

Zjawisko interferencji RNA u zwierząt i ludzi

Współczesny „Świat RNA” to nie tylko mRNA, tRNA oraz rybosomy. To również inne rodzaje RNA, które biorą udział w różnych procesach zachodzących w żywej komórce. Jednym z mechanizmów, w którym bierze udział RNA jest wyciszanie genów. Dzisiaj jest to nie tylko jeden z procesów toczących się w żywych komórkach, ale również metoda dająca nadzieję na wykorzystanie w terapii, gdy pojawiają się trudności ze stosowaniem klasycznych metod leczenia.

Początków badań nad mechanizmem regulującym poziom RNA w komórce należy szukać w końcu lat 90. XX wieku. Najpierw trudne do wytłumaczenia zmiany poziomu mRNA zaobserwowano podczas prób wyhodowania nowej odmiany petunii ogrodowej (*Petunia hybrida*). Zaobserwowane wówczas zjawisko nazwano kosupresją [1]. Podobne zjawisko zaobserwowano u grzyba *Neurospora Crassa*. W tym przypadku wprowadzenie do genomu grzyba fragmentów genów biosyntezy karotenoidów *albino-1* oraz *albino-2* powodowało wyciszenie aktywności odpowiednich genów endogennych. W efekcie działania transgenów otrzymywano formę albinotyczną z niezabarwionymi na pomarańczowo konidiami [2]. Kolejny krok nastąpił gdy opisany został nowy, dodatkowy mechanizm potranskrypcyjnej regulacji RNA w komórkach *Caenorhabditis elegans*. Do komórek nicienia wprowadzono dwuniciowy dsRNA. Jedna z jego nici była komplementarna względem fragmentu mRNA wybranego genu. W efekcie poziom tego mRNA w komórce spadał, a związany z nim gen ulegał wyciszeniu. Oznacza to wyciszenie genu zapisanego w tym mRNA. W przypadku *Caenorhabditis elegans* badano aktywność genu *unc-22*, kodującego białko miofilamentowe komórek mięśniowych. Obniżenie poziomu tego białka powoduje powstanie fenotypu,

którego cechą charakterystyczną jest skurczone ciało (ang. *twitching phenotype*). Całkowity brak owego białka powoduje uszkodzenie aparatu kurczliwego komórek mięśniowych i ogranicza możliwości ruchu zwierzęcia. Wprowadzenie do organizmu poprzez jelito dwuniciowych dsRNA o długości 742 nukleotydów, odpowiadających segmentowi kodującemu mRNA genu *unc-22* powodowało w następnym pokoleniu na około 200 złożonych jaj pojawienie się około 100 osobników z fenotypem *twitching* [3]. Zjawisko to nazwano interferencją RNA.

W przypadku roślin można mówić o potranskrypcyjnym wyciszaniu genów (ang. *post-transcriptional gene silencing* - PTGS) lub o kosupresji. W przypadku grzybów proces nazwano tłumieniem genów (ang. *gene quelling*).

Wszystkie te mechanizmy występujące u roślin, grzybów i zwierząt mają bardzo podobny sposób działania, którego podstawowym elementem są krótkie duplekisy RNA zwane siRNA (ang. small interfering RNA).

Ze względu na duże podobieństwo uznano, że są to odmiany starego mechanizmu obronnego pierwszych eukariontów pozwalającego na kontrolę inwazji obcych kwasów nukleinowych do wnętrza komórki. Po rozejściu się dróg ewolucyjnych eukariontów, mechanizm u każdego z nich ewoluował wraz z rozwojem roślin, grzybów czy zwierząt (bezkęgowców i kręgowców) [4].

Za odkrycie interferencji RNA Andrew Z. Fire oraz Craig C. Mello w 2006 roku otrzymali nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii.

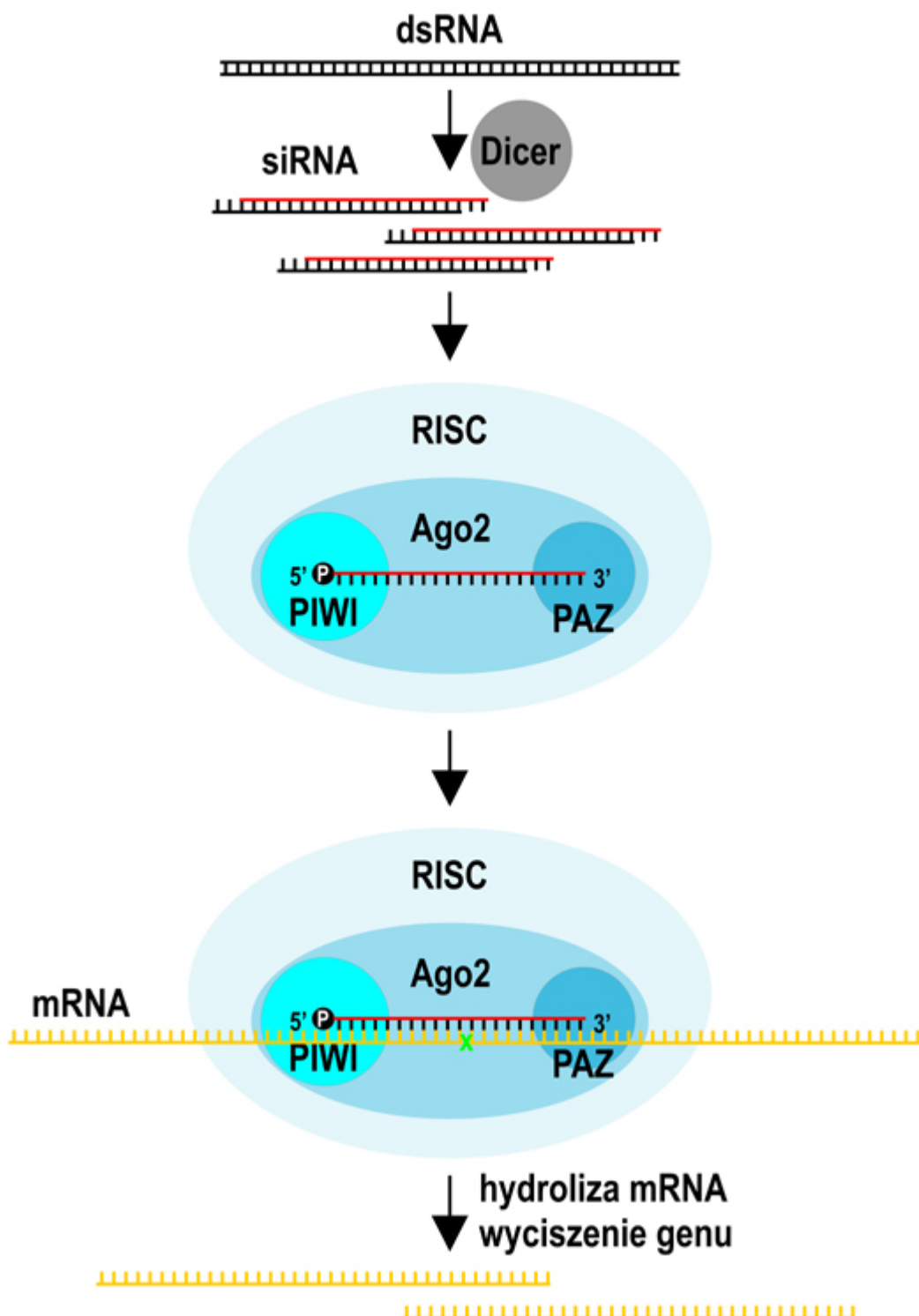
Mechanizm działania interferencji RNA

Komórki eukariotyczne zabezpieczone są przed inwazją obcych wirusów czy transpozonów. Pojawienie się dwuniciowego RNA (dsRNA) może być efektem ekspresji trans genu, lub replikacji wirusowego genomu RNA. Gdy w komórce znajdzie się dwuniciowy RNA jest uruchamiany obronny mechanizm enzymatyczny złożony z rybonukleazy Dicer specyficznej względem dsRNA oraz kompleksu nukleazowego RISC.

Zaproponowano dwa mechanizmy działania.

W pierwszym z mechanizmów dsRNA jest cięty przez wielodomenową nukleazę Dicer do krótkich odcinków liczących sobie od 21 do 23 par zasad. Następnie powstałe w ten sposób produkty hydrolizy są włączane do kompleksu RISC (ang. *RNA-induced silencing complex* - indukowany przez RNA kompleks wyciszający),

który jest kierowany do docelowej sekwencji mRNA. Znajdująca się w RISC endorybonukleaza wykorzystuje antysensowną nić siRNA do odnalezienia komplementarnego do niej fragmentu mRNA. Z tego powodu siRNA bywa nazywany dupleksem kierującym. Specyficzność mechanizmu RNAi opiera się na dokładnym sparowaniu antysensownej nici siRNA z docelowym mRNA. Jeżeli takie sparowanie dojdzie do skutku endorybonukleaza degradowuje komplementarną sekwencję mRNA [5].



Ryc. 1 Mechanizm działania RNAi. Opracowanie własne.

Drugi mechanizm oparty jest na tak zwanym „degradacyjnym PCR”. Jest to próba wyjaśnienia katalitycznego charakteru RNAi u wspomnianego już nicienia *Caenorhabditis elegans*. Ciekawą właściwością RNAi u tego nicienia jest przenoszenie inaktywacji genu do nietrasfekowanych komórek i tkanek oraz utrzymywanie się tego zjawiska mimo występujących podziałów komórkowych

także w kolejnych pokoleniach.

Został zaproponowany mechanizm, w którym polimeraza zależna od RNA (RdRp – *RNA-dependent RNA polymerase*) na matrycy mRNA syntetyzuje nić komplementarną, budując nowy dwuniciowy RNA. Jest on rozpoznawany i hydrolizowany przez rybonukleazę Dicer. W ten sposób powstaje kolejna generacja siRNA. Starterem reakcji jest antysensowna nić siRNA z grupą hydroksylową na końcu 3'. Brak lub modyfikacja tej grupy blokuje proces amplifikacji dsRNA [6].

Mechanizm oparty na „degradacyjnym PCR” nie został zaobserwowany w komórkach muszki owocówki (*Drosophila melanogaster*), jak też w ssaczach.

W przypadku ssaków RNAi nie jest uznawany za naturalny mechanizm hamowania ekspresji genów. Udowodniono natomiast, że syntetyczne siRNA mogą bardzo udanie naśladować produkty hydrolizy rybonukleazy Dicer. Dzięki temu są rozpoznawane przez kompleks RISC i mogą wpływać na wyciszenie wybranych genów.

Zauważono, że długie dupлекsy liczące powyżej 30 par zasad mogą w większości komórek somatycznych wywoływać obok interferencji RNA również szereg niespecyficzných odpowiedzi. Wyjątkiem są komórki rozrodcze, embriony oraz komórki somatyczne pozbawione systemu odpowiedzi immunologicznej. Tych cech nie wykazują krótsze liczące 21-23 nukleotydy dupлекsy, również otrzymane syntetycznie [7].

Budowa siRNA

siRNA powstające w wyniku hydrolizy dsRNA w komórce przez Rybonukleazę Dicer wykazują się charakterystyczną budową. Obie nici mierzą do 21 do 23 nukleotydów. Tworzą dupлекs na odcinku 19 par nukleotydów pozostawiając dwa lub więcej wolnych nukleotydów na końcach 3'. Na końcu 3' znajduje się wolna grupa hydroksylowa natomiast na końcu 5' grupa fosforanowa. Obecność grupy fosforanowej na końcu 5' nici antysensownej ma wpływ na występowanie procesu interferencji RNA. Grupa ta została nawet określona jako punkt odniesienia od którego mierzone jest miejsce hydrolizy mRNA przez endonukleazę znajdującą się w kompleksie RISC [8]. Kompleks RISC wybiera na nić kierującą tą, której 5'-koniec jest słabiej zaangażowany w wiązania typu Watsona-Cricka z drugą nicią budującą dupлекs siRNA.

Białka uczestniczące w RNAi

Pierwszym białkiem jest rybonukleaza Dicer. Należy ona do rodziny RNazIII, które z kolei dzielą się na trzy klasy. Białka należące do każdej z tych klas posiadają przynajmniej dwie domeny: RNazyIII oraz domenę wiążącą dsRNA. Charakterystyczną cechą białek z klasy trzeciej jest występowanie domeny PAZ. Posiadają ją nukleazy Dicer u muszki owocówki oraz u ludzi. Domena PAZ zbudowana jest ze 110 aminokwasów, rozpoznaje i wiąże się z niesparowanymi końcami 3' dsRNA. Rozpoznanie końca 3' odbywa się poprzez dopasowanie przestrzenne [9].

Kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex* - indukowany RNA kompleks wyciszający) grupuje białka, z których najważniejsze jest białko z rodziny *Argonaute* (Argonaute2 - Ago2). Ago2 należy do rodziny konserwatywnych białek występujących u eukariotów oraz u części organizmów prokariotycznych. Białka z tej rodziny posiadają domeny N-terminalną, PAZ, domenę środkową zbliżoną do Lac-Z, oraz PIWI. W obrębie domeny PAZ zidentyfikowana została kieszeń wiążąca fragmenty RNA złożone z dwóch nukleotydów znajdujących się na końcu 3'. Domena PIWI posiada aktywność katalityczną zbliżoną do RNazy H. Podobnie też jak RNaza H, do aktywności katalitycznej wymaga obecności dwuwartościowych jonów metali [10]. W obrębie domeny PIWI zidentyfikowana została kieszeń wiążąca grupę 5' fosforanową nici kierującej siRNA. Region 5' nici kierującej siRNA jest niezbędny do precyzyjnego odmierzenia miejsca hydrolizy w nici mRNA. Przecięcie mRNA następuje w miejscu znajdującym się na przeciwko wiązania pomiędzy dziesiątym i jedenastym nukleotydem nici kierującej.

Białko Ago2 wraz z odpowiednio dobranym siRNA może prowadzić do wyciszenia genu [11]. Poza tym, w kompleksie RISC można też znaleźć białko VIG, które wiąże RNA, występują też białka o aktywności helikalnej, Tudor-SN.

Wykorzystanie siRNA w medycynie

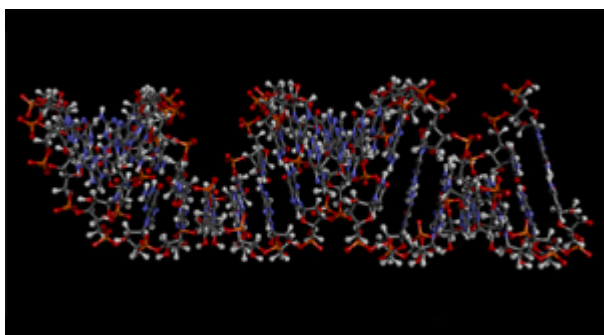
Krótkie odcinki RNA wyciszające ekspresję wybranych genów wydają się być przydatnym narzędziem terapeutycznym. Szczególnie mogą one być przydatne w tych przypadkach, gdzie można wyciszyć gen przenoszący niebezpieczną mutację. Stąd też wiele badań prowadzonych jest pod kątem wykorzystania interferencji RNA w chorobach nowotworowych poprzez ograniczenie produkcji białek powodujących namnażanie wirusów takich jak HIV, zapalenia wątroby typu B i C, czy wirusa grypy typu A [12]. W przypadku wirusa HIV projektuje się siRNA

mające służyć degradacji mRNA receptorów CD4 [13] i CCR5 [14], dzięki którym wirus wnika do komórek gospodarza.

Kolejną grupą chorób, gdzie pojawiają się nadzieje na wykorzystanie siRNA w terapii są choroby autoimmunologiczne, neurodegeneracyjne i nowotworowe. Zastosowanie RNAi w nowotworach polegałoby na wyciszeniu genów wpływających na niekontrolowany wzrost komórek. Terapie stosowane w chorobach nowotworowych celowane są na geny, które w wyniku mutacji punktowych nie spełniają swojej fizjologicznej roli: geny *ras* oraz *p53*.

RNAi stosowane jest też do badań procesu angiogenezy.

Z dostępnych danych wynika, że maksymalne działanie siRNA w komórkach obserwowano po 36-48 godzinach od momentu wprowadzenia do nich interferencyjnego RNA. Natomiast po 96 godzinach działanie siRNA zanikało. Oznacza to konieczność dość częstego wprowadzania do organizmu kolejnych porcji siRNA, aby utrzymać wyciszenie wybranego genu [15]. Najdłużej utrzymujący się efekt wyciszenia genów związany z wprowadzeniem syntetycznego siRNA był obserwowany w niedzieliących się komórkach neuronalnych i wynosił 21 dni [16]. Nadzieją na wydłużenie tego procesu jest opracowanie wektorów zapewniających stabilną i bezpieczną dla pacjenta ekspresję siRNA w jego organizmie. Istotnym problemem jest wprowadzenie krótkich RNA do komórki. W przypadku doświadczeń *in vitro* siRNA wprowadzane są do komórek w kompleksach z lipofilowymi odczynnikami polikationowymi, lub z kapsydowymi białkami wirusowymi. W badaniach klinicznych siRNA podawane są domięscowo - na przykład do oka lub nosa (aerozole), ale również systemowo - dożylnie lub podskórnie [17]. Zastosowanie nanocząsteczek opłaszczonych ligandami receptorów powierzchniowych specyficznych dla poszczególnych typów komórek jest interesującym pomysłem, który ma szansę zostać wykorzystanym w podawaniu siRNA ogólnoustrojowo [18].



RNAi to nie tylko mechanizm regulacji genów, ale też nadzieja medycyny.

Dupleks siRNA komplementarny do mRNA EGFP. Źródło: intechopen.com - "Gene Therapy - Tools and Potential Applications", Autorzy: IS Blagbrough, AA. Metwally, licencja CC BY 3.0

Interferencja RNA jest ciekawym procesem regulacji ekspresji genów, polegającym na degradacji mRNA indukowanej przez krótkie dupleksy RNA pochodzenia endogennego lub egzogennego. Odkrycie tego zjawiska słusznie zostało uhonorowane nagrodą Nobla. Odkryto bowiem nie tylko kolejny mechanizm regulacyjny występujący w komórce, ale także potencjalnie narzędzie dla nauki i medycyny. Wysoka specyficzność siRNA budzi nadzieje na wykorzystanie RNAi zarówno w analizie funkcji poszczególnych genów jak i w specjalistycznych terapiach. Można się spodziewać, że w najbliższych latach prowadzone obecnie badania zakończą się wprowadzeniem do powszechnego użytku leków opartych o mechanizm RNAi.

Piśmiennictwo

1. Napoli C. et al. [Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans](#). Plant Cell, 1990, 2, 4: 279-289.
2. Romano N. et al. [Quelling: transient inactivation of gene expression in Neurospora crassa by transformation with homologous sequences](#). Mol Microbiol, 1992, 6, 22: 3343-53.
3. Fire A. et al. [Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans](#). Nature, 1998, 391: 806-811.
4. Szweykowska-Kulińska Z. i wsp. [RNAi, PTGS i quelling – trzy wariacje na jeden temat?](#) Biotechnologia, 2003, 2, 61: 54-66.
5. Hannon GJ. [RNA interference](#). Nature, 2002, 418, 6894: 244-51.
6. Lipardi C. et al. [RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs](#). Cell, 2001, 107, 3: 297-307.
7. Elbashir S. et al. [RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs](#). Genes Dev, 2001, 15, 2: 188-200.
8. Sierant M, Nawrot B. Krótkie interferencyjne RNA jako narzędzia do sekwencyjno-specyficznego wyciszenia ekspresji genów. Biotechnologia, 2003, 2,

61: 84-103.

9. Agrawal N. et al. [RNA interference: biology, mechanism, and applications](#). Microbiol Mol Biol Rev, 2003, 67, 4: 657-85.

10. Liu J. et al. [Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi](#). Science. 2004, 305, 5689: 1437-41.

11. Rivas FV. et al. [Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC](#). Nat.Struct.Mol.Biol. 2005, 12, 340-349.

12. Uprichard SL. [The therapeutic potential of RNA interference](#). FEBS Lett. 2005, 579, 26: 5996-6007.

13. Ahlenstiel Ch. et al. [Controlling HIV-1: Non-Coding RNA Gene Therapy Approaches to a Functional Cure](#). Front Immunol. 2015, 6: 474.

14. Zhou J, Rossi JJ. [Current progress in the development of RNAi-based therapeutics for HIV-1](#). Gene Ther. 2011, 18, 12: 1134-1138.

15. Ryther RC. et al. [siRNA therapeutics: big potential from small RNAs](#). Gene Ther. 2005, 12, 1:5-11.

16. Omi K. et al. [Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons](#). FEBS Lett. 2004, 558, 1-3:89-95.

17. Sipa K, Nawrot B. [Mechanizm interferencji RNA i wykorzystanie RNAi dla celów terapeutycznych](#). Farmakoterapia w Psychiatrii i Neurologii. 2008, 1: 7-18.

18. Kubiak K, Nawrot B. [RNAi w terapii](#). Biotechnologia, 2009, 1, 84: 132-151.

Data publikacji: 09.12.2016r.