

En metode for sekvensspesifikk nedregulering av gener har revolusjonert molekylærbiologisk forskning. Nå er forventningene til kliniske anvendelser høye

Nobelpris for RNA-interferens

Amerikanerne Andrew Z. Fire og Craig C. Mello, årets nobelprisvinnere i medisin eller fysiologi, er representanter for et fagfelt som på få år har utviklet seg svært mye både i omfang og betydning. Fire og Mello fikk prisen for oppdagelsen av at dobbeltrådig RNA kan gi sekvensspesifikk nedregulering av gener, såkalt RNA-interferens (RNAi). En rekke banebrytende oppdagelser har gjort at vi i dag vet relativt mye om hvordan RNA-interferens fungerer, og forskere verden over utnytter nå rutinemessig denne kunnskapen til å studere effekten av å nedregulere et eller flere gener. Det er bare åtte år siden Fire og Mello publiserte sin banebrytende artikkel i *Nature* (1). Artikkelen forklarte data som til da hadde vært uforklarlige, og den ga forventninger om at RNA-interferens også kunne fungere i flere typer organismer, inkludert menneske. Mange venter nå utålmodig på de første kliniske anvendelsene av deres oppdagelse.

Forut for Fire og Mellos arbeid hadde Richard Jorgensen i 1990 genmodifisert petuniaplanten for å få en sterkere farge. Transgenet som skulle forsterke fargen, hadde imidlertid motsatt effekt, og i noen tilfeller ble blomstene helt hvite (2). Men hvordan mer RNA kunne føre til mindre protein, kunne ikke forklares. Studier med ormen *Caenorhabditis elegans* tydet også på RNA-basert regulering av genuttrykk. Man visste at genet *lin-4* nedregulerte proteinet LIN-4, og at dette var nødvendig for larveutviklingen, men *lin-4* kodet ikke for et protein. I 1993 viste Gary Ruvkun (3) og Victor Ambros (4) at *lin-4* kodet for et RNA som hadde sekvenskomplementaritet til *lin-14* mRNA. De fleste antok at det måtte dreie seg om en mekanisme hvor komplementært RNA kunne binde seg til mRNA og blokkere translasjon til protein.

Men så enkelt var det likevel ikke. Andre grupper presenterte data som tydet på at kunstig tilførsel av RNA kunne brukes for å nedregulere gener. Det merkelige var at RNA som var identisk med genets mRNA også fungerte, selv om dette ikke kan binde seg til mRNA. Ingen hadde en god forklaring på dette fenomenet, men en metode for nedregulering av gener som ikke krevde genmodifisering, var likevel interessant. Med Fire og Mellos funn ble det klart at det var dobbeltrådig RNA som ga den mest effektive nedreguleringen. Tidligere studier hadde introdusert RNA ved hjelp av transkripsjon *in vitro*, men denne metoden hadde også utilsiktet gitt noe dobbeltrådig RNA, og det var disse biproduktene som hadde gitt så effektiv nedregulering. Nå var det ingen tvil om at det måtte dreie seg om en naturlig og katalytisk mekanisme. Spørsmålet man stilte seg nå, var om dette også gjaldt andre organismer.

Pattedyr er ikke samarbeidsvillige som ormen *Caenorhabditis elegans*. Pattedyrs immunforsvar ødelegger alt RNA dersom relativt lange tråder med dobbeltrådig RNA introduseres i cellene – et effektivt forsvar mot enkelte virusinfeksjoner. Senere studier viste imidlertid at det ikke er langt dobbeltrådig RNA i seg selv som gir RNA-interferens. Enzymet Dicer kutter dobbeltrådig RNA med 21–23 nukleotiders mellomrom, slik at de dobbeltrådigene produktene har to nukleotiders overheng i 3'-enden. Et såkalt Argonaut-enzym tar så opp en av de to trådene og kløyver mRNA med sekvenskomplementaritet til denne tråden. Løsningen for RNA-interferens i pattedyr ble dermed syntetiske Dicer-produkter, såkalt siRNA (short interfering RNA). Disse unngår stort sett immunforsvaret og kan gi effektiv nedregulering i de fleste celletyper. Senere

ble det klart at RNA-interferens også forklarer mysteriet med *lin-4* i *Caenorhabditis elegans*. RNA-genet *lin-4* uttrykkes som en selvkomplementær tråd som danner en karakteristisk hånmålsstruktur. Denne prosesseres av Dicer-enzymet og andre enzymer til en siRNA-liknende dobbeltrådig RNA. Argonaut-enzymet tar opp en av trådene, men siden *lin-4* ikke har perfekt komplementaritet til *lin-14*, blir ikke mRNA kløyyd. I stedet forhindrer Argonaut-enzym-RNA-komplekset proteinproduksjonen fra mRNA med en mekanisme som ennå ikke er fullstendig forstått. Nå vet vi at det finnes hundrevis av liknende RNA-gener i planter og dyr. Disse genene, som kalles mikroRNA, er antakelig en viktig del av genreguleringen hos planter og dyr.

RNA-interferens-teknikker er nå standard for sekvensspesifikk nedregulering av gener i molekylærbiologisk forskning. Metoden er både effektiv og spesifikk og åpner for terapeutiske anvendelser ved nedregulering av sykdomsfremkallende gener. Fra forskningen på mikroRNA vet vi at også de naturlige, RNA-baserte reguleringsmekanismene er involvert i flere sykdommer, spesielt kreftsykdommer.

Men det er fortsatt mange uløste problemer. Toksiske effekter skjer på tre nivåer: siRNA kan trigge immunforsvaret, nedregulere andre gener enn det som var tilsiktet og utkonkurrere naturlig og nødvendig mikroRNA i kampen om de proteinkompleksene som gjør nedreguleringen mulig. Likevel er det ikke disse effektene som stopper terapeutisk anvendelse – det vanskeligste er å finne en sikker og effektiv metode for tilførsel. Det foregår nå kliniske forsøk med direkte tilførsel av siRNA til øyne med aldersrelatert maculadegenerasjon og til lunger infisert med respiratorisk syncytialvirus (RSV). Videre testes genterapibasert RNA-interferens ut mot hepatitt C-infeksjon og hivinfeksjon. Dersom noen finner generelt anvendbare metoder som er egnet til å tilføre siRNA til pasienter, vil dette gi enorme muligheter for utvikling av terapi for spesifikk nedregulering av gener.

Ola Snøve jr.

ola.snove@ntnu.no

Pål Sætrom

palsat@idi.ntnu.no

Ola Snøve jr. (f. 1977) og Pål Sætrom (f. 1977) er begge dr. philos innen bioinformatikk. De er postdoktorstipendiater ved henholdsvis Institutt for kreftforskning og molekylær medisin og Institutt for datateknikk og informasjonsvitenskap, Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet og daglig leder og forskningssjef i Interagon AS. De arbeider for tiden med RNAi-baserte terapeutiske metoder under ledelse av John J. Rossi ved kreftsentret City of Hope i California.

Oppgitte interessekonflikter: Ingen

Litteratur

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–11.
2. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279–89.
3. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993; 75: 855–62.
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–54.