

# BIOLOGIA MOLECULAR

## Aula 6

Prof<sup>a</sup> Inês Rodrigues

2015/16  
2<sup>o</sup> Semestre

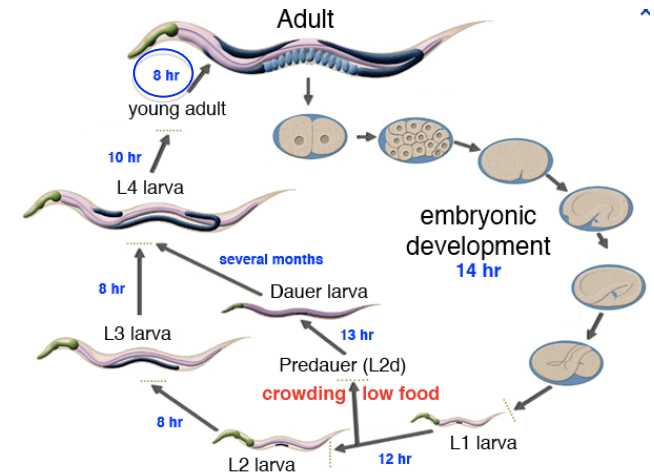
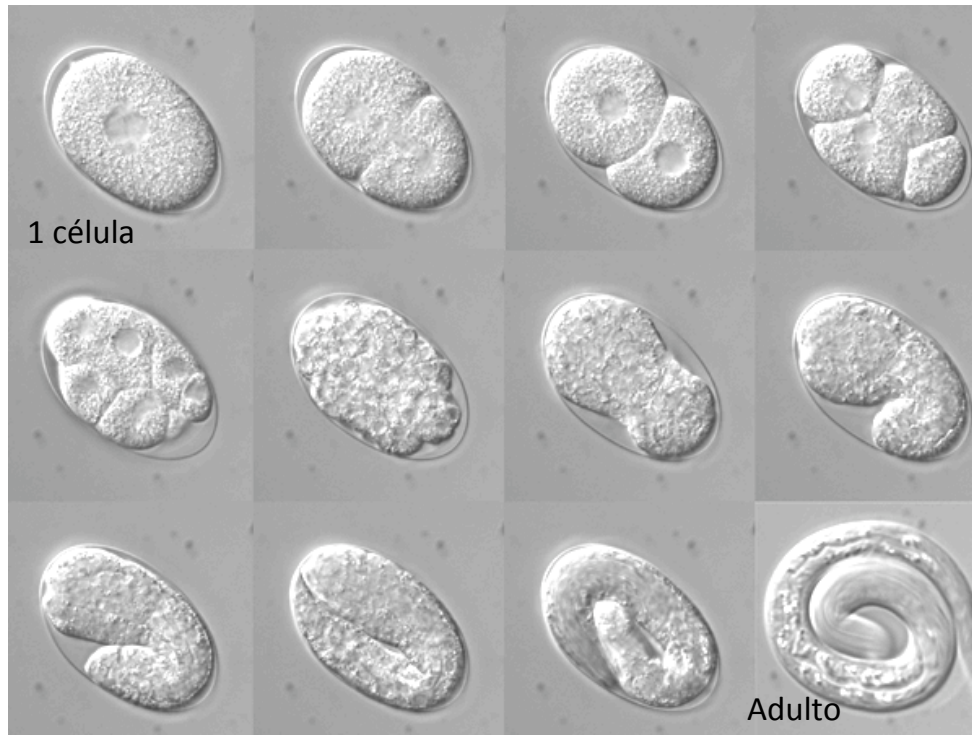
# RNA Interferência

*(RNAi)*

# RNAi

Foi descoberto num nemátodo, usado como organismo modelo para estudos genéticos, a minhoca *Caenorhabditis elegans*.

Desenvolvimento embrionário de *C. elegans*



# RNAi

- Em 1998, Andrew Fire e Craig C. Mello publicaram as suas descobertas sobre RNAi (Nobel em Fisiologia e Medicina em 2006)
- São moléculas de RNA envolvidas num processo que ocorre em células vivas e que tem como objectivo regular a atividade genética
- É um fenómeno comum na natureza, sendo bastante semelhante em Plantas, Fungos, Protozoários e Animais

# RNAi

## **Funções do RNAi na célula:**

Defesa contra sequências nucleótídicas parasitas  
(*i.e.* vírus, transposões, ensaios de transgênicos)

Regulação da expressão genética durante o desenvolvimento de um organismo.

Regulação da expressão genética em estados de saúde e de doença.

# RNAi

## **Funções do RNAi no laboratório:**

Investigação Farmacêutica: Novas terapias para patologias de etiologia genética;

Investigação básica, principalmente nas áreas de biologia do desenvolvimento; epigenética; regulação genética, estudos de evolução entre muitas outras áreas.

# RNAi

Processo celular que permite silenciar genes específicos.

Para a produção de proteínas específicas

**→ Silenciamento genético/epigenético**

Este processo envolve vários tipos e subtipos de pequenas moléculas de RNA, que podem silenciar genes antes ou depois da transcrição

# RNAi

As moléculas de RNAi, podem atuar no **núcleo** através da sua adesão a **cromatina** ou no **citoplasma**

A tradução de um mRNA no citoplasma pode ser impedida pelo mecanismo de ação do RNAi.

A molécula de RNAi liga-se ao mRNA formando uma cadeia dupla que é destruída

Desta forma, a expressão de um gene específico é silenciada

Os tipos de RNAi melhor conhecidos são os que conseguem silenciar a expressão de um gene através da sua ação sobre o **mRNA no citoplasma**

# RNAi

RNAi tem duas origens:

## **Endógeno:**

- Expressão de genes específicos
- Transcritos gerados a partir de sequências *tandem*

## **Exógeno:**

- Introduzido através de um parasita genético (*i.e.*retrovírus)
- Transgênese e micro-injeção no núcleo das células (usado como ferramenta em investigação científica básica e em terapias genéticas)

# Tipos de RNAi

## Nucleares:

**piRNA:** Interfere com a cromatina nuclear de forma a reprimir a expressão de determinados genes.

## Citoplasmáticos:

**siRNA**

**miRNA**

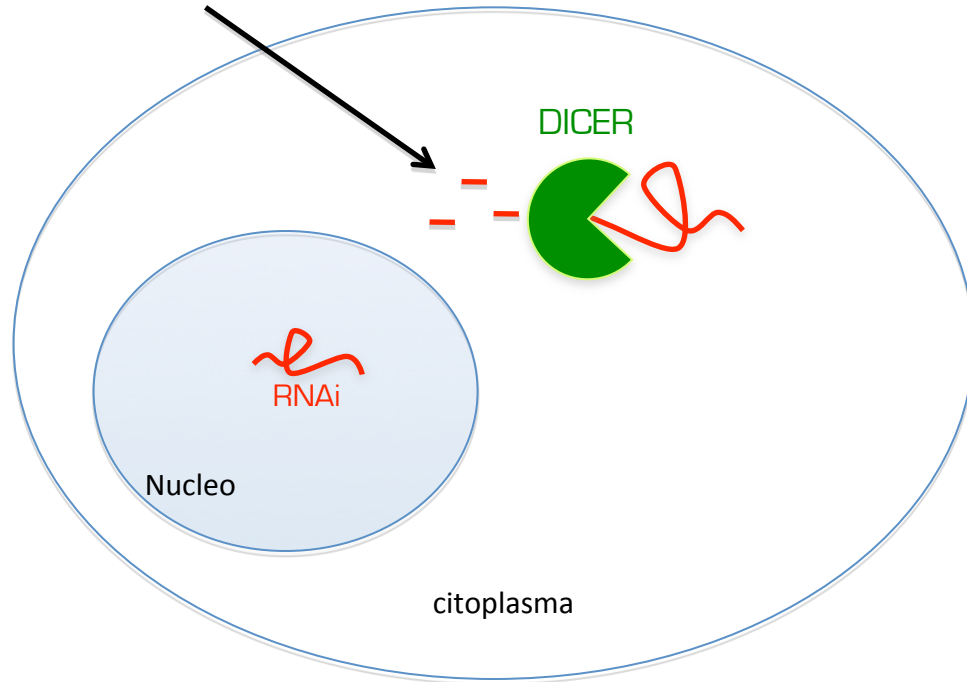
# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## *siRNA*

- Origem endógena ou exógena;
- Primeiramente apresentam-se como grandes moléculas de RNA de cadeia dupla (dsRNA)
- Posteriormente são fraccionadas pela enzima **DICER** em pequenos fragmentos de RNA (siRNA), de cadeia dupla, com cerca de 20 a 21 nucleótidos.

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

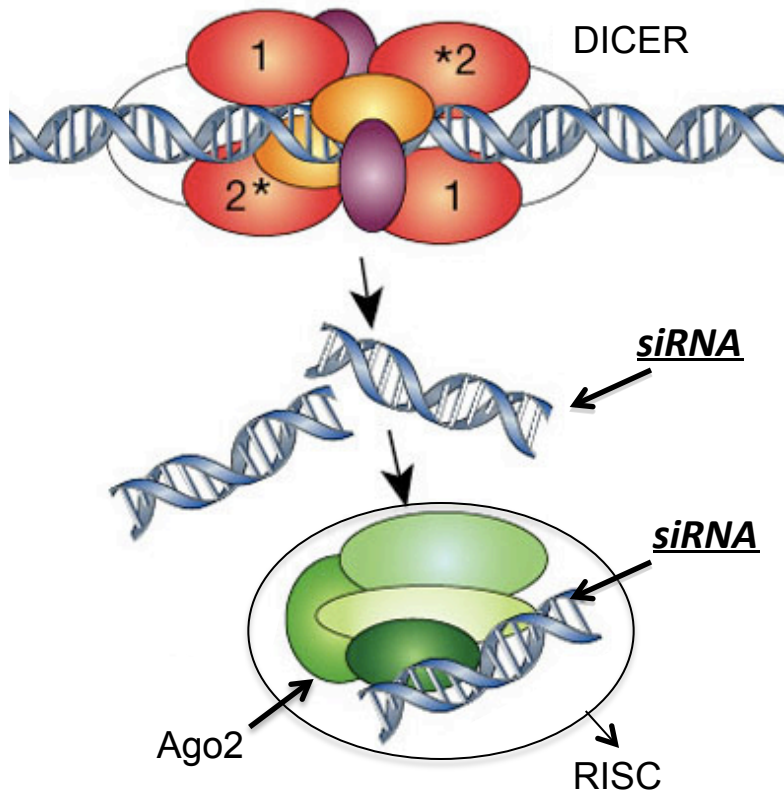
*siRNA*



- DICER: é uma ribonuclease específica para dsRNA, da família Rnase III
- Está bastante conservada entre as espécies, estrutural e funcionalmente.
- Fraciona a molécula de RNA em pequenos siRNA de máximo 21 nucleótidos

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

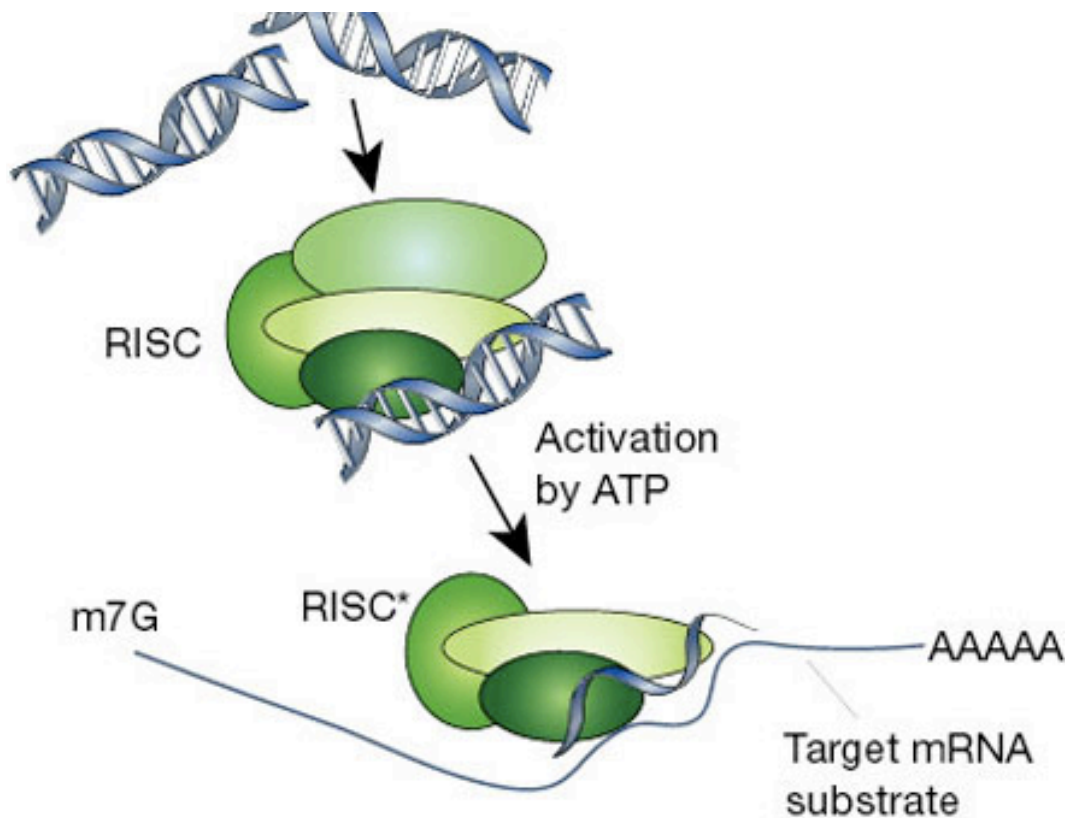
## siRNA: mecanismo



- ✓ Depois de fragmentados pela enzima DICER, o siRNA é reconhecido pelo complexo proteico RISC (*RNA induced silencing complex*)
- ✓ RISC é constituído por vários tipos de proteínas capazes de quebrar a cadeia dupla de siRNA
- ✓ Uma das cadeias de mRNA (sense) entra no complexo RISC
- ✓ A outra cadeia é destruída pela enzima Argonaute (ago2)
- ✓ Uma vez identificada a cadeia 'líder' o complexo RISC-siRNA localiza a cadeia de mRNA alvo (a destruir)

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## siRNA: mecanismo



- ✓ siRNA encontra-se em cadeia única no complexo RISC, o que permite a localização do mRNA alvo por complementaridade.
- ✓ O mRNA alvo é identificado e desta forma é impedida a união de ribossomas para a sua tradução
- ✓ Depois de emparelhados (siRNA-mRNA) o complexo é fragmentado pela enzima Ago2
- ✓ Desta forma a tradução a proteína é impedida.

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

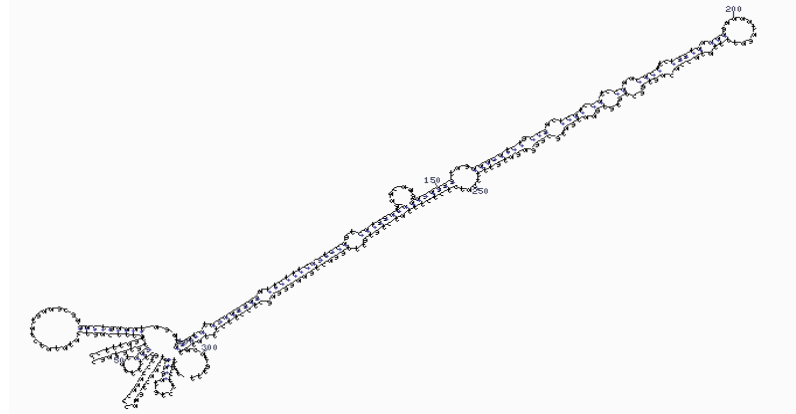
## *microRNA*

- Origem endógena: miRNA é transcrito pela RNA pol II a partir de transcritos não codificantes ou a partir de intrões localizados em genes codificantes.
- Existem numa grande variedade de organismos e estão bastante conservados durante a evolução
- Existem cerca de 800 miRNA diferentes no humano, o que representa um 3% de todos os genes humanos.

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## *microRNA*

- Os genes que codificam para os miRNA têm uma longitude superior ao tamanho final de miRNA
- Esta longitude compreende duas zonas complementares o que permite o emparelhamento da sequência após a sua transcrição
- Desta forma, o RNA consegue obter uma forma em ‘gancho’, com estruturas secundárias. nesta fase é chamado pri-miRNA



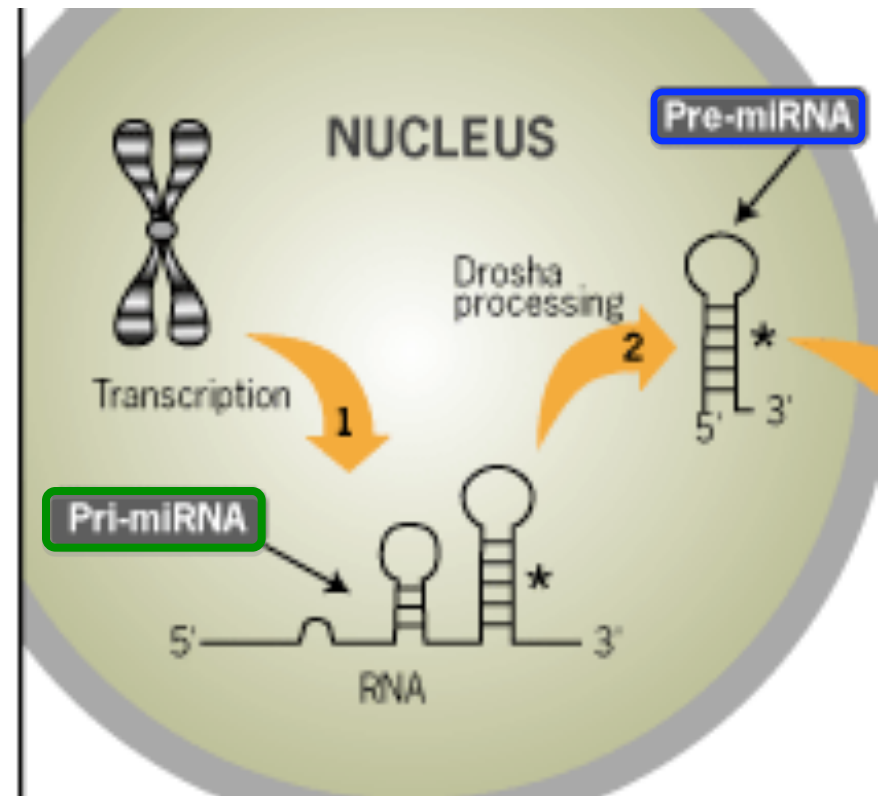
Estrutura de um  
pri-miRNA de  
*Brassica oleracea*.

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## *microRNA: mecanismo*

Depois de transcrito, o **pri-miRNA** é fraccionado em pequenos fragmentos através da ação da enzima **drosha**, uma RNase III endonuclease.

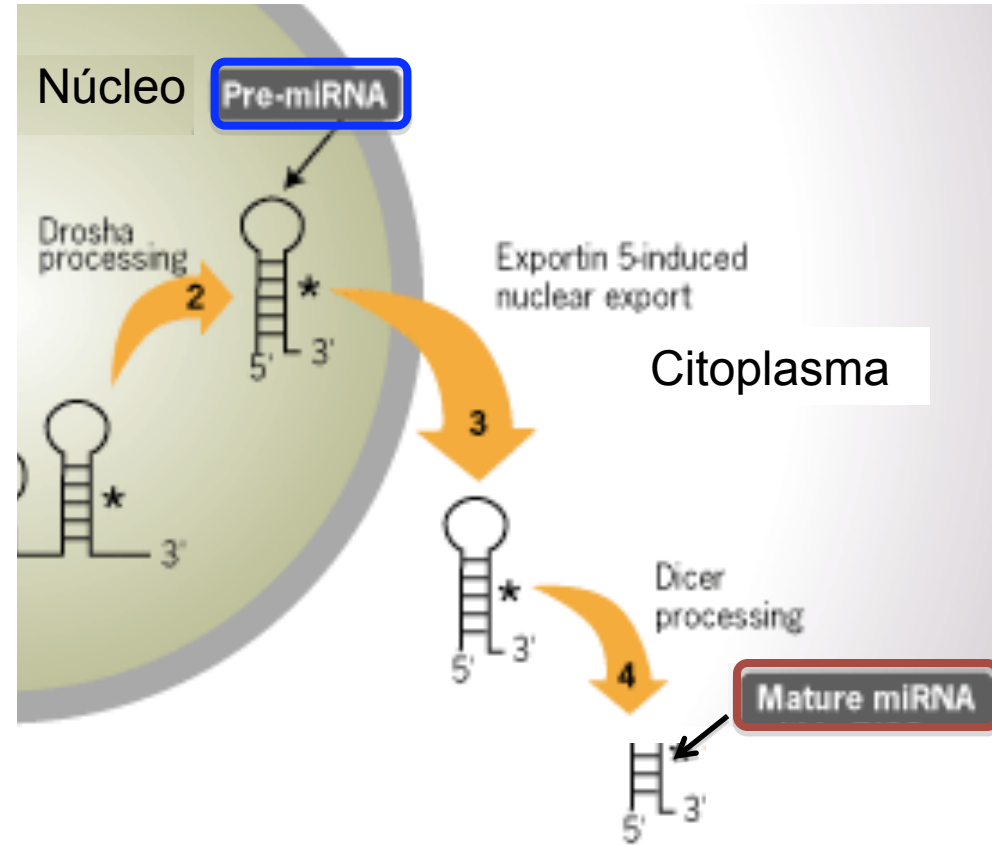
Estes fragmentos de 20 a 25 nucleótidos são chamados **pre-miRNA** e são transportados para o citoplasma



# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

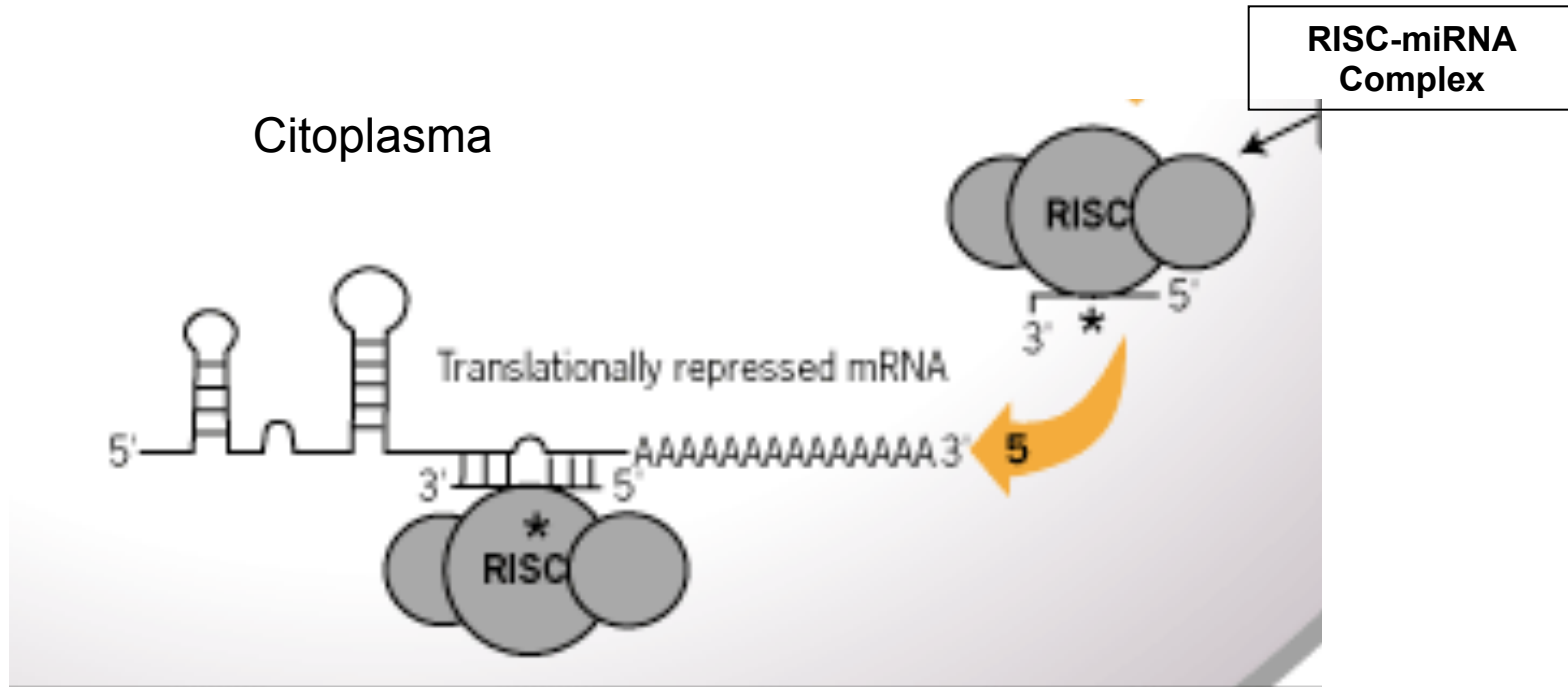
## *microRNA: mecanismo*

- O Pre-miRNA é transportado do núcleo para o citoplasma através da proteína exportina 5
- Uma vez no citoplasma este **pre-miRNA** é fragmentado pela enzima DICER
- Apenas é fragmentado nas zonas de cadeia dupla
- Os fragmentos resultantes são chamados **miRNA maduro**



# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## *microRNA: mecanismo*

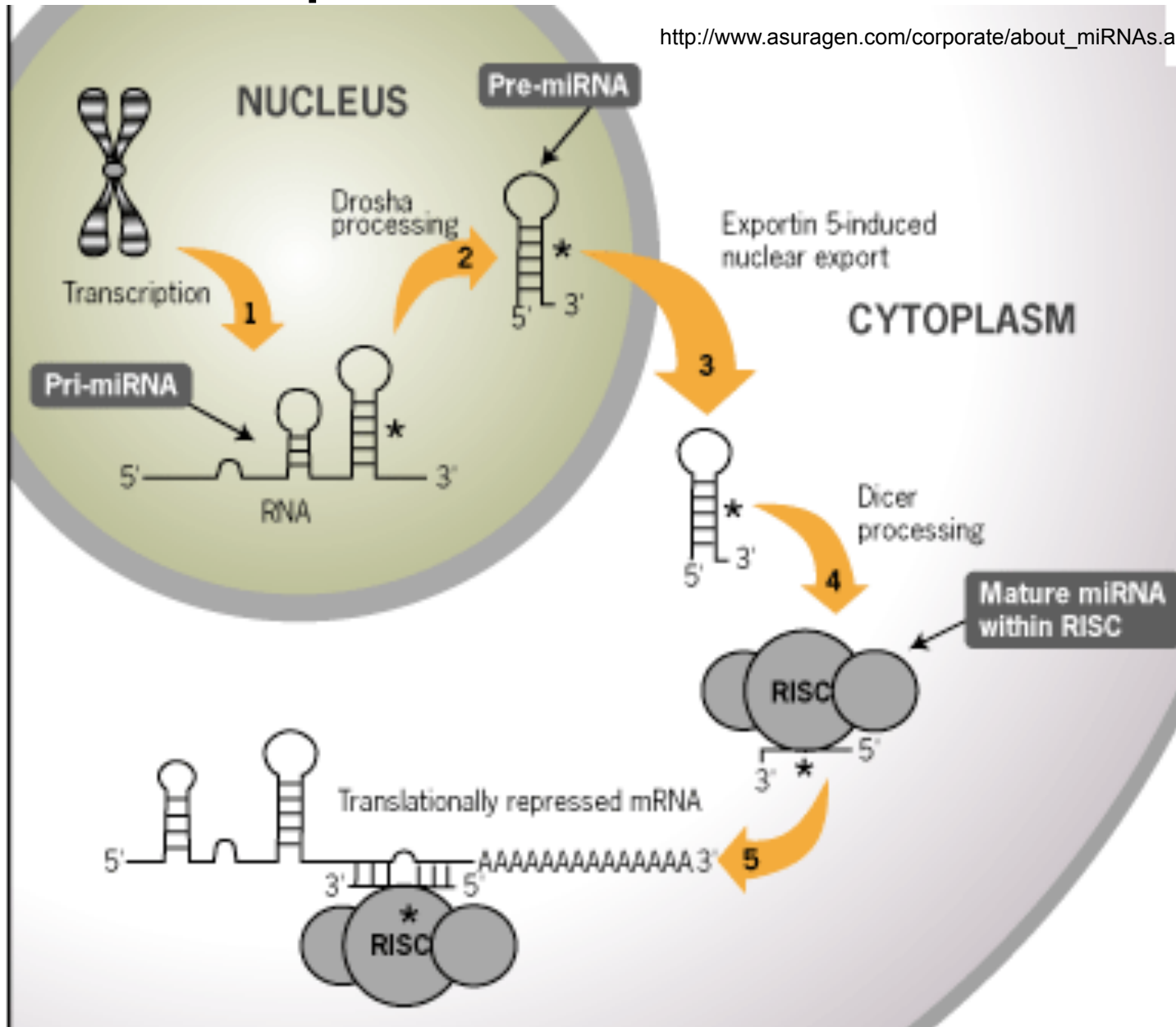


- miRNA maduro é reconhecido pelo complexo RISC, é incorporado e processado em cadeia única
- O mRNA alvo é identificado e a sua tradução é impedida

# Tipos de RNAi: citoplasmáticos

## *microRNA: mecanismo*

[http://www.asuragen.com/corporate/about\\_miRNAs.aspx](http://www.asuragen.com/corporate/about_miRNAs.aspx)



Ver vídeo: <http://www.nature.com/nrg/multimedia/rnai/animation/index.html>

**RNAi**

**Uma nova classe de terapias  
genéticas**

# **RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas**

## Doenças de etiologia genética:

Provocadas quando há alguma alteração ao nível da sequência de DNA, o que leva à produção desregulada, anormal (ou ambas), de proteínas.

## Mecanismo terapêutico da molécula de RNAi em doenças genéticas:

Através da sua especificidade para a sequência alvo de mRNA, o RNAi pode ser utilizado para suprimir a expressão de proteínas anormais, causadoras de várias patologias.

# RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas

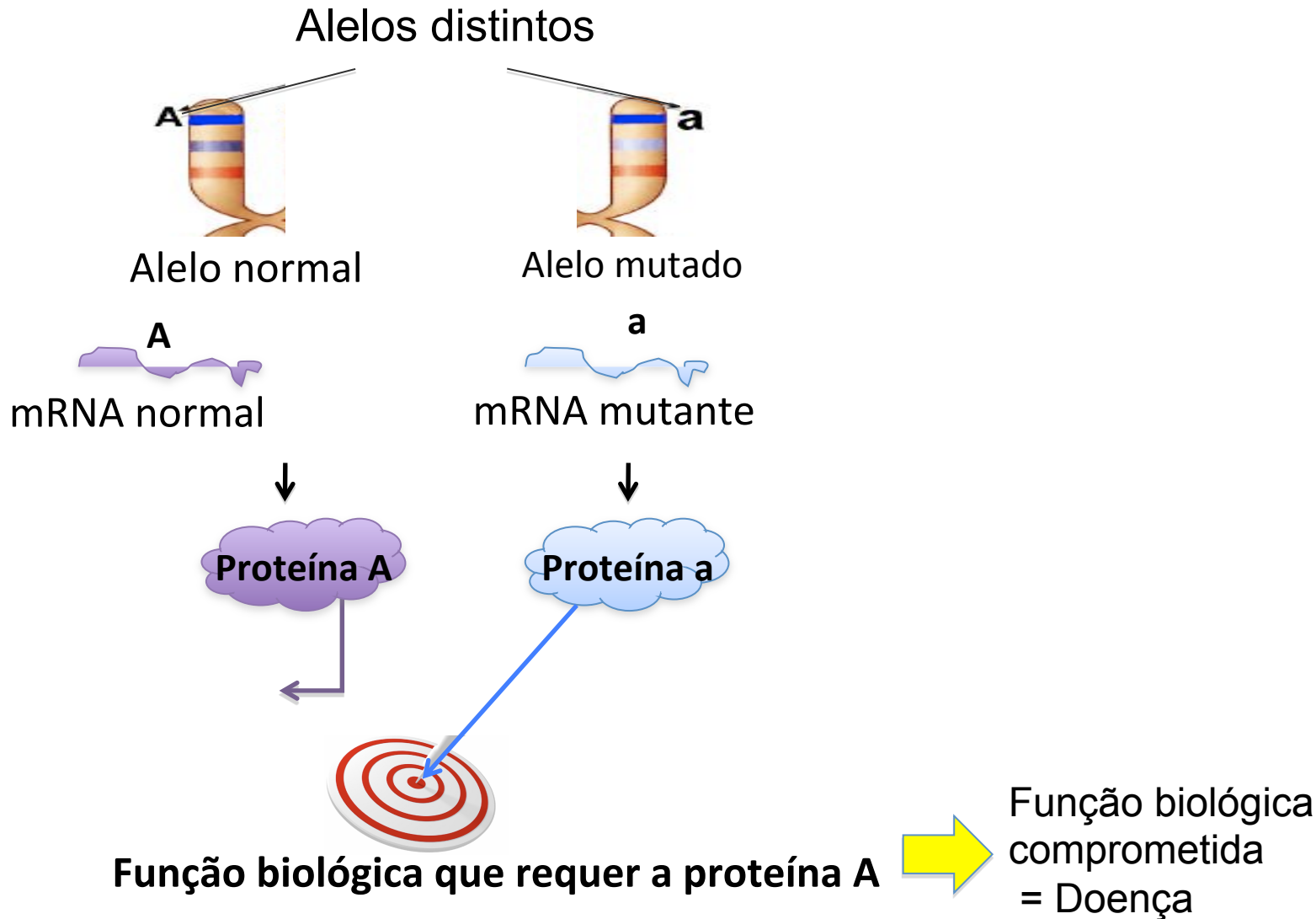
## Doenças genéticas:

- Não têm cura
- Fármacos que apenas aliviam os sintomas
- Fármacos bastante específicos
- RNAi é uma terapia com muito potencial, uma vez que consegue localizar qualquer tipo de sequência alvo (tanto no citoplasma, como no núcleo)
- RNAi poder ser usado como uma terapia altamente específica para uma sequência de nucleótidos, nunca havendo erros na supressão genética

# RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas

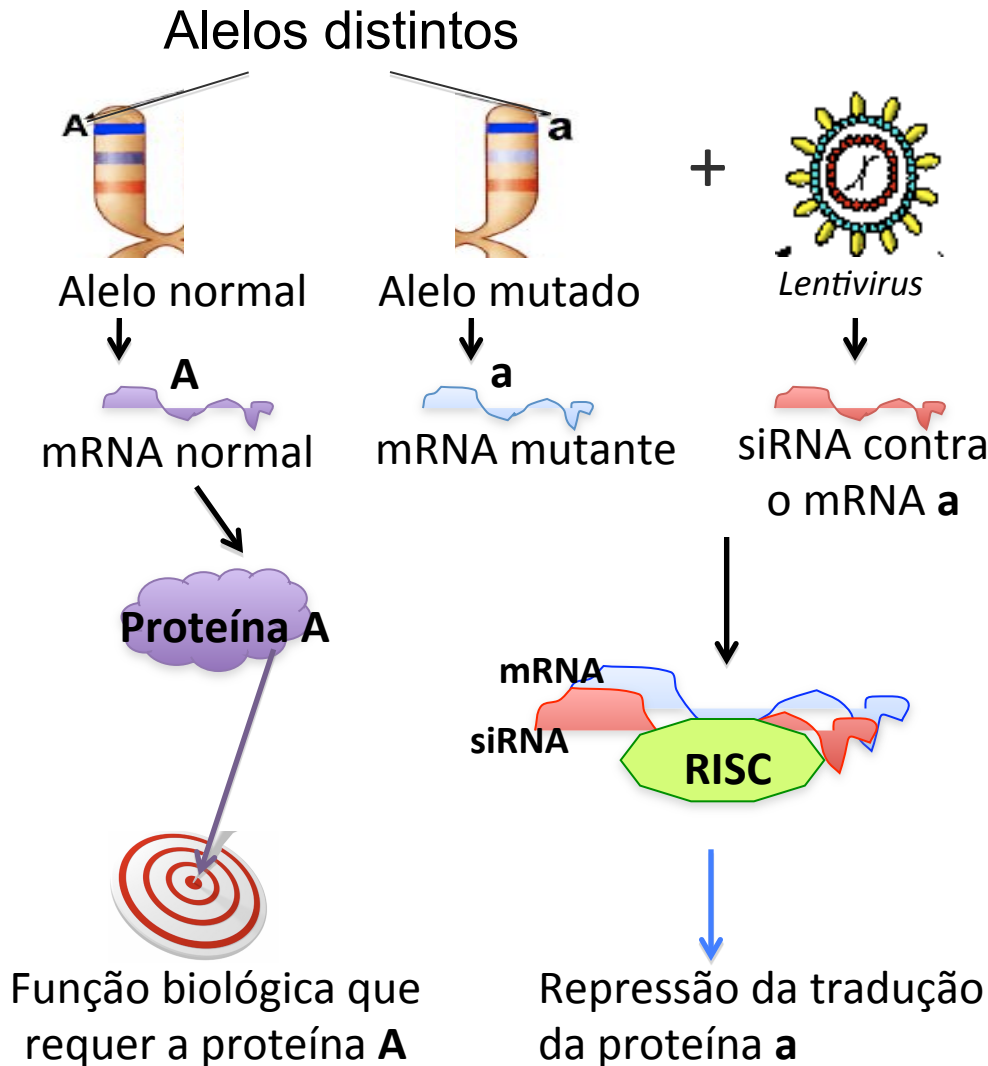
Doenças provocadas por mutações pontuais em indivíduos heterozigóticos:

*Negative Dominant human genetic diseases*



# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

RNAi: *Negative dominant human genetic diseases*



- É desenhado um RNAi específico contra o mRNA mutante, responsável pela doença

- Este RNAi é sintetizado e pode ser introduzido na célula através de agentes virais como o *lentivirus*

- O RNAi localiza o mRNA mutado, destruindo-o (através do complexo RISC)

- A função biológica pode ser restabelecida

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

**Desenho de siRNA específicos para um alelo mutado:**

*Gene walk strategy on a mRNA sequence*

“desenhar varias hipóteses de siRNA que incluam a mutação (*single nucleotide polymorfism – SNP*), ao longo da cadeia de mRNA que se quer silenciar”

Métodos:

1. Desenho de sequências complementares à cadeia mRNA alvo
2. Avaliação bioinformática das sequências
3. Introdução da sequência de siRNA num vector de transporte ao organismo
4. Ensaio *in vitro* (células)
5. Ensaio *in vivo* (organismos modelo)

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

## 1. Desenho de sequências complementares à cadeia mRNA alvo



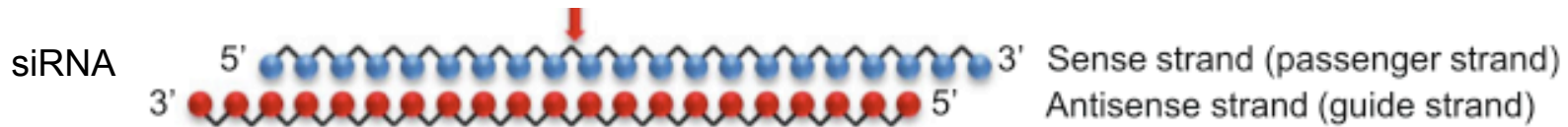
A união do complexo RISC deve ser desenhada no centro da molécula de forma a evitar *mismatches* durante o processo biológico

- O siRNA deve ser desenhado numa zona circundante ao SNP
- O mRNA mutado difere apenas num nucleótido (SNP) em relação ao mRNA normal, o que requer uma molécula de RNAi 100% complementar.
- A especificidade do siRNA deve ser total para o mRNA mutado, de forma a não silenciar a expressão da proteína normal

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

## 1. Desenho de sequências complementares à cadeia mRNA alvo

Sítio de união com o complexo RISC



```
5' GCAAGACACCAACAUGCCUdTdT 3' si-1
5' CGCAAGACACCAACAUGCCdTdT 3' si-2
5' GCGCAAGACACCAACAUGCdTdT 3' si-3
5' UGCGCAAGACACCAACAUGdTdT 3' si-4
5' UUGCGCAAGACACCAACAUDdTdT 3' si-5
5' AUUGCGCAAGACACCAACAdTdT 3' si-6
5' CAUUGCGCAAGACACCAACdTdT 3' si-7
5' ACAUUGCGCAAGACACCAAdTdT 3' si-8
5' CACAUUGCGCAAGACACCAAdTdT 3' si-9
5' UCACAUUGCGCAAGACACCCdTdT 3' si-10
5' GUCACAUUGCGCAAGACACdTdT 3' si-11
5' AGUCACAUUGCGCAAGACAdTdT 3' si-12
5' CAGUCACAUUGCGCAAGACdTdT 3' si-13
5' GCAGUCACAUUGCGCAAGAdTdT 3' si-14
5' AGCAGUCACAUUGCGCAAGdTdT 3' si-15
5' CAGCAGUCACAUUGCGCAAAdTdT 3' si-16
5' UCAGCAGUCACAUUGCGCAdTdT 3' si-17
5' GUCAGCAGUCACAUUGCGCdTdT 3' si-18
5' UGUCAGCAGUCACAUUGCGdTdT 3' si-19
```

Lista de siRNA  
candidatos para  
mRNA alvo  
(mutante)



Avaliação  
bioinformática  
dos  
candidatos

```
3' ...GGUAGAAACAGUCGUCAGUGUAACCGGUUCAGAGGUUGUACGGA...5
3' ...GGUAGAAACAGUCGUCAGUGUAACGGUUCAGAGGUUGUACGGA...5
```

mRNA Mutante  
mRNA Normal

SNP

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

## 2. Avaliação bioinformática das sequências candidatas

Elimina efeitos mínimos em sequências complementares que não sejam alvo da terapia o que resulta em:

- Aumento da especificidade da terapia
- Aumento da eficácia terapêutica
- Evita o silenciamento de genes não alvo
- Diminuição de toxicidade

Avalia a conservação entre espécies das sequencias de RNAi desenhadas

Só desta forma é possível proceder a ensaios *in vitro* (através de cultivos celulares) e *in vivo* (em espécies modelo)

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

## 3. Introdução da sequência de siRNA num vector de transporte ao organismo

Depois da identificação de um siRNA candidato este é inserido num vector que pode ser um plasmídeo ou um vírus

siRNA

GACUCCAGUGGUAUUCUACUU  
UUCUGAGGUCACCAUUAGAUG



shRNA

(short hairpin RNA)

GACUCCAGUGGUAUUCUACU<sup>UCA</sup>  
UUCUGAGGUCACCAUUAGAUG<sup>A</sup>  
GAG



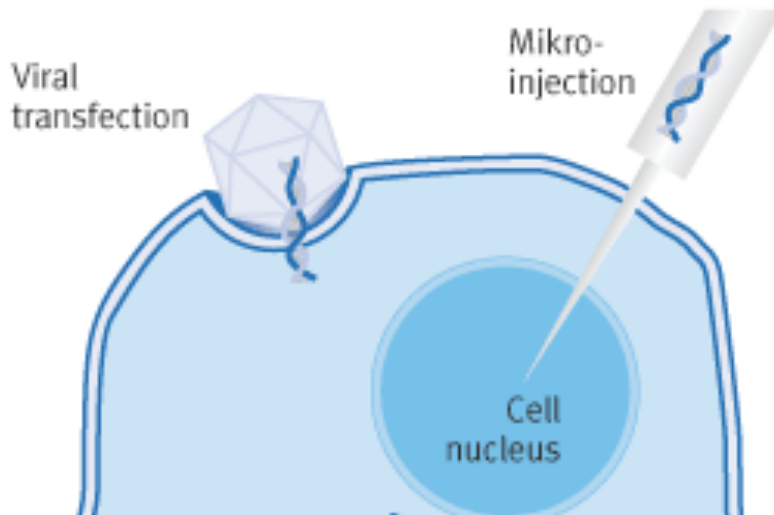
shRNA é inserido num vector que contem dois promotores que asseguram a sua transcrição: U6 e H1



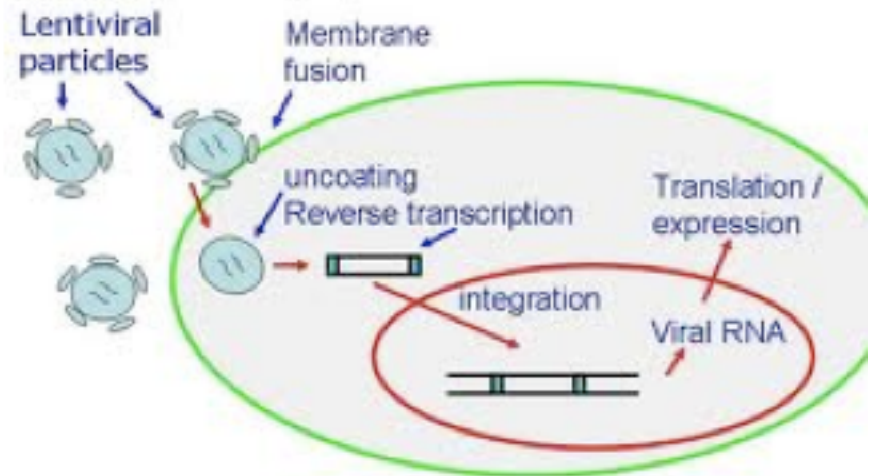
# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

## 3. Introdução da sequência de siRNA num vector de transporte ao organismo

Um vez preparado o vector pode ser inserido em células através de transfecção ou micro-injeção.



### Mecanismo de ação de um *lentiviral vector*



Uma vez construído o vector pode ser injetado diretamente no núcleo das células afectadas, ou inserido através de vírus capazes de realizar transcrição reversa.

# RNAi: Uma nova classe de Terapias genéticas

4. Uma vez estabelecida a forma de introduzir o RNAi no sistema desejado, são realizados os primeiros ensaios de toxicidade e dose resposta *in vitro*.

5. Uma vez estável *in vitro*, são realizados ensaios *in vivo*, sendo os mais importantes os ensaios em vertebrados, uma vez que são mais aproximados há realidade humana.

# RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas

Exemplos de patologias para as quais já foram testadas terapias genéticas baseadas no mecanismo de RNAi em animais modelo (vertebrados):

- Esclerose lateral amiotrófica (Ralph et al 2005)
- Ataxia espinocerebelar tipo 3 (Xia et al. 2004)
- Síndrome de Huntington's (Harper et al. 2005)
- Demência fronto-temporal (Yamamoto et al. 2000)
- Doença de Parkinson (Abeliovich et al. 2000)
- Alzheimer (Rodriguez-Lebron et al. 2009)
- Anemia falciforme (Dykxhoorn et al. 2006)

# RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas

RNAi: Em doenças exógenas

O RNAi pode ser usado para silenciar genes causadores de doença, codificados por agentes patogénicos.

Exemplos:

Vírus da Imunodeficiência humana (HIV)

Vírus da hepatite C

Vírus da hepatite B

Vírus Semliki Forest

# **RNAi: Uma nova classe de terapias genéticas**

Embora o RNAi tenha demonstrado ser uma ajuda potente em casos de doenças genéticas, este ainda não está disponível para tratamentos em humanos.

## **Problemas à extrapolação de terapias com RNAi aos humanos:**

- A terapia de RNAi consiste em inserir novos genes no genoma de um indivíduo (transgênese) → Problemas éticos
- Um dos maiores problemas é a tecnologia de distribuição de RNAi num organismo: há uma concentração adequada a cada caso; Aplicação do RNAi deve ser feita apenas em tecidos e células específicas.
- Atualmente o RNAi é usado como uma tecnologia bastante robusta principalmente na genómica funcional e comparativa.

# **RNAi em *Caenorhabditis elegans***

*Estratégias genómicas em  
investigação básica*

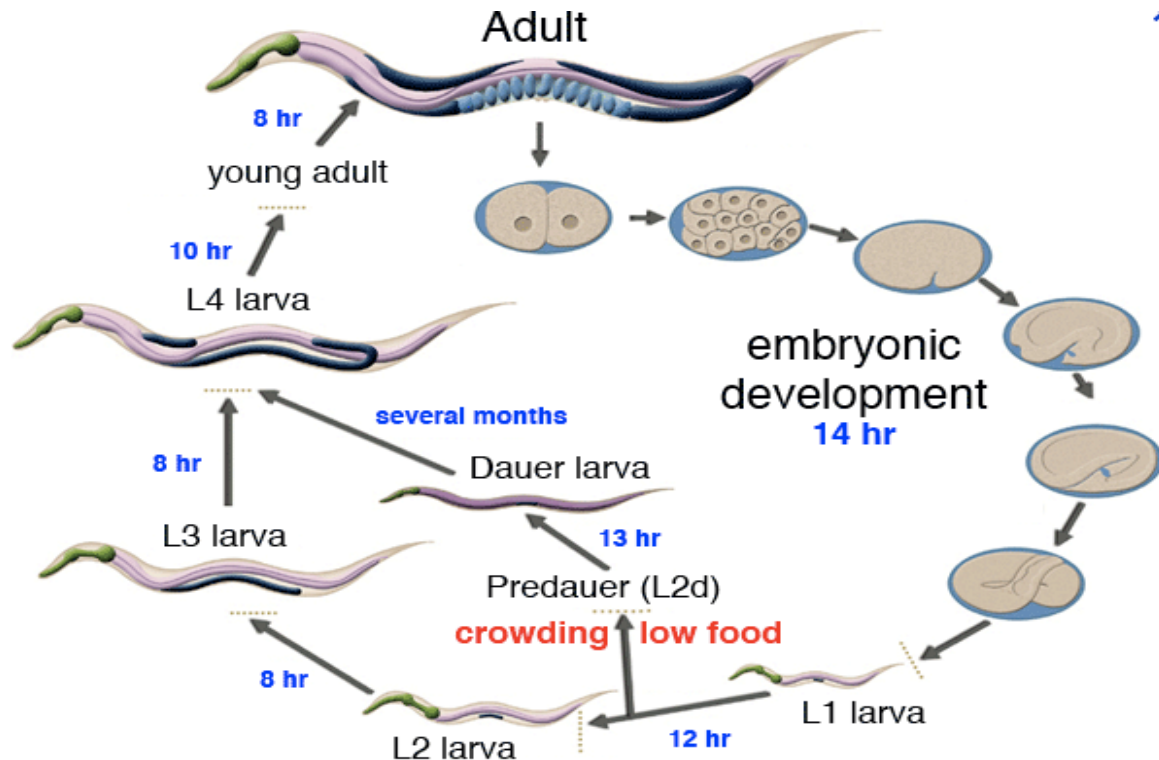
# RNAi: Investigação básica

## Estratégias genómicas em *C. elegans*

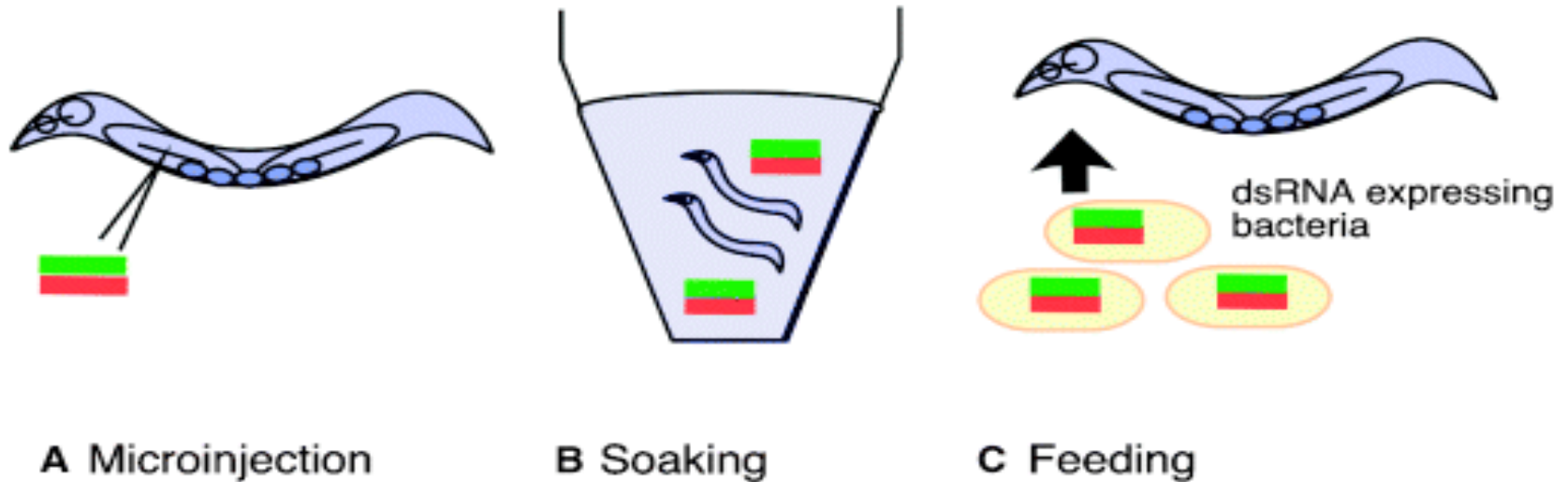
- RNAi pode ainda ser usado no laboratório de investigação em biologia básica-comparativa

- Neste ramo da biologia estudam-se processos biológicos desconhecidos e comuns entre espécies.

- O nemátodo *C. elegans* é frequentemente usado devido a várias características que fazem desta espécie um bom animal modelo



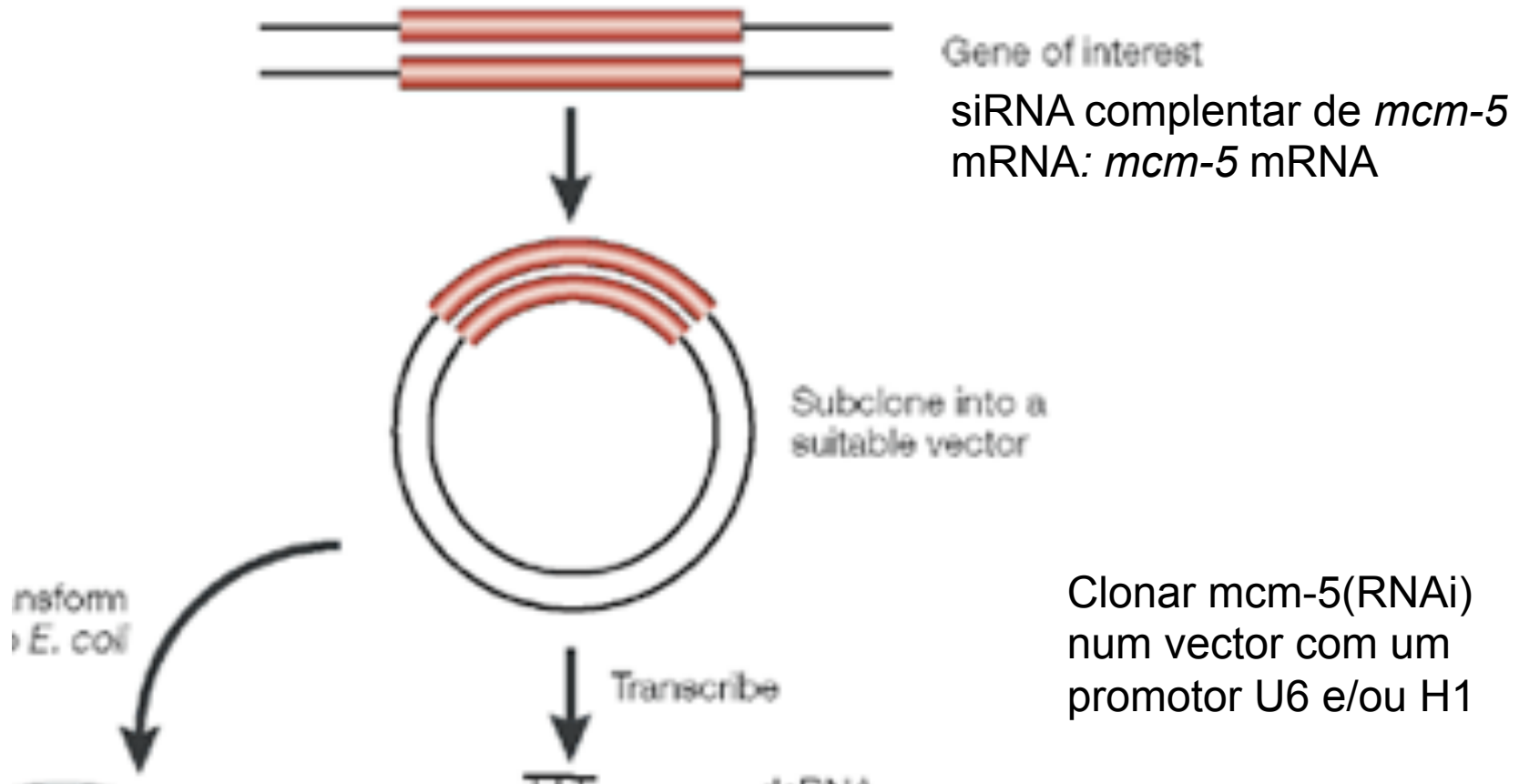
# RNAi: Investigação básica



- RNAi é facilmente incorporado no genoma de *C. elegans* através de métodos relativamente fáceis
- Desta forma é possível interferir com a expressão de determinados genes essenciais a um determinado processo biológico.
- Pode-se assim investigar como se organizam diferentes intervenientes num processo biológico.

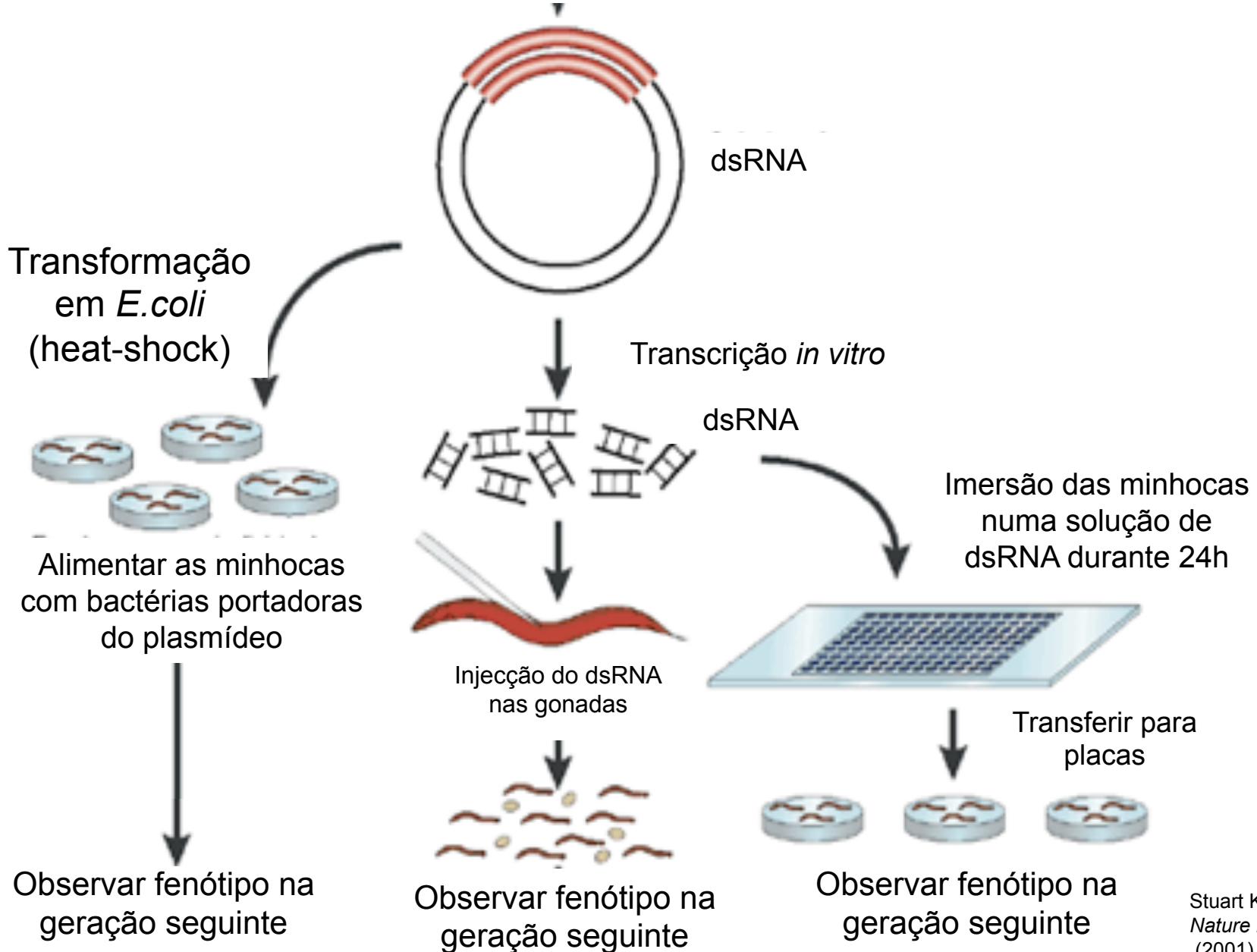
# RNAi: Investigação básica

*Exemplo: silenciamento do gene mcm-5 (regulação do ciclo celular)*



# RNAi: Investigação básica

Exemplo: silenciamento do gene *mcm-5* (regulação do ciclo celular)



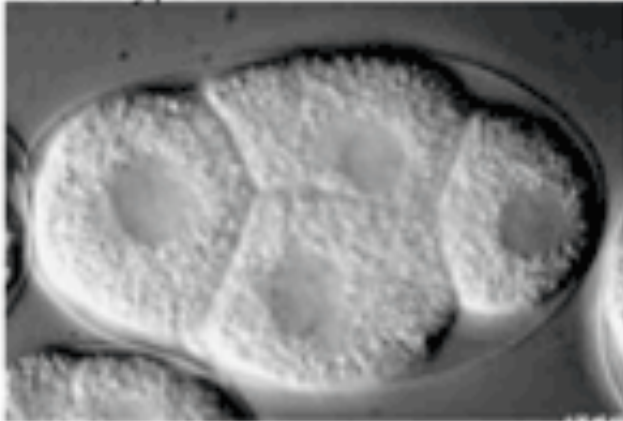
# RNAi: Investigação básica

*Exemplo: silenciamento do gene mcm-5 (regulação do ciclo celular)*

→ *Resultados: Observação do fenótipo:*

Controlo

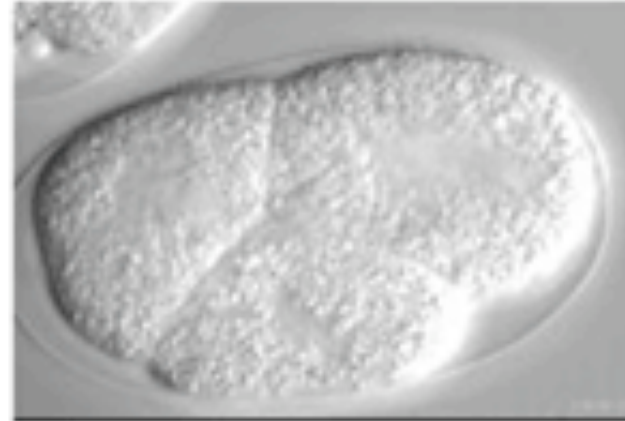
Wild-type



Fenótipo:  
Normal (controlo):  
4 células  
4 núcleos perfeitos

mcm-5(RNAi)

mcm-5



Fenótipo:  
Núcleos com forma irregular  
Divisões celulares bastante atrasadas  
e assimétricas  
(apenas 3 células)

# RNAi

## Referências:

The many faces of RNAi. Ketting RF. Dev Cell. 2011 Feb 15;20(2):148-61. Review. PMID: 21316584

RNAi: a potential new class of therapeutic for human genetic disease. Seyhan AA. Hum Genet. 2011 Nov;130(5):583-605. Epub 2011 May 3. Review. PMID: 21537948

Biochemical principles of small RNA pathways. Liu Q, Paroo Z. Annu Rev Biochem. 2010;79:295-319. Review. PMID: 20205586

C.Elegans: Mining the functional genomic landscape. Stuart K. Kim Nature Reviews Genetics 2, 681-689 (September 2001)

Genomic screening with RNAi: results and challenges. Mohr S, Bakal C, Perrimon N. Annu Rev Biochem. 2010;79:37-64. Review. PMID: 20367032

Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. Melnyk CW, Molnar A, Baulcombe DC. EMBO J. 2011 Aug 31;30(17):3553-63. doi: 10.1038/emboj.2011.274. Review. PMID: 21878996

Current prospects for RNA interference-based therapies. Davidson BL, McCray PB Jr. Nat Rev Genet. 2011 May;12(5):329-40. Review. PMID: 21499294