

NAGRODA NOBLA 2006 ZA FUNDAMENTALNE ODKRYCIA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW U EUKARIONTÓW*

NOBEL PRIZE 2006 FOR FUNDAMENTAL DISCOVERIES
IN THE REGULATION OF EUKARYOTIC GENE EXPRESSION

Zofia SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA, Bogna SZARZYŃSKA

Zakład Ekspresji Genów, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Streszczenie: W 2006 roku Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny/fizjologii otrzymali dwaj amerykańscy badacze Andrew Fire i Craig Mello za fundamentalne odkrycia w regulacji ekspresji genów u eukariontów. Dowiedli, że obecność dwuniciowego RNA w komórkach indukuje mechanizm prowadzący do specyficznego wyciszenia aktywności genu. Mechanizm ten nazwali interferencją RNA (RNAi). Dwuniciowy RNA jest w komórce rozcinany na krótkie, efektorowe RNA, zwane siRNA, które doprowadzają do wybiórczej degradacji docelowego mRNA. Proces zachodzi w cytoplazmie. Dwuniciowe RNA mogą pojawić się w komórce między innymi na skutek infekcji wirusowej lub jako produkty transkrypcji retrotranspozonów lub sekwencji nukleotydowych o odwróconej orientacji. Mechanizm ten obserwuje się u niemal wszystkich eukariontów, a jego pierwotnym zadaniem była najprawdopodobniej obrona komórki przed inwazyjnymi formami kwasów nukleinowych. Krótkie cząsteczki RNA są również kodowane przez jądrowe genomy eukariontów. Ich sposób działania jest bardzo podobny do sposobu działania siRNA. Są zaangażowane w regulację rozwoju oraz w odpowiedź komórki na zmiany w otoczeniu.

Słowa kluczowe: Nagroda Nobla, interferencja RNA, mikro RNA, regulacja ekspresji genów.

Summary: The 2006 Nobel Prize in Physiology or Medicine was awarded to two American scientists – Andrew Fire and Craig Mello for the fundamental discoveries in gene expression regulation in eukaryotes. They have shown that the presence of double-stranded RNA in the cell induces specific gene silencing. This phenomenon was called RNA interference – RNAi. Double-stranded RNA is digested in the cell to short effector RNAs, called siRNAs, which are directly responsible for the selective degradation of target mRNA. The process takes place in the cytoplasm. Double-stranded RNA may appear in the cell as a consequence of viral infection or as a product of transcription of retrotransposons or inverted – repeat sequences. The mechanism is present in almost all eukaryotes, and its primary goal was, most probably, the protection of the cell against

*Praca została przygotowana w ramach projektu finansowanego przez KBN – PB2-KBN-089/PO6/2003.

invasive forms of nucleic acids. Short RNAs have been also found to be encoded by endogenous, eukaryotic genes. Their mode of action closely resembles that of siRNA molecules. They are involved in the regulation of developmental processes and cell responses to environmental changes.

Key words: Nobel prize, RNA interference, micro RNA, gene expression regulation.

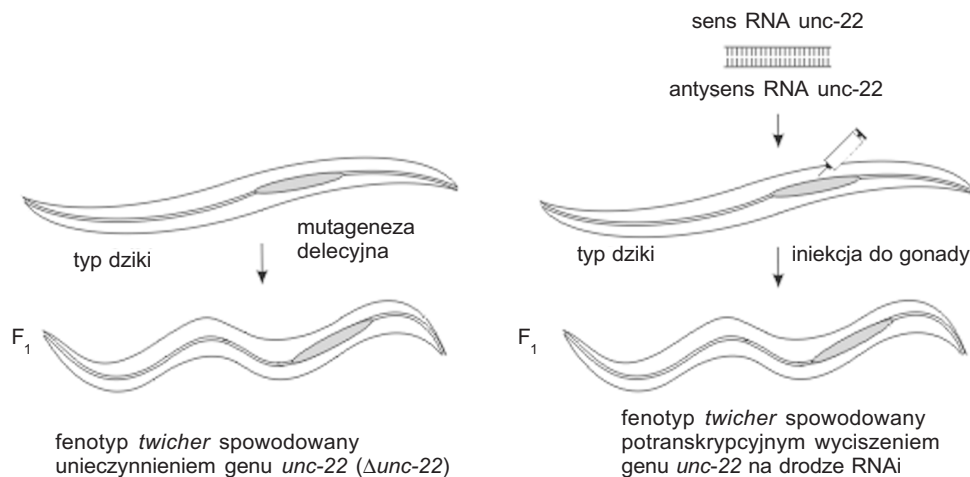
WSTĘP

Nagroda Nobla w zakresie medycyny i fizjologii przypadła w roku 2006 dwóm amerykańskim uczonym za fundamentalne odkrycia mechanizmów kontroli ekspresji genetycznej. Andrew Fire i Craig Mello, którzy są autorami odkrycia zjawiska interferencji RNA (RNAi), dokonania swe opublikowali w 1998 roku w *Nature* [7]. Co to jest interferencja RNA? Jest to proces, występujący u wszystkich przebadanych eukariontów, z wyjątkiem drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, a polegający na specyficznym wyciszeniu aktywności genu. Jest to bardzo ważny, a do czasu odkrycia przez Fire'a i Mello absolutnie nieznan, mechanizm regulacji ekspresji genów oraz sposób na ochronę komórki eukariotycznej przed inwazyjnymi formami kwasów nukleinowych (wirusy, transpozony). Przyjrzyjmy się eksperymentom wykonanym przez zespół badaczy, w którym główne role odgrywali nagrodzeni Fire i Mello.

HISTORIA ODKRYCIA INTERFERENCJI RNA

Z badań prowadzonych wcześniej przez wielu uczonych wynikało, że wprowadzenie do komórek eukariotycznych dodatkowej kopii genu, antysensownego lub sensownego RNA w stosunku do transkryptu może wywoływać zaburzenie funkcji endogennego genu. Pierwsze doniesienia na ten temat pojawiły się w 1990 roku [20]. Próbowano otrzymać transgeniczne osobniki petunii, których kwiaty miałyby intensywniejsze zabarwienie. Zamierzano tego dokonać poprzez zwiększenie w płatkach kwiatów roślin transgenicznych ilości barwników antocyjanowych. Wprowadzono zatem do roślin dodatkową kopię genu syntazy chalkonowej – kluczowego enzymu biosyntezy antocyjanów. Niestety, zamiast zwiększenia ilości barwników zaobserwowano w wielu roślinach całkowite zablokowanie ich biosyntezy. Zjawisko to nazwano kosupresją, gdyż wprowadzenie dodatkowej kopii genu, którego odpowiednik już znajdował się w genomie gospodarza, prowadziło do wyciszenia aktywności zarówno transgeny, jak i endogennego genu [20]. Podobne obserwacje opisywano u zwierząt. Wiadomo było, że pierwszy podział zygoty w trakcie embriogenezy *Caenorhabditis elegans* jest asymetryczny. Guo i Kemphues [9] zaobserwowali, że za tę asymetrię komórek siostrzanych odpowiada aktywność kinazy treoninowo/serynowej PAR-1. Iniekcja antysensownego RNA kinazy PAR-1 do gonady nicienia doprowadzała do zaniku aktywności tego białka – pierwszy podział dawał dwie komórki siostrzane identycznej wielkości. Ten sam efekt obserwowano, gdy do gonady nicienia wprowadzano sensowny RNA kinazy PAR-1. O ile efekt wywołany działaniem RNA typu antysens (asRNA)

wydawał się łatwy do wyjaśnienia (hybrydyzacja asRNA z mRNA endogennym miała uniemożliwiać translację mRNA), to efekty osiągane przy stosowaniu sensownego RNA (sRNA) już nie były łatwe do interpretacji. Od pierwszych obserwacji poczynionych na petunii w końcu lat osiemdziesiątych do końca lat dziewięćdziesiątych nie potrafiono wyjaśnić ich przyczyny. Przełomu w wyjaśnieniu tego zjawiska dokonali właśnie Fire i Mello demonstrując, że potranskrypcyjne wyciszenie genów zachodzi z niemal 100% wydajnością wskutek wprowadzenia do komórek *C. elegans* dwuniciowych fragmentów RNA. Jednym z testowanych pod kątem aktywności i możliwości wyciszenia był gen *unc-22*. Koduje on miofilamentowe białko komórek mięśniowych nicienia. Obecność aktywnego genu nie jest konieczna dla przeżycia osobnika. Jednak całkowite unieczynnienie genu (mutanty $\Delta unc-22$), a co za tym idzie, całkowity brak tego białka, doprowadza do wystąpienia charakterystycznego fenotypu określanego terminem = *twitcher* (fenotyp kurczenia ciała), spowodowanego poważnymi uszkodzeniami aparatu kurczliwego komórek mięśniowych i ograniczoną ruchliwością zwierzęcia. Iniekcja dwuniciowego RNA odpowiadającego fragmentowi genu *unc22* do gonad zdrowego zwierzęcia wywoływała u następnych pokoleń wystąpienie silnego fenotypu *twitcher* (ryc. 1). Analiza ilościowa mRNA genu *unc22* wykazała, że po iniekcji odpowiedniego dsRNA dramatycznie spada jego poziom lub też że ten specyficzny mRNA jest wręcz niewykrywalny, podczas gdy u zwierząt nietraktowanych dsRNA, poziom tego mRNA utrzymuje się na pewnym stabilnym poziomie. Ponadto stwierdzono, że wprowadzanie dsRNA odpowiadającego fragmentom egzonowym genu wywołuje wyciszenie aktywności genu, natomiast nie było tego efektu, jeśli dsRNA odpowiadał sekwencjom intronowym lub promotorowym genu. Ponieważ liczba wprowadzonych cząsteczek dwuniciowego RNA do gonad była daleko mniejsza niż liczba komórek we wszystkich osobnikach następnych pokoleń, w których obserwowano wyciszenie funkcji



RYCINA 1. Schemat eksperymentu Fire'a i innych [7], opis znajduje się w tekście

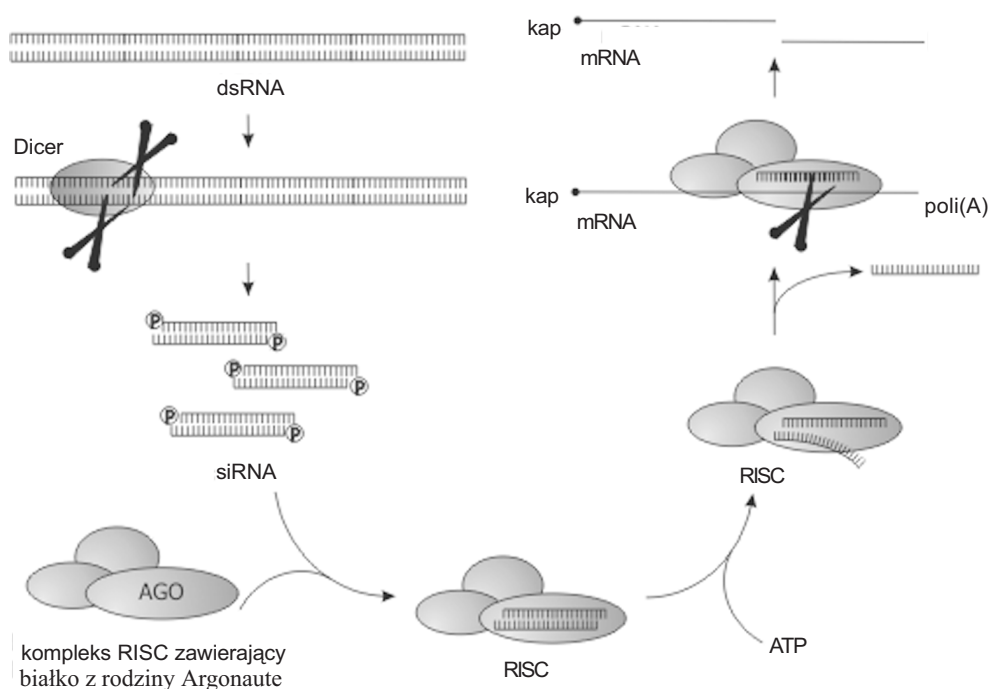
genu *unc22*, trzeba było znaleźć jakieś wyjaśnienie tego zjawiska. Dalsze obserwacje pozwoliły na wyciągnięcie wniosków, które doprowadziły do odkrycia nowego zjawiska interferencji RNA - RNAi:

1. wprowadzony do komórki dwuniciowy RNA o sekwencji odpowiadającej fragmentowi endogennego genu wycisza ekspresję tego genu;
2. wyciszenie przebiega potranskrypcyjnie, na poziomie dojrzałego mRNA, prawdopodobnie na terenie cytoplazmy;
3. wyciszenie polega na degradacji mRNA;
4. RNAi rozprzestrzenia się w organizmie i jest przekazywany następnym pokoleniom;
5. do wywołania RNAi wystarczy obecność zaledwie kilku cząsteczek dsRNA, co sugeruje działanie mechanizmu katalitycznego, amplifikującego dwuniciowe cząsteczki RNA;
6. RNAi jest zjawiskiem bardzo specyficznym; wprowadzenie dsRNA odpowiadającego konkretnemu genowi powoduje obniżenie poziomu tylko tego mRNA;
7. RNAi może być przydatnym narzędziem w genomice funkcjonalnej organizmów eukariotycznych.

MECHANIZM RNAi

Oczywiste i intrygujące było pytanie, w jaki sposób długie, dwuniciowe cząsteczki RNA wywołują degradację docelowego mRNA? Odpowiedzi dostarczyli naukowcy zajmujący się potranskrypcyjnym wyciszaniem genów u roślin. Hamilton i Baulcombe [10] jako pierwsi pokazali, że w potranskrypcyjne wyciszanie genów u roślin są zaangażowane krótkie, 25-nukleotydowe cząsteczki RNA. Sekwencja nukleotydowa tych cząsteczek była komplementarna do docelowego mRNA. Z perspektywy czasu trzeba powiedzieć, że odkrycie dokonane przez grupę Davida Baulcombe'a było równie przełomowe, jeśli chodzi o rozpoczęcie prac eksperymentalnych dotyczących mechanizmu działania RNAi, co odkrycie Fire'a i Mello. Osoby zaangażowane w te badania jak najbardziej zasługiwały na otrzymanie prestiżowego wyróżnienia, jakim jest Nagroda Nobla wraz z dwoma badaczami omawianego zjawiska u nicienia. Biorąc pod uwagę dodatkowo, że zupełnie pierwszych obserwacji dotyczących wyciszania ekspresji genów (kosupresji) dokonano na petunii [20], należało również uhonorować badaczy zajmujących się roślinami. Stało się inaczej, jednak dyskusja na ten temat pojawiła się na łamach takich czasopism naukowych, jak *Nature* i *Science* [4, 17].

Po pracach Fire'a [7] i Hamiltona [10] nastąpiła lawina artykułów, które wyjaśniły mechanizm RNAi: Dwuniciowy RNA pojawia się w komórce eukariotycznej jako efekt (1) replikacji wirusowego RNA (np. RNA wirusów roślinnych) [1], (2) transkrypcji retrotranspozonów [11, 23], (3) nieprawidłowej transkrypcji transgenów [5], (4) transkrypcji nieklasycznej (ang. *read-through transcription*) całych transpozonów, które dzięki obecności na swych końcach sekwencji o odwróconej orientacji mogą tworzyć na poziomie RNA struktury dwuniciowe [13, 27], (5) transkrypcji par genów częściowo nachodzących na siebie i dających tym samym częściowo komplementarne transkrypty [3], wreszcie (6) u niektórych eukariontów (rośliny, nicienie) jako efekt aktywności polimerazy RNA zależnej od RNA (ang. *RNA-dependent RNA polymerase*,



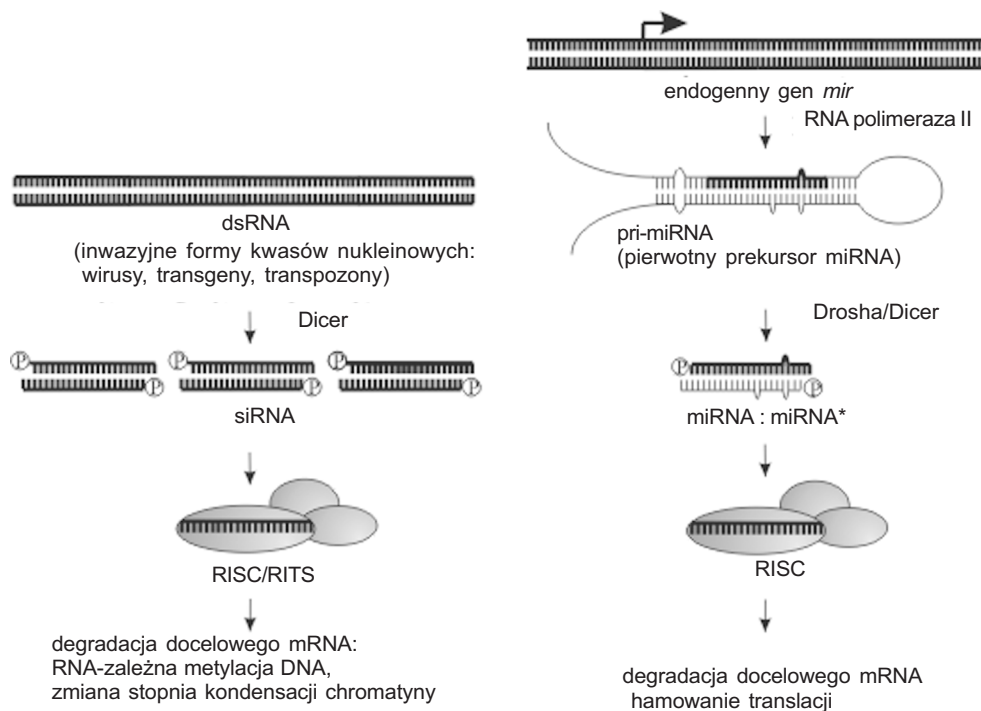
RYCINA 2. Schematyczny przebieg interferencji RNA. Dokładny opis procesu znajduje się w tekście. Rozcięty przez kompleks RISC mRNA ulega dalej całkowitej degradacji. Ago – białko z rodziny Argonaute; dsRNA – dwuniciowy RNA, siRNA – krótkie, interferujące RNA, RISC – kompleks wyciszający indukowany przez RNA

RdRp) [15]. Dwuniciowy RNA jest rozpoznawany przez enzym Dicer, który rozcina go na krótkie cząsteczki dwuniciowe, długości 24–25 pz, zwane siRNA (ang. *small interfering RNA*). siRNA mają charakterystyczną budowę (ryc. 2): na końcach 5' obu nici znajdują się reszty fosforanowe, a na końcach 3' – grupy hydroksylowe. Ponadto, końce 3' są określane jako wystające, ponieważ znajdują się tam po dwa wolne, niesparowane nukleotydy. Cecha ta jest krytyczna dla dalszej aktywności tych cząsteczek RNA. Cząsteczki siRNA ulegają włączeniu w wielobiałkowy kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), którego głównym składnikiem jest białko z rodziny Argonaute. W tej formie kompleks jest nieaktywny. Do jego uaktywnienia potrzebna jest aktywność helikazy RNA zależnej od ATP, która usuwa jedną z nici siRNA. W kompleksie RISC pozostaje ta nić siRNA, której koniec 5' ma niższą stabilność parowania zasad w dupleksie siRNA [22, 25]. Ostatnim etapem RNAi jest skierowanie kompleksu RISC przez rezydujący w nim jednoniciowy siRNA do docelowej, przeznaczony do degradacji, cząsteczki RNA. Nić siRNA związana z kompleksem RISC hybryduje z docelowym RNA, a białko z rodziny Argonaute jest RNazą, która rozcina docelowy RNA w środku hybrydującej sekwencji. Rycina 2 przedstawia ogólny schemat przebiegu RNAi. Jeśli dokonać podziału eukariontów na główne grupy ewolucyjne, to okaże się, że proces ten przebiega w szczegółach nieco

inaczej u roślin, grzybów, bezkręgowców i kręgowców. Odpowiednio też u roślin proces ten często nazywa się potranskrypcyjnym wyciszaniem genów – PTGS (ang. *post-transcriptional gene silencing*), tłumieniem genów – u grzybów (ang. *quelling*) i RNAi – u zwierząt. W tym miejscu nie będą omawiane różnice w przebiegu tego procesu w głównych grupach eukariontów, na ten temat została napisana obszerna praca przeglądowa w 2003 roku [28]. Należy jednak zaznaczyć, że proces ten jest najprawdopodobniej ewolucyjnie stary, pojawił się u pierwotnych eukariontów, zanim doszło do rozdziału głównych dróg ewolucyjnych prowadzących do królestw roślin, grzybów i zwierząt, a sugeruje się jako jego pierwotną funkcję ochronę komórki przed inwazyjnymi formami kwasów nukleinowych.

ODKRYCIE MIKRO RNA

Wielkim wydarzeniem, będącym efektem poznania procesu RNAi i udziału w nim siRNA jako efektorów RNAi, było odkrycie, że małe cząsteczki RNA mogą być również kodowane przez genomy eukariotyczne i mogą brać udział w regulacji rozwoju. Odkrycie to, choć od roku 2000 wywołało lawinę zainteresowania biologów molekularnych i komórkowych, datuje się z początków lat dziewięćdziesiątych XX wieku. W 1994 roku Lee i inni, a następnie w 2000 roku Reinhart i inni [12, 24] odkryli, że u nicienia *C. elegans* za prawidłowe przechodzenie z pierwszego stadium larwalnego w drugie oraz czwartego stadium w formę dojrzałą odpowiedzialne są krótkie cząsteczki RNA (odpowiednio *lin-4* i *let-7*), nazwane przez nich pierwotnie heterochronicznymi RNA (pojawiały się w różnym czasie rozwojowym na krótki okres), potem określane mianem stRNA (ang. *short temporal RNA*). Oba te krótkie RNA były komplementarne do rejonów 3'UTR (ang. *3' untranslated region*) odpowiednich mRNA. Poziom białek kodowanych przez te mRNA był obniżany potranskrypcyjnie przez hybrydyzację stRNA z końcem 3' mRNA, która blokowała translację. Z początku informacje te nie wzbudziły szerokiego zainteresowania i były postrzegane jako rzadki, specyficzny dla nicieni mechanizm, który pojawił się w bocznej linii ewolucyjnej królestwa zwierząt. Na ich działanie zwrócono jednak uwagę w momencie, gdy po zakończeniu sekwencjonowania genomu ludzkiego odkryto, że gen kodujący stRNA *let-7* jest obecny w genomie ludzkim, a dalsze prace wykazały, że jest obecny u niemal wszystkich przedstawicieli Metazoa [21]. Wszechobecność i zachowawczość sugerowały pełnienie ważnych funkcji, najprawdopodobniej rozwojowych. Okazało się, że u wszystkich jak dotąd przebadanych eukariontów występują geny kodujące krótkie RNA, pełniące funkcje regulatorowe – nazwano je mikroRNA (miRNA). Co łączy miRNA z RNAi? Otóż wiele etapów dojrzewania miRNA i siRNA przebiega bardzo podobnie. Odkryto, że w procesy biogenyzy obu klas cząsteczek zaangażowane są enzymy typu Dicer. Podobnie jak w przypadku siRNA, miRNA zostaje związany przez kompleks RISC, w którym znajduje się białko z rodziny Argonaute. Mikro RNA skierowuje kompleks do docelowego mRNA, z którym hybryduje na zasadzie komplementarności zasad. Kompleks RISC zawierający miRNA może działać na mRNA dwójako: (i) rozcinać mRNA, tak jak



RYCINA 3. Porównanie biogenezy i działania siRNA i miRNA. W przypadku siRNA mogą być one wiązane przez dwójakiego rodzaju kompleksy: RISC lub RITS. Ten drugi występuje na terenie jądra i jest związany z regulacją stopnia kondensacji chromatyну i metylacją DNA zależną od RNA. miRNA:miRNA* – dupleks RNA, w którym miRNA jest nicią, która będzie aktywnym składnikiem kompleksu RISC

siRNA, w obrębie sekwencji hybrydującej z miRNA (wiele miRNA wykazuje 100% komplementarności do rejonów kodujących mRNA, nie tylko w rejonach 3'UTR; ten sposób regulacji poziomu mRNA występuje przede wszystkim u roślin) lub też (ii) odmiennie niż siRNA, blokować translację, hybrydując z rejonem 3'UTR mRNA (miRNA nie wykazuje wtedy 100% komplementarności do odpowiedniego fragmentu mRNA, jest to mechanizm często spotykany u zwierząt) [19]. Na rycinie 3 zestawiono porównanie biogenezy siRNA i miRNA. Działanie miRNA w rozwoju organizmów eukariotycznych można nazwać, stosując nomenklaturę wojskową, „siłami szybkiego reagowania”. Otóż sposoby regulacji ekspresji genetycznej, polegające na uruchamianiu/aktywowaniu indukowanych czynników transkrypcyjnych, mogły okazać się zbyt wolne ze względu na potrzebę szybkiego reagowania na postępujące procesy rozwojowe i fizjologiczne, które wymagają sprawnego usunięcia konkretnego mRNA lub zablokowania jego translacji. Mikro RNA, współulegające ekspresji z docelowym mRNA, mogą bardzo szybko i specyficznie wykonać to zadanie, skierowując komórkę na tor prawidłowego rozwoju lub też odpowiadając na zmiany środowiskowe. Badania nad miRNA są prowadzone tak intensywnie, że obecnie znanych jest ponad 3000 różnych miRNA zidentyfikowanych u różnych gatunków eukariotów [29], w tym ponad 400 u człowieka i ponad 100 u *Arabidopsis thaliana* (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>).

DWIE KLASY MAŁYCH REGULATORYWYCH CZĄSTECZEK RNA

Powyższe badania doprowadziły do wyróżnienia dwóch zasadniczych klas cząsteczek małych RNA: miRNA i siRNA. Jakie są między nimi różnice?

1. Mikro RNA są zawsze kodowane przez genom organizmu i transkrybowane przez polimerazę RNA II. Pierwotny transkrypt jest zatem długą, jednoniciową cząsteczką RNA. Prekursorowy RNA ma zdolność do tworzenia struktury typu spinki do włosów, a więc formowania w trzonie spinki rejonu dwuniciowego. W rejonie dwuniciowym zawsze obserwuje się częściowe niesparowania. Taki prekursor, zwany pri-miRNA jest następnie substratem dla enzymów Drosha/Dicer. Z kolei siRNA powstają z długich, dwuniciowych cząsteczek RNA, mających perfekcyjną komplementarność, mogą być pochodzenia egzogenne, jak i endogenne.
2. miRNA zawsze działają w układzie *trans* (a więc nie działają „na siebie”), regulując poziom docelowego mRNA poprzez komplementarność sekwencji miRNA do mRNA. Mikro RNA nie mogą regulować własnego poziomu z tej prostej przyczyny, że mają identyczną sekwencję nukleotydową jak ta zawarta w prekursorze, a nie mają sekwencji do niej komplementarnej. Natomiast siRNA mogą, przynajmniej teoretycznie, działać zarówno w układzie *cis*, jak i w *trans*, kierując się do cząsteczek RNA, z których pochodzą (*cis*) lub do docelowych mRNA (*trans*). W tym drugim przypadku ich działanie bardzo przypomina działanie miRNA.
3. miRNA obniżają poziom mRNA lub blokują translację, działając tym samym zawsze na etapie potranskrypcyjnym, podczas gdy siRNA mogą działać zarówno na etapie potranskrypcyjnym, jak i transkrypcyjnym (regulacja stopnia skondensowania chromatyny i dostępności genów dla maszyny transkrypcyjnej) [5].

Z podanych różnic w biogenezie i działaniu siRNA wynika, że mogą one pełnić różne funkcje. Obserwacje te doprowadziły do wyróżnienia kilku podklas siRNA: siRNA, ha-siRNA, ta-siRNA, nat-siRNA i scn-siRNA. Poniżej omówione zostały poszczególne podklasy siRNA.

1. siRNA (ang. *small interfering RNA*) – cząsteczki egzogenne, długości 21–25 nt, które niszczą inwazyjne formy kwasów nukleinowych (wirusy, transgeny).
2. ha-siRNA (ang. *heterochromatin-associated siRNA*) – działające w układzie *cis* endogenne siRNA, głównie długości 24 nt, które indukują zmiany w stopniu kondensacji chromatyny oraz często powodują metylację DNA w rejonach, z których pochodzą. Jak dotąd ha-siRNA zidentyfikowano tylko u roślin i grzybów [13, 23].
3. ta-siRNA (ang. *trans-acting siRNA*) – działające głównie w układzie *trans*, endogenne siRNA, długości 21 nt, które doprowadzają do degradacji mRNA genów kodowanych w innym niż ta-siRNA miejscu genomu. ta-siRNA mogą również działać w układzie *cis*, regulując własny poziom w komórce. W dojrzewanie prekursorów ta-siRNA zaangażowane są miRNA. Jak dotąd odkryto je tylko u roślin [2].
4. nat-siRNA (ang. *natural antisense siRNA*) – działające w układzie *cis*, endogenne siRNA (długości głównie 24 nt). Doprowadzają do rozcięcia mRNA jednego z pary genów, których sekwencje nachodzą na siebie i dają częściowo komplementarne transkrypty generujące dwuniciowy RNA. Jak dotąd odkryto je jedynie u

roślin i stwierdzono, że głównie zaangażowane są w regulację odpowiedzi rośliny na stres abiotyczny [3].

5. scn-siRNA (ang. *siRNA-like scan (scn) RNA*) – działające w układzie *cis*, endogenne siRNA, długości około 28 nt, zidentyfikowane jak dotąd tylko u orzęsków i zaangażowane w eliminację materiału genetycznego z makronukleusa oraz specyficzną metylację histonu H3 w rejonach chromatyny, gdzie znajduje się DNA przeznaczony do eliminacji. scn-siRNA ulegają specyficjnej ekspresji tylko w czasie koniugacji orzęsków [18].

ZASTOSOWANIE siRNA W GENOMICIE FUNKCJONALNEJ I TERAPII GENOWEJ

siRNA można wykorzystywać jako narzędzie do wysoce selektywnego wyciszania genów, co pozwoliło na ich szerokie zastosowanie w genomice funkcjonalnej nicieni (*C. elegans*) [14] i roślin (*Arabidopsis thaliana*) [16]. Zyskaliśmy zatem dodatkowe, potężne narzędzie do analizy funkcji genów, w dodatku łatwiejsze do wykorzystania niż klasyczne metody mutagenyzy. Aby wyciszyć gen u nicieni lub roślin, wprowadza się albo wektory generujące dwuniciowy RNA, albo RNA z potencjalną zdolnością tworzenia spinki do włosów. Natomiast w przypadku ssaków szybko okazało się, że wprowadzanie długich cząsteczek dsRNA prowadzi do uruchomienia odpowiedzi interferonowej i do skierowania komórki na drogę apoptozy [27]. Rozwiązaniem stało się wprowadzanie wektorów generujących cząsteczki „udające” prekursor miRNA, co umożliwiała tym cząsteczkom wejście na drogę biogenezy miRNA i pozyskanie aktywnych cząsteczek wyciszających w komórce. Równolegle rozwinięto techniki bezpośredniego, dożylnego podawania samych siRNA, często modyfikowanych chemicznie dla przedłużenia ich półokresu trwania. Pierwsze doświadczenia wskazują również, że siRNA mogą okazać się potężnym środkiem terapeutycznym. Tuż przed testami klinicznymi są siRNA-terapeutyki, które w doświadczeniach wstępnych na myszach okazały się skuteczne w leczeniu: wirusowego piorunującego zapalenia wątroby, innych infekcji wirusowych, posocznicy, nowotworów oraz degeneracji plamki żółtej [6].

ZNACZENIE ODKRYCIA RNAi

Poznanie interferencji RNA doprowadziło do zupełnie nieoczekiwanych odkryć, jeśli chodzi o funkcje, jakie w komórce mogą pełnić cząsteczki RNA oraz pozyskanie skutecznego narzędzia poznawczego i terapeutycznego. Jakże daleko jesteśmy dziś od lansowanego jeszcze dziesięć lat temu poglądu, że główną funkcją RNA jest pośredniczenie w przekazie informacji genetycznej między DNA a białkiem i udział w translacji! Pierwszym zaskoczeniem w ciągu ostatnich lat w badaniach funkcji sprawowanych przez RNA były wyniki uzyskane z analiz ludzkiego genomu, transkryptomu i proteomu. Otóż wiadomo obecnie, że ludzki genom koduje od 20 000 do 25 000 genów (<http://>

www.ornl.gov/sci/techresources/Human_Genome/education/education.shtml). Tymczasem, u człowieka zidentyfikowano około miliona różnych białek (<http://expasy.org/sprot/hpi/>)! Z prostych wyliczeń należałoby oczekiwać, że jeden gen powinien kodować 40–50 białek. Skąd bierze się ta różnorodność? Okazuje się, że dwa zjawiska są odpowiedzialne za tę gigantyczną liczbę białek zidentyfikowanych u człowieka: modyfikacje potranslacyjne i splicing alternatywny. Dziś wiemy, że ten ostatni, uważany do niedawna raczej za wyjątek niż regułę, decyduje o ostatecznej formie około 70% ludzkich pre-mRNA, generując od dwóch do kilkuset izoform dojrzałego mRNA z jednego pre-mRNA (http://www.expasy.ch/sprot/hpi/hpi_desc.html)! Skrajnym opisaniem przypadkiem jest pewne białko wchodzące w skład kanałów potasowych w błonach komórek rzęsatych w ślimaku ucha ludzkiego – z pre-mRNA, wskutek alternatywnego splicingu, powstaje około 500 różnych mRNA, a tym samym białek, nieznacznie różniących się budową i o nieco innych właściwościach, decydujących o otwarciu/zamknięciu kanału [8, 30]. Można więc powiedzieć, że etap dojrzewania pre-mRNA jest odpowiedzialny za powstawanie dodatkowej, znaczącej liczby białek. Drugim zaskoczeniem ostatnich lat było stwierdzenie, że krótkie cząsteczki RNA chronią komórki eukariotyczne przed inwazyjnymi formami kwasów nukleinowych i są „komórkowymi siłami szybkiego reagowania” w regulacji ekspresji genów. Można więc powiedzieć, że cząsteczki RNA zaczynają się jawić w zupełnie innym świetle niż to jeszcze całkiem niedawno sądzono: są istotnymi elementami regulacji funkcji życiowych organizmów. Nagroda Nobla przyznana A. Fire’owi i C. Mello jest ukoronowaniem wysiłków wielu badaczy zajmujących się strukturą i funkcją RNA.

LITERATURA

- [1] AKBERGENOV R, SI-AMMOUR A, BLEVINS T, AMIN I, KUTTER C, VANDERSCHUREN H, ZHANG P, GRUISSEM W, MEINS F JR, HOHN T, POOGGIN MM. Molecular characterization of geminivirus-derived small RNAs in different plant species. *Nucl Acids Res* 2006; **34**: 462–471.
- [2] ALLEN E, XIE Z, GUSTAFSON AM, CARRINGTON JC. miRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 2005; **121**: 207–221.
- [3] BORSANI O, ZHU J, VERSLUES PE, SUNKAR R, ZHU JK. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 2005; **123**: 1279–1291.
- [4] BOTS M, MAUGHAM S, NIEWLAND J. RNAi Nobel ignores vital groundwork on plants. *Nature* 2006; **443**: 906.
- [5] CHAN SW, HENDERSON IR, JACOBSEN SE. Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Rev Genet* 2005; **6**: 351–360.
- [6] DORSETT Y, TUSCHL T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature Rev* 2004; **3**: 318–329.
- [7] FIRE A, XU S, MONTGOMERY MK, KOSTAS SA, DRIVER SE, MELLO CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806–811.
- [8] GRABOWSKI P, BLACK DL. Alternative splicing in the nervous system. *Prog Neurobiol* 2001; **65**: 289–308.
- [9] GUO S, KEMPHUES KJ. *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* 1995; **81**: 611–620.
- [10] HAMILTON AJ, BAULCOMBE DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; **286**: 950–952.

- [11] HAMILTON A, VIONNET O, CHAPPELL L, BAULCOMBE D. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 2002; **21**: 4671–4679.
- [12] 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**: 843–854.
- [13] LIPPMAN Z, GENDREL AV, BLACK M, VAUGHN MW, DEDHIA N, MCCOMBIE WR, LAVINE K, MITTAL V, MAY B, KASSCHAU KD, CARRINGTON JC, DOERGE RW, COLOT V, MARTINSSEN R. Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 2004; **430**: 471–476.
- [14] MAEDA I, KOHARA Y, YAMAMOTO M, SUGIMOTO A. Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* 2001; **11**: 171–176.
- [15] MALLORY AC, VAUCHERET H. Functions of micrRNAs and related small RNAs in plants. *Nature Genetics* 2006; **38**: S31–S36.
- [16] MATTHEW L. RNAi for plant functional genomics. *Comp Funct Genom* 2004; **5**: 240–244.
- [17] MATZKE M, MATZKE AJ. Plants, RNAi, and the Nobel Prize. *Science* 2006; **314**: 1242–1243.
- [18] MOCHIZUKI K, GOROVSKY MA. A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase. *Genes & Dev* 2005; **19**: 77–89.
- [19] MURCHISON EP, HANNON GJ. miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery. *Curr Opin Cell Biol* 2004; **16**: 223–229.
- [20] 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**: 279–289.
- [21] PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, MARTINDALE MQ, KURODA MI, MALLER B, HAYWARD DC, BALL EE, DEGNAN J, CORBO J, LEVINE M, LEAHY P, DAVIDSON E, RUVKUN G. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; **408**: 86–89.
- [22] PREALL JB, HE Z, GORRA JM, SONTHEIMER EJ. Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*. *Curr Biol* 2006; **16**: 530–535.
- [23] REINHART BJ, BARTEL DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 2002; **297**: 1831.
- [24] REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; **403**: 901–906.
- [25] SCHWARTZ DS, HUTVANGER G, DU T, XU Z, ARONIN N, ZAMORE PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; **115**: 199–208.
- [26] SIJEN T, PLASTERK HA. Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 2003; **426**: 310–314.
- [27] STARK GR, KERR IM, WILIAMS BR, SILVERMAN RH, SCHREIBER RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998; **67**: 227–264.
- [28] SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKI A, FIGLEROWICZ M. RNAi, PTGS i quelling – trzy wariacje na jeden temat? *Biotechnologia* 2003; **2**: 54–66.
- [29] WANG Y, STRUCKER HM, GOU D, LIU L. MicroRNA: past and present. *Front Biosci* 2006; **12**: 2316–2329.
- [30] XIE J, BLACK DL. A CaMK IV responsive RNA element mediates depolarization-induced alternative splicing of ion channels. *Nature* 2001; **410**: 936–939.

Redaktor prowadzący – Jerzy Kawiak

Otrzymano: 31.01.2007 r.

Przyjęto: 01.02.2007 r.

*ul. Międzychodzka 5, 60-371 Poznań,
zofszwey@amu.edu.pl*