G., Zhou, H., Samper, E., Melov, S., and Xu, Z. (2006a). Pol II-expressed shRNA knocks down Sod2 gene expression and causes phenotypes of the gene knockout in mice. *PLoS Genet* 2, e10.
- Xia, X.G., Zhou, H., and Xu, Z. (2006b). Multiple shRNAs expressed by an inducible pol II promoter can knock down the expression of multiple target genes. *Biotechniques* 41, 64-68.
- Yu, J., and McMahon, A.P. (2006). Reproducible and inducible knockdown of gene expression in mice. *Genesis* 44, 252-261.
- Zambrowicz, B.P., Friedrich, G.A., Buxton, E.C., Lilleberg, S.L., Person, C., and Sands, A.T. (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392, 608-611.
- Zhang, J., Wang, C., Ke, N., Bliesath, J., Chionis, J., He, Q.S., Li, Q.X., Chatterton, J.E., Wong-Staal, F., and Zhou, D. (2007). A more efficient RNAi inducible system for tight regulation of gene expression in mammalian cells and xenograft animals. *RNA* 13, 1375-1383.