

MIKRO-RNA – MAŁE CZĄSTECZKI O WIELKIM ZNACZENIU

MICRO-RNAs – SMALL MOLECULES OF BIG IMPORTANCE

Agata FILIP

Zakład Genetyki Medycznej Akademii Medycznej im. prof. F. Skubiszewskiego
w Lublinie

Streszczenie: MikroRNA (miRNA) to grupa jednoniciowych, niekodujących RNA, które regulują ekspresję genów strukturalnych na poziomie posttranskrypcyjnym. Pierwotny transkrypt mikroRNA ma kilkaset nukleotydów długości, natomiast aktywną formę dojrzałą stanowią krótkie fragmenty 21–23-nukleotydo-
we. Wiążą się one z mRNA genu docelowego katalizując jego degradację, jeśli komplementarność sekwencji jest całkowita, lub zahamowanie procesu translacji w przypadku niepełnej komplementarności. Dotychczas opisano kilkaset genów kodujących miRNA w genomach roślinnych i zwierzęcych. Wiele ważnych procesów życiowych zależy od kontroli ekspresji genów poprzez miRNA. Niektóre z nich bezpośrednio regulują rozwój, inne wpływają na przebieg procesu śmierci programowanej, istnieją też miRNA niezbędne dla prawidłowej sygnalizacji komórkowej. Profil ekspresji miRNA charakteryzuje poszczególne typy nowotworów znacznie lepiej niż profil ekspresji mRNA, co może mieć znaczenie diagnostyczne i terapeutyczne. Praca przedstawia przegląd aktualnego stanu wiedzy na temat dojrzewania miRNA, mechanizmów regulacji ekspresji genów za ich pośrednictwem oraz roli tych cząsteczek w embriogenezie, hematopoezie i onkogenezie.

Słowa kluczowe: miRNA, regulacja ekspresji genów, onkogeneza.

Summary: MicroRNAs (miRNAs) constitute a group of single-stranded, noncoding RNAs that regulate the expression of structural genes on post-transcriptional level. miRNAs are transcribed as several hundred-nucleotide pri-miRNAs. The mature, active form is only 21–23 nucleotides long and it binds target mRNAs containing antisense sequences. miRNA can either catalyze cleavage of mRNA that are perfectly base-paired to its sequence, or inhibit the translation of mRNAs that form an imperfect complex with the miRNA. Hundreds of miRNAs are described to date, which populate the genomes of plants and animals. They are necessary for crucial cellular and developmental processes. Some of them directly regulate the development; some affect programmed cell death (PCD), some at last are essential for signal transduction. miRNA expression profiles classify human cancers better than mRNA profiles what may be of big diagnostic and therapeutic value. This study presents the current understanding of miRNA biogenesis, regulatory mechanisms and the role that miRNAs exert in embryogenesis, hematopoiesis and oncogenesis.

Key words: miRNA, regulation of gene expression, oncogenesis.

WSTĘP

Mechanizm indukujący posttranskrypcyjne wyciszenie ekspresji genów w odpowiedzi na wprowadzenie egzogennych, dwuniciowych fragmentów RNA (dsRNA) o sekwencji identycznej jak mRNA genu docelowego opisano po raz pierwszy u nicienia *C. elegans* [5, 8, 11]. Wkrótce okazało się, że odpowiedzialny jest on za obserwowane już wcześniej zjawisko inaktywacji genów w komórkach niektórych grzybów i roślin. Obecność tego rodzaju regulacji potwierdzono także u *Drosophila melanogaster*. Pierwsze doświadczenia z interferencyjnym RNA u kręgowców nie przyniosły oczekiwanych rezultatów. Wprowadzenie długich fragmentów dsRNA aktywuje bowiem system odpornościowy do odpowiedzi nieswoistej, między innymi do produkcji interferonu (system ten nie występuje u bezkręgowców), co implikuje globalne posttranskrypcyjne zahamowanie ekspresji genów [8].

Badania mechanizmu interferencji w komórkach roślin i bezkręgowców pozwoliły stwierdzić, że długie fragmenty dsRNA są cięte na charakterystyczne 21-nukleotydowe odcinki z wystającymi (*overlapping*) 2-nukleotydowymi końcami 3'. Określono je jako dupлексы małych, interferujących RNA (*small interfering RNAs duplexes*, siRNAs). Jedna nić takiego dupлекsu siRNA jest następnie włączana w duży kompleks białkowy, RISC (*RNA induced silencing complex*) [25]. Kompleks RISC/siRNA łączy się następnie z fragmentem sekwencji 3'-UTR (*3' untranslated region*) genu docelowego i w zależności od stopnia komplementarności może powodować degradację mRNA lub tylko zahamowanie translacji przy zachowaniu integralności transkryptu [20, 27, 34].

Dalsze badania nad siRNA u kręgowców umożliwiła obserwacja, że wprowadzenie dsRNA krótszych niż 30 bp nie indukuje wydzielania interferonu. Okazało się wówczas, że szlak regulacji ekspresji genów *via* mechanizm interferencji u ssaków może być w pełni aktywny.

Poszukiwanie endogennych dupлексов siRNA o długości 21 bp u *Drosophila* i *C. elegans* wykazało, że są one obecne w obu tych systemach, potem niespodziewanie istnienie ich opisano u kręgowców, gdzie kodowane są przez ponad 200 różnych genów [13, 20, 29]. Ta właśnie grupa endogennych RNA określana jest obecnie mianem miRNA (microRNA). miRNA są transkrybowane jako fragmenty o długości kilkuset nukleotydów, przejściowo podczas dojrzewania przyjmują strukturę „szpilki do włosów” (60–90 nt), by ostatecznie stać się aktywną formą o długości 21 nt, która, podobnie jak siRNA, może wejść w skład kompleksu RISC [10].

miRNA

Po raz pierwszy miRNA opisane zostały przez Ambrosa i Ruvkuna w 1993 r. [33, 35]. Badając stadia rozwoju *Caenorhabditis elegans* stwierdzili oni, że do prawidłowego przejścia ze stadium larwalnego L1 do L2 niezbędna jest krótka sekwencja RNA hamująca ekspresję genu strukturalnego *lin-14* [3, 8, 27, 33, 34]. Gen *lin-4* *C. elegans* koduje RNA o długości 21 nukleotydów, które rozpoznaje i wiąże sekwencje

komplementarne w regionie 3'UTR mRNA genu *lin-14*. W ten sposób dochodzi do zahamowania jego translacji podczas przejścia z pierwszego do drugiego stadium larwalnego, dzieje się to jednak bez degradacji mRNA [34, 35]. Kolejnym opisanym genem, kodującym miRNA był *let-7* zaangażowany także w regulację rozwoju nicienia. Wkrótce potem geny homologiczne do *let-7* znaleziono w genomach muszki owocowej i człowieka. Stało się jasne wówczas, iż miRNA stanowią konserwatywne filogenetycznie negatywne regulatory ekspresji genów. Ekspresja miRNA jest tkankowo lub nawet komórkowo-specyficzna, zależy również od stadium rozwoju [23, 25].

BIOGENEZA miRNA

Ilość poznanych genów kodujących miRNA stale rośnie. Przypuszczalnie jest ich kilkaset (200–1000 w zależności od gatunku), co stanowi ponad 1% genomu danego organizmu [16, 34]. Mogą mieć one różne lokalizacje: w intronach genów bądź w obszarach pozagenowych. Występują pojedynczo lub w policistronowych skupiskach (37% znanych ludzkich miRNA zlokalizowanych jest w skupiskach po dwa lub więcej). Jeśli znajdują się w intronie, przypuszczalnie wykorzystują promotor i elementy regulatorowe genu gospodarza. Natomiast regulacja genów miRNA zgrupowanych w formie policistronów jest najprawdopodobniej wspólna, analogicznie do operonów bakteryjnych [20].

Większość, jeśli nie wszystkie miRNA jest transkrybowana przez polimerazę II, transkrypt pierwotny ma czapkę (cap) i ogonek poli-A [13]. Dojrzewanie miRNA przebiega dwuetapowo, przy czym oba etapy katalizowane są przez enzymy z dużej rodziny rybonukleazy III: Drosha i Dicer.

Drosha

Transkrypt pierwotny miRNA, pri-miRNA (*primary miRNA*) składa się z kilkuset nukleotydów. Pierwszy, jądrowy etap dojrzewania polega na wycięciu z tego transkryptu fragmentu o długości około 70 nt, przyjmującego formę szpilki do włosów. Na końcu 3' struktura taka ma dwunukleotydowe „wysunięcie” (ryc. 1). Za przebieg tego etapu odpowiedzialny jest enzym Drosha [34].

Drosha są białkami jądrowymi o wielkości 130–160 kDa, zawierającymi dwie domeny katalityczne o aktywności RNazy III i domenę wiążącą dsRNA (dsRBD, *dsRNA Binding Domain*) w części C-końcowej [32]. Jak ostatnio wykazano, Drosha występują w kompleksie z białkiem dsRBD Pasha (u *Drosophila*) lub DGCR8 (*DiGeorge syndrome Critical Region Gene 8*) u ssaków. Kompleks ten nazywany jest mikroprocesorem [13, 25]. Sam enzym Drosha wykazuje niespecyficzną aktywność RNazy, o specyficie prawdopodobnie decyduje Pasha/DGCR8 [10]. Następnie pre-miRNA eksportowany jest do cytoplazmy przez białko Exportin-5 (Exp5). Exportin-5 należy do rodziny karioferynowych, jądrowo-cytoplazmatycznych czynników transportujących, zależnych od wiążącego GTP kofaktora Ran [8].

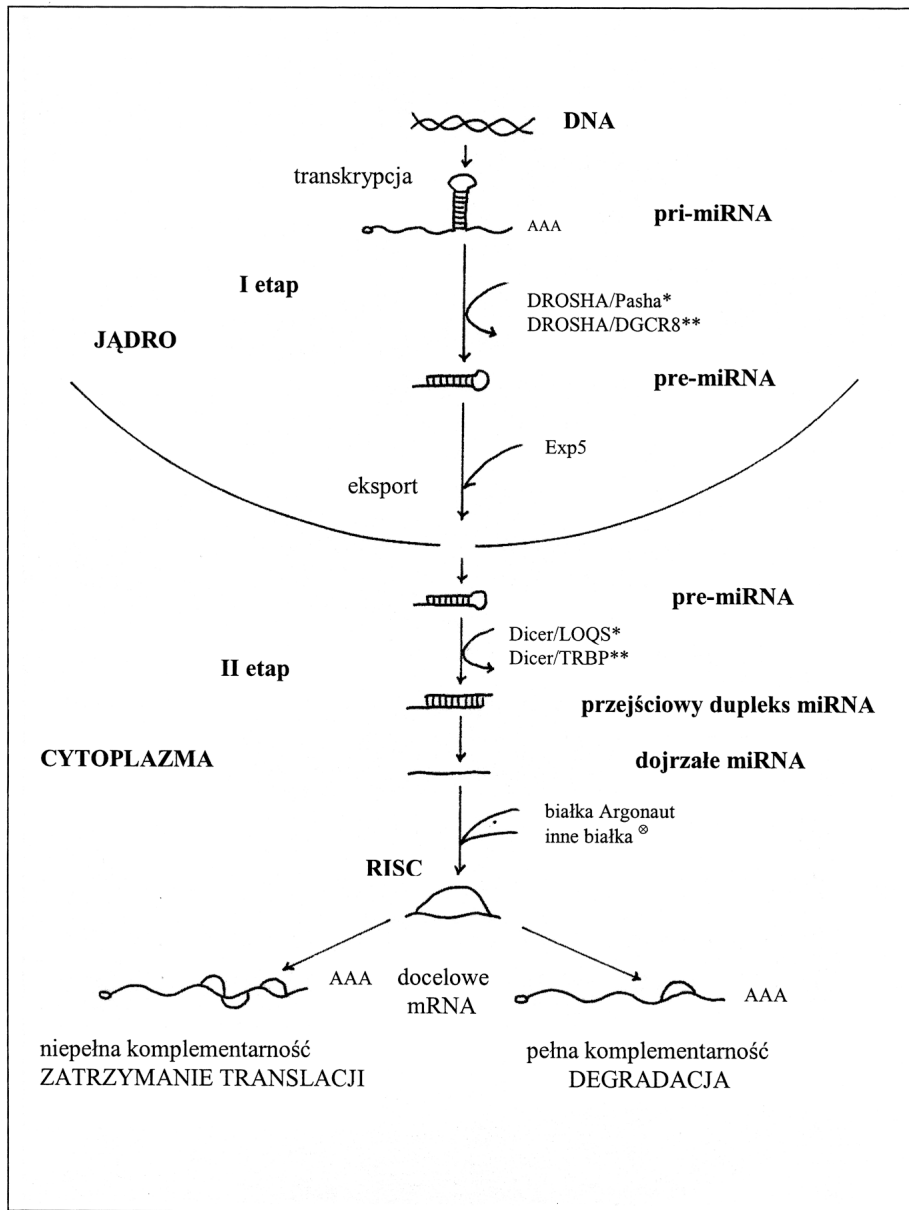
Dicer

W następnym etapie dojrzewania miRNA bierze udział rybonukleaza Dicer. Białka Dicer są duże, około 200 kDa; zawierają domeny o aktywności ATP-azy/helikazy RNA, domenę PAZ i DUF283, dwie domeny katalityczne o aktywności rybonukleazy (RIIA i RIIB) i C-kończącą domenę dsRBD [10]. U drożdży i kręgowców występują geny dla jednego rodzaju białka Dicer, natomiast u *Drosophila*, *Arabidopsis* i kilku innych organizmów opisano dwa lub nawet więcej genów, których produkty nieznacznie różnią się funkcją. Jest to enzym zależny od ATP, odznaczający się wysokim powinowactwem do dwuniciowych RNA (dsRNA) posiadających 2nt wysunięcie na końcu 3'. Za rozpoznanie tego fragmentu odpowiada domena PAZ. Po przyłączeniu RNA Dicer przecina oba łańcuchy w odległości ~21nt od miejsca wiązania (ryc. 1). Dzieje się tak w przypadku „obróbki” długich dsRNA (np. egzogennych), a także wówczas, gdy Dicer przyłączy się do pre-miRNA [20, 34]. Fakt, że Dicer przecina łańcuchy RNA w określonej odległości od zakończenia pre-miRNA, oznacza, iż struktura pre-miRNA determinuje sekwencję dupleksu miRNA::miRNA, powstałego w wyniku działania tego enzymu. Prawidłowe działanie nukleazy Dicer uwarunkowane jest prawdopodobnie połączeniem z białkiem Loquacious (LOQS) u *Drosophila* bądź jego ortologiem TRBP (HIV-1 *Transactivating Response RNA-binding Protein*) u ssaków [12, 14].

Dupleksy miRNA są nietrwałe i w związku z tym trudne do wykrycia, łańcuchy RNA bowiem dosyć szybko ulegają rozdzieleniu [8]. Z większości prekursorowych miRNA powstaje tylko jedna cząsteczka dojrzałego miRNA, a o wyborze określonego łańcucha decyduje stabilność par zasad na zakończeniach dupleksu. W przypadku niektórych pre-miRNA (np. miR-30) dojrzałe miRNA mogą powstać z obydwu nici dupleksu. Krótki okres półtrwania dupleksów miRNA wynika prawdopodobnie z faktu, iż dojrzałe cząsteczki miRNA dosyć szybko włączane są w kompleks RISC (inaczej miRNP - kompleks miRNA i białek). Budowa tego kompleksu nie jest jeszcze wyjaśniona do końca, wiadomo na pewno, że w jego skład wchodzi między innymi białka rodziny Argonaut [25].

Białka Argonaut

Białka Argonaut można podzielić na dwie podrodziny: Ago i Piwi. U człowieka i innych ssaków powszechnie występują 4 białka Ago (hAgo1-4), natomiast ekspresję 4 genów podrodziny Piwi opisano dotychczas jedynie w komórkach jąder i komórkach macierzystych układu hemopoetycznego; ich funkcja nie jest znana. Eukariotyczne białka Argonaut mają wielkość ~100 kDa i są silnie zasadowe. Mają one domenę PAZ (podobnie jak białka Dicer) i domenę Piwi, wspólną dla podrodzin Ago/Piwi [10]. Jak wcześniej wspomniano, domena PAZ odpowiada za specyficzne wiązanie dupleksów RNA z wystającymi, 2 nt końcami 3'. Natomiast domena Piwi, w której skład wchodzi trójka kwaśnych aminokwasów DDE typowych dla RNazy H (enzym przecinający nić RNA hybrydy DNA:RNA) i enzymów jej podobnych, stanowi być może o endonukleolitycznej aktywności kompleksu RISC.



RYCINA 1. Dojrzewanie i mechanizmy działania miRNA (za [8], modyfikacja): **Drosophila*, **ssaki, ⊗ – objaśnienia w tekście

Kompleks RISC

U *Drosophila* w skład kompleksu RISC zawsze wchodzi białko lub białka rodziny Argonaut, białko VIG (*Vasa Intronic Gene protein*, RBP), Tudor-SN (białko mające pięć domen SN o aktywności nukleazy i domenę Tudor) i dFXR, będące ortologiem ludzkiego białka FMRP (*fragile X mental retardation protein*) [10]. FMRP i FXR1 to

białka wiążące RNA, działające jako modulatory translacji, głównie w neuronach, co może mieć też związek z ich rolą w represji translacji indukowanej przez miRNA. Wydaje się, że podobnie zbudowane są kompleksy RISC u innych gatunków. U człowieka poza białkami Argonaut w skład kompleksu wchodzi także m.in. helikazy Gemin 3 i Gemin 4 [15, 20].

Wydaje się, że włączenie miRNA w kompleks RISC odbywa się w ten sposób, iż jeden ze składników tego kompleksu, enzym o aktywności helikazy, wiąże się do tego zakończenia dupleksu, w którym struktura dwuniciowa jest mniej stabilna i rozplata ją wykorzystując energię z ATP [10]. Nić RNA, której koniec 5' znajduje się w miejscu wiązania helikazy, zostaje włączona do RISC (ryc. 1).

Funkcjonalny kompleks RISC/siRNA może mieć różną wielkość i budowę, począwszy od 100–160 kDa w przypadku struktury złożonej tylko z białek Ago i siRNA, po tzw. holo-RISC, sedymentujący przy 80S, odpowiadający prawdopodobnie 300–500 kDa kompleksowi asocjującemu z rybosomami [10].

MECHANIZM DZIAŁANIA miRNA

Obecna w kompleksie RISC nić miRNA pełni rolę „przewodnika”, pozwalającego mu odnaleźć komplementarną sekwencję mRNA. Opisano dwa różne mechanizmy działania miRNA, zdeterminowane stopniem ich komplementarności z obszarem 3'-UTR docelowego mRNA [10, 15].

Jeśli sekwencje te są wysoce komplementarne, to połączenie RISC/siRNA/mRNA implikuje przecięcie mRNA naprzeciwko środkowej części przyłączonego miRNA przez niezidentyfikowaną dotąd rybonukleazę określaną mianem „Slicer”. Przecięcie mRNA w obrębie kompleksu RISC następuje pomiędzy miejscami sparowanymi z 10 a 11 nukleotydem siRNA/miRNA, licząc od końca 5'; proces ten nie wymaga obecności ATP. Kompleks RISC oddysocjuje (miRNA pozostaje z nim związane) i może wiązać kolejne mRNA. Powstałe w wyniku przecięcia dwa fragmenty mRNA ulegają degradacji przez egzozonukleazy komórkowe. Taka sytuacja ma miejsce najczęściej w komórkach roślinnych [27].

Jeśli natomiast sparowanie zasad nie jest doskonałe, co jest niemalże regułą w komórkach zwierzęcych, dochodzi do zahamowania translacji danego transkryptu bez jego zniszczenia (ryc. 1). Jedyne do tej pory opisanym odstępstwem od tej reguły jest mir-196, powodujący przecięcie mRNA genu HOX8B po zahamowaniu jego translacji [34]. Na poziomie komórki negatywna regulacja ekspresji genu w drodze represji translacji jest mniej efektywna niż przez degradację mRNA, chociażby ze względu na prawdopodobnie konieczny dłuższy kontakt pojedynczego kompleksu RISC/siRNA z sekwencją 3'-UTR. Dla osiągnięcia podobnej wydajności najczęściej konieczne jest rozpoznanie i związanie kilku miejsc w obszarze 3'-UTR mRNA genu docelowego przez kilka takich samych bądź różnych miRNA o niepełnej komplementarności (ryc. 1). Zupełnie niejasny natomiast jest mechanizm takiej represji translacji, być może pewną rolę odgrywa w nim asocjujące z białkami Argonaut i miRNA białko FMRP/dFXR, (regulator translacji istotny dla prawidłowego dojrzewania i funkcjonowania komórek nerwowych) [34].

Możliwe, że budowa kompleksu RISC przecinającego mRNA jest nieco inna niż kompleksu hamującego translację, przypuszcza się, że różnica ta dotyczyć może właśnie białek rodziny Argonaut. Badania białka Ago2 wskazują, iż właśnie ono może być enzymem odpowiedzialnym za degradację docelowego mRNA, czyli poszukiwanym „Slicerem”, natomiast za inhibicję translacji odpowiedzialne są prawdopodobnie wszystkie znane białka rodziny Ago [10].

Przeciętne miRNA ma około 100 sekwencji docelowych, co oznacza, iż miRNA wpływają na ekspresję bardzo wielu genów strukturalnych.

POLIMORFIZM LUDZKICH PRE-miRNA

Udowodniono, że integralność w obrębie struktury „szpilki do włosów” ma krytyczne znaczenie dla procesu dojrzewania miRNA, jednak wydaje się, że specyfika nukleotydowa tego fragmentu nie odgrywa większego znaczenia. W wyniku analizy 173 pre-miRNA u 96 osób w 10 z nich stwierdzono występowanie polimorfizmu [18]. W większości przypadków nie naruszały one integralności struktury „hairpin”. Kilka z nich jednak prowadziło do zmian w jej obrębie, co może implikować zaburzenia dojrzewania na etapie działania nukleazy Drosha. W przypadku miR-30c-2 polimorfizm C na A dotyczy nawet sekwencji dojrzałego miRNA, co ma o tyle znaczący wpływ na jego funkcję, że może zmieniać „powinowactwo” do genu docelowego [18].

ROLA miRNA

Sygnalizacja wewnątrzkomórkowa

Regulacja ekspresji genów przez miRNA ma wpływ na wiele istotnych procesów życiowych, między innymi na przekazywanie sygnału w komórce [34]. Przykładem jest sygnalizacja insulinowa. Udowodniono, że nadekspresja miR-375, zachowanego ewolucyjnie miRNA typowego dla komórek wysepek trzustki, hamuje wydzielanie insuliny wywołane wzrostem poziomu glukozy [28]. Natomiast zahamowanie funkcji endogennego miR-375 powoduje wzrost wydzielania insuliny. Zjawisko to, niezależne od metabolizmu glukozy czy też zmian wewnątrzkomórkowego poziomu Ca^{2+} , okazało się wynikać z bezpośredniego wpływu miR-375 na ekspresję genu *Myotrophiny* (MTPN), co może stanowić obiecujący cel w terapii cukrzycy [28, 34].

miRNA a nowotworzenie

Ostatnie badania wskazują, że zaburzenia w ekspresji miRNA mogą przyczyniać się do rozwoju wielu chorób, w tym powstawania procesu nowotworowego [7]. Jednym z najlepiej poznanych miRNA jest let-7, pierwszy raz opisany u *C. elegans* [31]. Ekspresja homologicznego miRNA występuje w wielu tkankach ludzkich, a szczególnie wysoka jest w tkance płucnej. Natomiast niższą niż normalnie ekspresję let-7 opisano

w komórkach niedrobnokomórkowego raka płuca (NSCLC), wykazano także korelację pomiędzy jej poziomem i czasem przeżycia chorych [31]. W układzie *in vitro*, nadekspresja let-7 hamuje wzrost komórek tego nowotworu. Mechanizm tego zjawiska nie jest wyjaśniony, jedna z hipotez zakłada udział let-7 w regulacji kinazy LIM, należącej do rodziny enzymów wpływających na kształt i mobilność komórek, co może implikować ułatwienie powstawania odległych przerzutów. Ostatnie doniesienia sugerują natomiast udział let-7 w negatywnej regulacji onkogenu *RAS* [19].

Niższy poziom ekspresji dojrzałych form ludzkich homologów miR-143 i miR-145 obserwowany jest w stanach przedrakowych i w rakach jelita grubego [24]. Podobnie obniżona ekspresja miR-15 i miR-16 wiąże się z CLL. Opisano mechanizm prowadzący do obniżenia lub braku ekspresji tych miRNA – skupisko (cluster) genów miR15a-miR16 zlokalizowane jest na długim ramieniu chromosomu 13 (13q14), pomiędzy 2 i 5 egzonomu genu *LEU2*, czyli na obszarze często ulegającym delecji w przebiegu B-CLL [2, 5, 6, 24].

Ostatnie badania wykazują, że miR-15/16 są negatywnymi regulatorami genu *BCL-2*, co tłumaczyłoby wysoki poziom ekspresji tego genu w B-CLL [6].

Także na chromosomie 13 (13q31), w locus, w którym często dochodzi do amplifikacji w chłoniakach grudkowych, chłoniakach komórek płaszczka, rozlanych chłoniakach olbrzymiokomórkowych, pierwotnych skórnych chłoniakach z komórek B i innych (nieziarnicze chłoniaki złośliwe), mieści się policistronowe skupisko mir-17-92. Analiza linii komórkowych wywodzących się z chłoniaków B-komórkowych wykazała, że poziom prekursorowych i dojrzałych miRNA kodowanych przez geny z tego locus jest dużo wyższy w komórkach nowotworowych w porównaniu z prawidłowymi limfocytami B [16]. W mysim modelu chłoniaka B-komórkowego zwiększona ekspresja mir-17-92 połączona z ekspresją genu *c-myc* przyspiesza rozwój guza, co może wskazywać na onkogenny charakter miRNA wywodzących się z tego skupiska [25]. Produkt ludzkiego onkogenu *c-MYC* może wiązać się bezpośrednio z miRNA zlokalizowanymi w skupisku na chromosomie 13 i powodować ich aktywację [26]. Z kolei dwa miRNA z tego skupiska, miR-17-5p i miR-20a są negatywnymi regulatorami czynnika transkrypcyjnego E2F1. Ponieważ ekspresja E2F1 jest bezpośrednio aktywowana przez białko MYC, oznacza to, że produkt genu *c-MYC* może jednocześnie aktywować i hamować ekspresję E2F1, co umożliwia bardzo precyzyjną kontrolę sygnału do proliferacji [25, 26].

W komórkach chłoniaków B-komórkowych, zwłaszcza w DLBCL (rozlany chłoniak olbrzymiokomórkowy) obserwuje się także znacznie wyższy (20–30x) niż w zdrowych limfocytach B poziom miR-155. Gen kodujący ten miRNA jest, jak się okazało, zlokalizowany w konserwatywnym regionie genu *BIC* (*B-cell receptor inducible gene*), którego nadekspresję w chłoniakach opisano już dawno [9, 24]. Co więcej, poziom ekspresji miR-155 różnicuje pierwotnego DLBCL o fenotypie aktywnych komórek B (ABC) od chłoniaka o fenotypie GC (*germinal center*), co może mieć znaczenie diagnostyczne [9].

Wyniki badań ekspresji 217 miRNA w tkankach zdrowych i nowotworowych wskazują na to, że profil ekspresji tych cząsteczek odróżnia guzy lite od innych nowotworów, różny jest także w zależności od pochodzenia komórek nowotworowych (np. komórki nabłonkowe lub hemopoetyczne) [23]. Odmianą charakterystykę ekspresji miRNA zaobserwowano także w dwu podtypach przewlekłej białaczki limfatycznej B-komórkowej, różniących się ekspresją kinazy ZAP-70 [3].

Z dotychczasowych badań wynika, że poziom ekspresji miRNA w komórkach zdrowych i nowotworowych jest inny. Może to wynikać z faktu, że większość poznanych genów dla miRNA zlokalizowana jest w miejscach łamliwych (*fra sites*) lub miejscach integracji wirusa HPV (*human papilloma virus*), często ulegających amplifikacji, delecji lub translokacji w przebiegu transformacji nowotworowej [4]. Przepuszczalnie mikro-RNA mogą zachowywać się jak geny supresorowe lub onkogeny (ryc. 2). Zależy to od rodzaju genu docelowego, którego nadekspresja lub wyciszenie jest efektem ostatecznym nieprawidłowej ekspresji miRNA [4, 6].

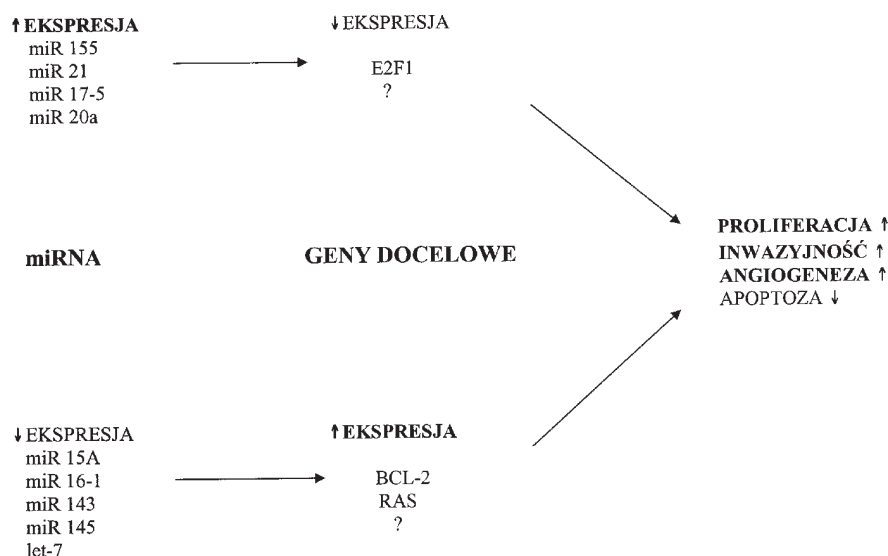
Istotną również jest rola zaburzeń mechanizmów dojrzewania miRNA w karcynogenezie i patogenezie innych chorób [13]. Utrata białka FMRP (*fragile X mental retardation protein*) powoduje zespół kruchości chromosomu X, jedną z najczęstszych przyczyn upośledzenia umysłowego. Wykazano, iż FMRP u ssaków wchodzi w interakcję z kompleksami zawierającymi miRNA, podobnie jak Dicer i AGO1 [34].

miRNA a rozwój

Ekspresja większości miRNA jest tkankowo-specyficzna i zależy od stadium rozwojowego organizmu, co sugerowałoby ich udział w regulacji rozwoju [5, 27]. Potwierdza to fakt, iż indukowane zaburzenia mechanizmów dojrzewania cząsteczek miRNA powodują wczesne obumieranie embrionów. Opisano już szereg miRNA istotnych dla embriogenezy na różnych jej etapach: uwarunkowanych ekspresją genów Hox (schemat rozwoju wzdłuż osi przednio-tylnej), rozwoju układu nerwowego i hematopoezy [27]. Ciekawe doświadczenie wykonano na rybie danio pręgowany (*zebrafish*) pozbawiając ją wszystkich aktywnych cząsteczek miRNA poprzez wyłączenie genu kodującego rybonukleazę Dicer, konieczną do prawidłowego ich dojrzewania [17]. U takich mutantów zaobserwowano prawidłową specyfikację osi (zdefiniowanie głównych osi ciała: brzuszno-grzbietowej i przednio-tylnej) i tworzenie planu (seria zdarzeń, w których zróżnicowane komórki są aranżowane przestrzennie, tworząc tkanki i narządy). Poważne defekty pojawiły się dopiero podczas morfogenezy; nieprawidłowości dotyczyły między innymi neurulacji [mezoderma grzbietowa i pokrywająca ją ektoderma wchodzi w interakcję (indukcja), tworząc rynienkę cewy nerwowej, proces ten zapoczątkowuje organogenezę i dzieli ektodermę na trzy populacje komórek: cewę nerwową, naskórek i komórki grzebienia nerwowego], formowania komórek mózgu, ułożenia komórek podczas gastrulacji, rozwoju układu sercowo-naczyniowego etc. Mogłoby to świadczyć o tym, iż wczesne etapy rozwoju embrionalnego, kontrolowane przez geny, takie jak: *Nodal*, *Hedgehog*, *Wnt*, *Notch*, *FGF* i *BMP*, przebiegają bez udziału miRNA, bądź że w dojrzewaniu miRNA dla tych genów docelowych bierze udział rybonukleaza inna niż Dicer. Jednak podobne doświadczenie przeprowadzone na myszkach doprowadziło do śmierci embrionów jeszcze przed etapem specyfikacji osi [17].

miRNA a komórki macierzyste

Jeśli weźmie się pod uwagę zaangażowanie miRNA w regulację rozwoju osobniczego, nie dziwi fakt, że wiele z nich wybiórczo ulega ekspresji w komórkach macierzystych, mogąc wpływać na ich właściwości, takie jak: nieograniczona możliwość samoodnowy przy zachowaniu zdolności



Rycina 2. Udział miRNA w onkogenezie (wg [4, 6] modyfikacja)

do różnicowania i ich pluripotencjalność (za utrzymanie komórek w stanie pluripotencjalnym odpowiada bezpośrednio gen z rodziny POU kodujący czynnik transkrypcyjny Oct4, za zdolność do samoodnowy może odpowiadać LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) aktywujący Stat3. W embrionalnych komórkach macierzystych ES (*embryonic stem*) sklonowano 36 RNA o charakterystyce typowej dla miRNA, z czego 15 okazało się być nowymi, nieopisanymi dotąd cząsteczkami miRNA [30]. Porównując ekspresję miRNA w ES z ekspresją w EC (*embryonic carcinoma*) i innych typach komórek stwierdzono, że są pewne miRNA obecne zarówno w ES, jak w EC (być może odgrywają one konserwatywną rolę w ludzkich pluripotencjalnych komórkach macierzystych); są takie, które ulegają ekspresji wyłącznie w ES (funkcje typowe dla komórek ES?), takie, które są rzadkie w ES, natomiast częste np. w linii HeLa (miRNA, których ekspresja typowa jest dla określonego stadium różnicowania komórki, mogą odpowiadać za regulację rozwoju i różnicowania) i wreszcie takie, których ekspresja jest powszechna (regulacja podstawowych funkcji komórkowych) [30].

Ciekawa jest także obserwacja poziomu ekspresji miRNA ze skupiska miR-12-13-14 (chromosom 19) – obniżenie ich ekspresji następuje wcześniej niż spadek ekspresji genu Oct4, najwcześniej dotychczas poznanego markera komórek ES. Być może właśnie te miRNA są regulatorami najwcześniejszej fazy rozwoju embrionalnego [30].

Ostatnie badania wykazały, że komórki macierzyste muszki owocowej nie poddają się zatrzymaniu cyklu komórkowego (*cell cycle arrest*) dzięki miRNA, które hamują ekspresję genu *Dacapo* (DAP), kodującego inhibitor cyklu komórkowego [12].

BADANIA EKSPRESJI miRNA

Jedną z ciekawych cech charakteryzujących miRNA jest specyfika ich ekspresji, zależna od rodzaju tkanki i/lub stadium rozwojowego. Wczesne badania ekspresji miRNA

wykorzystywały odwrotną transkryptazę i opierały się głównie na hybrydyzacji typu Northern [29]. Jedną z najnowocześniejszych metod badań ekspresji jest analiza mikromacierzy. W klasycznych mikromacierzach jednak często wykorzystuje się do odwrotnej transkrypcji oligo-dT, natomiast dojrzałe miRNA nie mają ogonka poli-A. Kilka grup opracowało ostatnio specyficzne mikromacierze oligonukleotydowe dla miRNA. Oligo-nukleotydy komplementarne do miRNA połączone są kowalencyjnie z membranami (*solid support matrix*) lub syntetyzowane na nich *in situ*. Próbkę miRNA poddaje się odwrotnej transkrypcji z mieszaniną starterów, a powstałe cRNA jest znakowane fluorochromami; miRNA może być też znakowane bezpośrednio. Ostatnio wprowadzono też nowe metody symultanicznego znakowania wieloma fluorochromami, umożliwiające czułą detekcję nawet rzadkich miRNA. Metody te umożliwiają analizę zmian poziomu ekspresji miRNA w czasie i są dokładniejsze niż hybrydyzacja typu Northern [22].

Ponieważ ilość opisanych miRNA stale rośnie, będzie temu zapewne towarzyszyło powstawanie nowych mikromacierzy [34].

POSZUKIWANIE NOWYCH miRNA

Próby poszukiwania nowych miRNA rozpoczęły się już w momencie opisania genu *let-7* u *C. elegans* [1]. W tym celu przeszukuje się bazy danych wykorzystując programy, takie jak BLASTN, umożliwiające odnalezienie sekwencji homologicznych. Innym sposobem jest wyszukiwanie sekwencji RNA, których budowa sugeruje prawdopodobieństwo tworzenia struktur „szpilki do włosów” (programy Mfold, MiRscan, struktura drugorzędowa). Jeszcze inna jest zasada metody znanej jako cieniowanie filogenetyczne (*phylogenetic shadowing*). Opiera się ona na porównaniu sekwencji gatunków blisko spokrewnionych, co umożliwia identyfikację sekwencji konserwatywnych na poziomie nukleotydowym [1]. Wszystkie do tej pory poznane ludzkie i mysie miRNA oraz ich prekursorzy wpisane są do specjalnego rejestru (*miRNA Registry*).

Poszukiwanie genów docelowych

Przewidywanie sekwencji docelowych dla miRNA u roślin jest dosyć proste, do swojego działania wymagają one bowiem całkowitej homologii z obszarem 3'UTR. U zwierząt sytuację komplikuje fakt, że homologia ta wcale nie musi być pełna, co więcej – większość sekwencji docelowych różni się przynajmniej kilkoma nukleotydami [1, 21]. Zasadniczymi kryteriami wspólnymi dla wszystkich metod poszukiwania genów docelowych są:

- 1) komplementarność pomiędzy 3'UTR potencjalnego genu docelowego a miRNA ze zwróceniem uwagi na krytyczny moment idealnej komplementarności w okolicy 5' końca miRNA,
- 2) konserwatywność docelowych sekwencji 3'UTR pomiędzy genami ortologami,
- 3) kinetyka i termodynamika reakcji pomiędzy miRNA i genem docelowym, określona przy pomocy programu analizującego II-rzędową strukturę RNA (*foldng*).

Najbardziej znanym programem do poszukiwania genów docelowych jest algorytm TargetScan (kręgowce), natomiast program zawężający poszukiwania tylko do sekwencji ludzkich to DIANA MicroT [1, 21]. Opisano już wiele przypuszczalnych genów docelowych, na przykład *N-MYC* dla miR-101, *E2F1* dla miR-20 i -106, *SDF1* dla miR-23a i -23b czy *G6PD* dla miR-1 i -206. Potwierdzono jednocześnie, że najważniejszy dla rozpoznania genu docelowego jest konserwatywny region 5' miRNA [21].

Odkrycie miRNA jest jedną z większych niespodzianek genetyki molekularnej, jakie wydarzyły się w ostatnich czasach. Niewielka jest jeszcze nasza wiedza na temat dokładnych mechanizmów działania miRNA i genów, na których ekspresję wpływają. Wiadomo jednak, że badania nad miRNA mogą ułatwić zrozumienie biologii kluczowych procesów życiowych komórek i organizmów.

PIŚMIENNICTWO

- [1] BROWN JR, SANSEAU P. A computational view of microRNAs and their targets. *Drug Discovery Today* 2005; **10**: 595–601.
- [2] CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH E, ADLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 15524–15529.
- [3] CALIN GA, LIU C, SEVIGNANI C, FERRACIN M, FELLI N, DUMITRU CD, SHIMIZU M, CIMMINO A, ZUPO S, DONO M, DELL'AQUILA ML, ALDER H, RASSENTI L, KIPPS JT, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. MicroRNA profiling reveals different signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 11755–11760.
- [4] CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 2999–3004.
- [5] CHEN C, LODISH HF. MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis. *Semin Immun* 2005; **17**: 155.
- [6] CIMMINO A, CALIN GA, FABBRI M, IORIO MV, FERRACIN M, SHIMIZU M, WOJCIK SE, AQEILAN RI, ZUPO S, DONO M, RASSENTI L, ALDER H, VOLINIA S, LIU C, KIPPS TJ, NEGRINI M, CROCE CM. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 13944–13949.
- [7] CROCE CM, CALIN GA. miRNAs, cancer and stem cell division. *Cell* 2005; **122**: 1–6.
- [8] CULLEN BR. Derivation and function of small interfering RNAs and microRNAs. *Virus Res* 2004; **102**: 3–9.
- [9] EIS PS, TAM W, SUN L, CHATBURN A, LI Z, GOMEZ MF, LUNDE E, DAHLBERG JE. Accumulation of miR-155 and *BIC* RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **102**: 3627–3632.
- [10] FILIPOWICZ W, JASKIEWICZ L, KOLB FA, PILLAI RS. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. *Curr Opin Struct Biol* 2005; **15**: 331–341.
- [11] 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.
- [12] FLINTOFT L. Small RNAs cross the divide. *Nature* 2005; **435**, 6: 592–593
- [13] GREGORY RI, SHIEKHATTAR R. MicroRNA biogenesis and cancer. *Canc Res* 2005; **65**: 3509–3512.
- [14] HAASE AD, JASKIEWICZ L, ZHANG H, LAINE S, SACK R, GATIGNOL A, FILIPOWICZ W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; **6**: 961–967.
- [15] HAMMOND SM, CAUDY AA, HANNON GJ. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2001; **2**: 110–119.
- [16] HE L, THOMSON JM, HERMANN MT, HERNANDO-MONGE E, MU D, GOODSON S, POWERS S, CORDON-CARDO C, LOWE SW, HANNON GH, HAMMOND SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; **435**: 828.

- [17] HOBERT O. MicroRNAs: all gone and what? *Curr Biol* 2005; **15**: R387–R389.
- [18] IWAI N, NARABA H. Polymorphisms in human pre-miRNAs. *Bioch Biophys Res Comm* 2005; **331**: 1440–1444.
- [19] JOHNSON SM, GROSSHANS H, SHINGARA J, BYROM M, JARVIS R, CHENG A, LABOURIER E, REINERT KL, BROWN D, SLACK FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; **120**: 635.
- [20] LEE Y, JEON K, LEE J, KIM S, KIM VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; **21**: 4663–4670.
- [21] LEWIS BP, SHIH I, JONES-RHOADES MW, BARTEL DP, BURGE CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; **115**: 787–798.
- [22] LIU C, CALIN GA, MELOON B, GAMLIEL N, SEVIGNANI C, FERRACIN M, DUMITRU CD, SHIMIZU M, ZUPO S, DONO M, ALDER H, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE CM. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 9740–9744.
- [23] LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BJ, MAK RH, FERRANDO AA, DOWNING JR, JACKS T, HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834–838.
- [24] McMANUS MT. MicroRNAs and cancer. *Sem Canc Biol* 2003; **13**: 253–258.
- [25] MELTZER PS. Small RNAs with big impacts. *Nature* 2005; **435**: 745–746.
- [26] O'DONNELL K, WENTZEL EA, ZELLER KI, DANG CV, MENDELL JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; **435**: 839–843.
- [27] PASQUINELLI AM, HUNTER S, BRACHT J. MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Develop* 2005; **15**: 200–205.
- [28] POY MN, ELIASSON L, KRUTZFELDT J, KUWAJIMA S, MA X, MACDONALD PE, PFEFFER S, TUSCHL T, RAJEWSKY N, RORSMAN P, STOFFEL M. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; **432**: 226–230.
- [29] SCHMITTGEN TD, JIANG J, LIU Q, YANG L. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors. *Nucl Acid Res* 2004; **32**: e43.
- [30] SUH M, LEE Y, KIM JY, KIM S, MOON S, LEE JY, CHA K, CHUNG HM, YOON HS, MOON SY, KIM VN, KIM K. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Develop Biol* 2004; **270**: 488–498.
- [31] TAKAMIZAWA J, KONISHI H, YANAGISAWA K, TOMIDA S, OSADA H, ENDOH H, HARANO T, YASUSHI Y, NAGINO M, NIMURA Y, MITSUDOMI T, TAKAHASHI T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Canc Res* 2004; **64**: 3753–3756.
- [32] TOMARI Y, ZAMORE PD. MicroRNA biogenesis: Droscha can't cut it without a partner. *Curr Biol* 2005; **15**: R61–R64.
- [33] 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.
- [34] YANG M, LI Y, PADGETT RW. MicroRNAs: small regulators with big impact. *Cytokine & Growth Factors Rev* 2005; **16**: 387–393.
- [35] 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**: 855–862.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 20.10.2005 r.

Przyjęto: 01.12.2005 r.

ul. Radziwiłłowska 11, 20-950 Lublin

aafilip@hotmail.com