



Mikrozarządzanie

Bogna Szarzyńska, Zofia Szweykowska-Kulińska, Artur Jarmołowski
Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Micromanagement

Summary

MicroRNAs (miRNAs) are an abundant group of endogenous small (~22) noncoding RNAs, found both in plants and animals. The total number of sequences encoding miRNA in genomes of these organisms is estimated to be ~1% of all genes. miRNAs derive from longer precursor transcripts which adopt a fold-back structure. Mature miRNAs are incorporated into ribonucleoprotein complexes miRNPs and take part in negative control of genes' expression by cleavage of mRNAs or inhibition of the translation. miRNAs influence a great range of biological processes, such as cell proliferation, stem cell maintenance, timing of cell fate in developmental process, organ morphogenesis, programmed cell death and fat metabolism.

Key words:

regulatory RNA, stRNA, miRNA, miRNP, ncRNA.

1. Wprowadzenie

W organizmach żywych, oprócz RNA zawierającego informację o sekwencji aminokwasowej białek czyli kodujących RNA (*messenger RNA*, mRNA), funkcjonuje duża, heterogenna grupa cząsteczek niekodującego RNA (*non-coding RNA*, ncRNA) (1,2). Nie stanowią one matrycy w procesie translacji i jednocześnie wykazują duże zróżnicowanie pod względem funkcjonalnym, co znajduje odzwierciedlenie w różnorodności ich struktury (3,4). Wśród ncRNA można wyróżnić:

1. Konstytutywne RNA, ulegające zasadniczo ciągłej ekspresji na względnie stałym poziomie (m.in. rRNA, tRNA, snRNA, snoRNA)

Adres do korespondencji

Bogna Szarzyńska,
Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Międzychodzka 5,
60-371 Poznań

2. RNA regulatorowe, syntetyzowane na określonym etapie rozwoju ontogenetycznego organizmu lub różnicowania komórek, bądź też w odpowiedzi na działanie czynników środowiska (1). Są one zaangażowane nie tylko w regulację ekspresji genów na poziomie transkrypcji i translacji, ale również decydują o lokalizacji mRNA i pre-mRNA oraz modulują aktywność katalityczną białek. Wśród nich wyróżnia się m.in. bardzo liczną grupę małych endogennych cząsteczek zwanych miRNA (*micro RNA*), które w ostatnich latach stały się przedmiotem szczególnego zainteresowania badaczy.

2. Ogólna charakterystyka miRNA

Wszystkie dotychczas poznane miRNA to jednoniciowe cząsteczki o długości około 22 (od 19 do 29) nukleotydów, posiadające resztę fosforanową na 5' końcu i grupę hydroksylową na 3' końcu (5-22). Powstają one z dłuższych cząsteczek RNA w procesie dojrzewania przebiegającym w jądrze komórkowym i cytoplazmie (7-10). Biorą udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów polegającej na degradacji mRNA lub hamowaniu translacji (8,9,13,14). Ich obecność wykazano w różnych wielokomórkowych organizmach eukariotycznych – zarówno roślinnych (jedno- i dwuliściennych), jak i zwierzęcych (u nicieni, owadów, ryb, ptaków i ssaków, w tym także u człowieka), stąd przypuszcza się, że mechanizm regulacji ekspresji genów z udziałem miRNA funkcjonował już u wczesnych eukariontów (11). Geny kodujące miRNA występują również w genomie wirusowym – w obrębie nici (+)DNA ludzkiego wirusa Epstein-Barr (HSV-4) stwierdzono występowanie pięciu sekwencji, których transkrypty stanowią prekursorzy sześciu różnych cząsteczek miRNA (15,16). W każdym organizmie może funkcjonować wiele różnych miRNA, np. u *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano dotychczas ponad 110, u *Caenorhabditis elegans* niemal 120, a u człowieka ponad 200 miRNA odmiennych pod względem sekwencji nukleotydowej oraz miejsca i czasu powstawania (specyficznych dla określonego typu komórki lub tkanki, etapu rozwoju organizmu lub różnicowania komórek w których powstają). Cząsteczki te wykazują dużą zachowawczość ewolucyjną – spośród dotąd poznanych miRNA różnych organizmów, niemal wszystkie mają swe odpowiedniki u blisko spokrewnionych gatunków (np. *Caenorhabditis elegans* i *Caenorhabditis briggsae* czy *Homo sapiens* i *Mus musculus*) (17,18,20), a dla znacznej ich grupy wykazano istnienie homologów nawet u organizmów filogenetycznie dość odległych (np. znane są ludzkie homology ponad 1/3 cząsteczek miRNA *C. elegans*) (18,20,22).

3. Nazewnictwo miRNA

Nazwy poszczególnych miRNA składają się z przedrostka „miR” oraz numeru identyfikacyjnego, np. miR-7, miR-20, miR-301 (15). Oznaczenia genów tworzone są w podobny sposób, z tym, że pisane są kursywą. Zależnie od tego, czy sekwencja

kodująca miRNA występuje w genomie organizmu zwierzęcego czy roślinnego, przedrostek tworzą litery małe (np. *mir-124 D. melanogaster*) lub duże (np. *MIR172 A. thaliana*). Jeżeli w danym organizmie identyczne miRNA powstają z różnych prekursorów, do ich nazwy dodaje się po myślniku drugi numer porządkowy (np. miR-218-1 i miR-218-2). Natomiast miRNA, wykazujące niewielkie różnice w sekwencji nukleotydowej, oznaczane są dodatkowo małymi literami alfabetu (np. miR-99a, miR-99b). Niekiedy z każdego z ramion prekursora może powstać funkcjonalna cząsteczka miRNA – wówczas nazwa jednej z nich (rzadziej występującej) opatrzona jest gwiazdką (np. miR-7d i miR-7d*) lub też informację o tym, z którego ramienia (3' czy 5') powstaje dana cząsteczka umieszczamy po myślniku (np. miR-324-3p i miR-324-5p). W przypadku stRNA *C. elegans* i ich homologów, przedrostek „miR” zastępuje odpowiednio: „lin” lub „let” [lin-4 i let-7 były pierwszymi odkrytymi cząsteczkami miRNA. Nazwy im nadane szybko się utrwaliły w języku biologicznym i ze względu na tradycję nie zostały zmienione nawet po ustaleniu zasad jednolitej nomenklatury tej klasy RNA]. Ponadto niektóre miRNA nie są numerowane, np. miR-bantam *D. melanogaster* i *C. elegans* (udział *locus bantam* w regulacji wzrostu muszki wykazano jeszcze przed scharakteryzowaniem jego produktu) czy miR-JAW *A. thaliana* (choć niekiedy stosuje się oznaczenie: miR319).

4. Geny miRNA

Większość sekwencji kodujących miRNA jest zlokalizowana w rejonach międzygenowych, w znacznej odległości (zwykle powyżej 1000 pz) od wcześniej scharakteryzowanych genów i stanowi niezależne jednostki transkrypcyjne, niemniej jednak część poznanych genów *mir/MIR* (np. około 25% u człowieka) nie ulega ekspresji pod kontrolą odrębnego promotora, lecz znajduje się w obrębie intronów (wówczas powstawanie funkcjonalnych cząsteczek regulatorowych jest związane z dojrzewaniem pre-mRNA na drodze splicingu) (5,6,9-11,14,17,18,21,22). Najprawdopodobniej niektóre geny miRNA są zlokalizowane w egzonach innych genów (18,23).

Znane są również sekwencje kodujące miRNA, tworzące zespoły genowe i ulegające transkrypcji w postaci policistronowego RNA, stanowiącego prekursor dla kilku różnych cząsteczek, często ze sobą funkcjonalnie powiązanych (5,9,10,21). W genomach nicieni i człowieka takie zgrupowania występują dość rzadko (17,20), jednakże u muszki owocowej ponad połowa poznanych dotąd genów miRNA jest zorganizowana w ten sposób (22). Ponadto niektóre miRNA kodowane są w kilku różnych *loci* genomowych (11).

Geny miRNA mogą zawierać introny i egzony (5,10,21). Stwierdzono, że w wyniku transkrypcji *let-7 C. elegans* powstaje długa poliadenylowana cząsteczka RNA, która ulega *trans*-splicingowi. Delecja rejonu zawierającego miejsce splicingowe uniemożliwia powstawanie dojrzałych miRNA i prowadzi do akumulacji pierwotnych transkryptów (24).

Tabela

Występowanie let-7 u wielu organizmów zwierzęcych

Organizm	stRNA	Sekwencja
<i>Caenorhabditis elegans</i>	let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Drosophila melanogaster</i>	let-7	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Mus musculus</i>	let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Rattus norvegicus</i>	let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Gallus gallus</i>	let-7a-1	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU
<i>Homo sapiens</i>	let-7a	UGAGGUAGUAGGUUGUAUAGUU

Występowanie let-7 stwierdzono u wielu organizmów zwierzęcych. Sekwencja nukleotydowa tej cząsteczki jest bardzo zachowawcza. U myszy, szczura, bankiwy (ptaka z rzędu kuraków) i człowieka wyszczególnione cząsteczki miRNA są kodowane w 2 lub 3 loci. Ponadto w komórkach ssaków funkcjonują cząsteczki let-7 (długości 19-22 nt), których sekwencja nukleotydowa nieznacznie różni się od podanej (nie uwzględniono ich w zestawieniu). Ich geny oznaczane są odmiennymi małymi literami alfabetu (wg 15).

Całkowita liczba genów miRNA w poszczególnych organizmach nie jest znana, jednak szacuje się, że stanowią one ok. 1% wszystkich sekwencji kodujących (17,20).

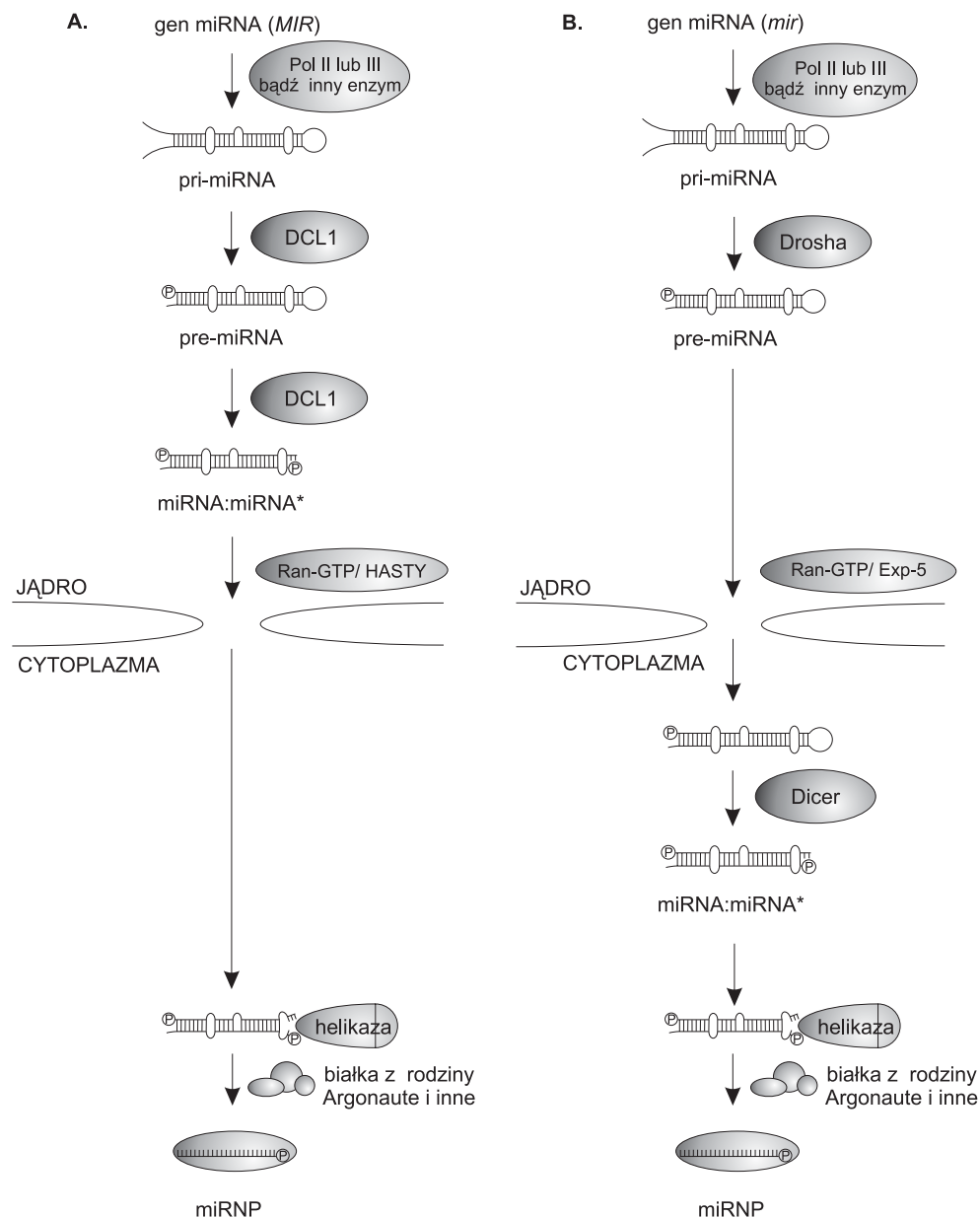
5. Biogeneza miRNA

W przypadku sekwencji kodujących miRNA, zlokalizowanych w obrębie intronów, transkrypt powstaje z udziałem polimerazy II. Dotychczas nie wykazano jednoznacznie jaki(e) enzym(y) i cząsteczki regulatorowe są zaangażowane w transkrypcję pozostałych genów miRNA, jednak uważa się, że proces ten może być katalizowany także przez polimerazę II, bądź też przebiegać z udziałem polimerazy III (8,9).

Transkrypty genów miRNA, tzw. pri-miRNA, tworzą strukturę spinki do włosów (*hairpin*), składającą się z pętli i fragmentu dwuniciowego (rys. 1) (8,9). W trzonie struktury często, zwłaszcza w przypadku cząsteczek powstających w komórkach zwierzęcych, występują pętle i wybrzuszenia (tworzone przez niesparowane fragmenty jednej z nici), a ponadto końce takiej cząsteczki prekursorowej zwykle nie są do siebie komplementarne (14).



Rys. 1. Pri-miR-330 *H. sapiens*. Prekursor tworzy stabilną strukturę zawierającą pętlę oraz rejon dwuniciowy, w obrębie którego występują pojedyncze niesparowane nukleotydy. Funkcjonalna cząsteczka powstaje z ramienia 3' prekursora (wg 15).



Rys. 2. Powstawanie miRNA w komórkach roślinnych (A) i zwierzęcych (B) (wg 9). Pierwotny transkrypt *MIR/mir* (*pri-miRNA*) przyjmuje strukturę spinki. Proces jądrowego dojrzewania miRNA katalizowany jest przez RNazę III (DCL-1/Drosha). W transporcie cząsteczki prekursorowej do cytoplazmy bierze udział białko z grupy karioferyn (HASTY/Exp-5). Dojrzała cząsteczka miRNA powstaje z jednej z nici dsRNA i posiada grupę fosforanową na 5' końcu oraz wolną grupę hydroksylową na 3' końcu.

W jądrze obie nici rejonu helikalnego zostają rozcięte w pobliżu podstawy struktury spinki przez endonukleazę RNazę III (rys. 2) (9,25). W komórkach zwierzęcych skrócenie cząsteczki RNA przy 3' i 5' końcu jest katalizowane przez enzym Drosha, natomiast u roślin w jądrowym etapie dojrzewania miRNA bierze udział DCL-1 (DICER LIKE-1). W obu przypadkach w wyniku działania jądrowej rybonukleazy powstaje pre-miRNA z resztą kwasu fosforanowego na 5' końcu i wystającym (ok. dwunukleotydowym) końcem 3' z wolną grupą hydroksylową. U zwierząt cząsteczka prekursorowa w takiej postaci (długości ~70 nt) jest transportowana do cytoplazmy. Natomiast w komórkach roślinnych pre-miRNA zostaje uprzednio skrócony do 20-30 nt (zależnie od długości dojrzałego miRNA, który z niego powstanie), przy czym oba końce 5' są krótsze o około 2 nt w stosunku do końców 3'OH.

W transporcie cząsteczki prekursorowej z jądra do cytoplazmy bierze udział eksportyna 5 (Exp-5) u zwierząt i (przypuszczalnie) jej ortolog, HASTY, u roślin (9,26,27). Exp-5 jest zdolna do wiązania RNA, zawierających strukturę minihelisy (26). Należy do grupy rozpuszczalnych receptorów, karioferyn, które mogą zakotwiczać się i ulegać translokacji przez pory otoczki jądrowej. W oddziaływaniu karioferyny i transportowanej cząsteczki pośredniczy białko Ran o aktywności GTPazy. Właściwy kierunek transportu zapewnia gradient RanGTP/RanGDP – w jądrze, gdzie poziom RanGTP jest wysoki, Exp-5 wiąże pre-miRNA, natomiast w cytoplazmie niski poziom RanGTP warunkuje uwolnienie cząsteczki prekursorowej i umożliwia jej dalsze dojrzewanie.

Dojrzała cząsteczka miRNA powstaje z jednego z ramion struktury spinki. W komórkach zwierzęcych reakcja ta jest katalizowana przez cytoplazmatyczny enzym Dicer, współdziałający z białkami z rodziny Argonaute, np. u nicieni są to m.in. AGL-1 i AGL-2 (7-9,14,28). W komórkach roślinnych proces ten prawdopodobnie zachodzi w obrębie jądra z udziałem DCL-1 (9,30). Ponadto u roślin akumulacja funkcjonalnych miRNA jest zależna od aktywności HEN1, jednak dotychczas nie stwierdzono czy białko to odgrywa rolę w syntezie i/lub stabilizacji cząsteczek prekursorowych, czy też jego obecność wpływa na powstawanie i stabilność dojrzałych miRNA (30). W komórkach bakterii, grzybów i zwierząt występują homologi HEN1, jednak ich funkcja nie została dotąd poznana.

Obecność Dicer po raz pierwszy odkryto u *D. melanogaster*, znane są jednak homologi tego enzymu u *C. elegans* (DCR-1), *H. sapiens* (Dicer) i *A. thaliana* (DCL-1, dawniej CAF). Białka te zawierają (licząc od N-końca):

- domenę o aktywności helikazy/ATPazy,
- domenę PAZ, która najprawdopodobniej odpowiada za oddziaływanie z innymi białkami, również zawierającymi tę domenę (np. z rodziny Argonaute),
- dwie domeny katalityczne o aktywności RNazy III,
- przynajmniej jedną domenę zdolną do wiązania dsRNA (43).

Dicer rozpoznaje dwuniciowy pre-miRNA i katalizuje reakcję cięcia nici dupleksu w rejonie ~2 skrętów helisy od podstawy struktury. W wyniku działania rybonukleazy uwolniony zostaje fragment RNA tworzący uprzednio trzon spinki, jednak tylko

jedna z dwóch nici ulega akumulacji w postaci dojrzałego miRNA – druga nić (miRNA^{*}) jest najprawdopodobniej degradowana (8,9,31,32). Przypuszcza się, że o trwałości cząsteczek może decydować zdolność tworzenia kompleksów rybonukleoproteiny (miRNP) oraz obecność docelowego mRNA (33).

W wyniku jądrowych i cytoplazmatycznych procesów dojrzewania z pri-miRNA powstaje około 22-nukleotydowa cząsteczka RNA z grupą fosforanową na 5' końcu i grupą hydroksylową na 3' końcu. Na podstawie analizy ilościowej miRNA u *C. elegans* i w komórkach HeLa wykazano, że synteza miRNA przebiega na wysokim poziomie – poszczególne rodzaje miRNA mogą występować w pojedynczej komórce w liczbie przekraczającej nawet 50 000 cząsteczek (20,33).

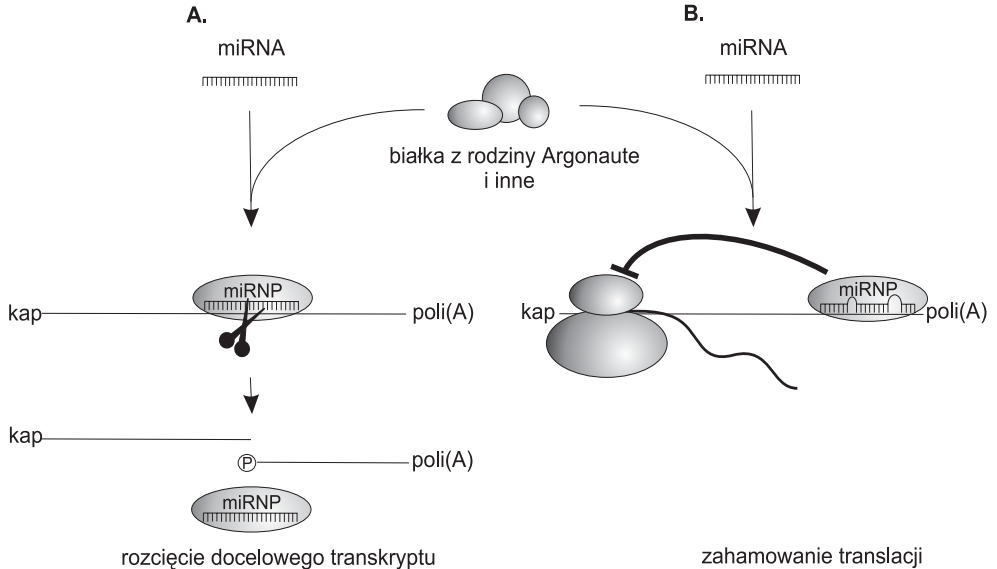
Cząsteczki RNA, powstałe w wyniku transkrypcji genów *mir/MIR*, mogą być redagowane. W badaniach *in vivo* wykazano, że prekursor miRNA-22 u człowieka i myszy ulegają potranskrypcyjnej modyfikacji polegającej na deaminacji adenozy (34). W wyniku reakcji katalizowanej przez enzymy jądrowe: ADAR1 i ADAR2 (*adenosine deaminases acting on RNA*) adenozy zostaje przekształcona w inozynę, która pod względem zdolności tworzenia wiązań wodorowych z innymi nukleozydami funkcjonuje jak guanozyna. Ponieważ do modyfikacji dochodzi m.in. w pozycjach: -1, +1, +2 (gdzie +1 jest pierwszym nt dojrzałego miRNA), ich występowanie może mieć wpływ na przebieg dojrzewania (rozcinięcie) prekursora z udziałem Dicer (-1, +1), wybór nici dupletu, z której powstaje dojrzała cząsteczka (+1, +2) oraz rozpoznanie docelowego mRNA przez miRNA i ich oddziaływanie.

6. Mechanizmy działania miRNA

Dotychczas odkryto dwa mechanizmy potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów zachodzącej z udziałem miRNA: degradacji mRNA oraz hamowania translacji (rys. 3) (8,9).

W pierwszym przypadku specyficzny miRNA wiąże się z komórkowymi mRNA zawierającymi sekwencje do niego całkowicie (lub niemal całkowicie) komplementarne. W ten sposób selekcjonuje transkrypty przeznaczone do degradacji i ukierunkowuje działanie endonukleazy obecnej w kompleksie miRNP. Docelowy mRNA zostaje rozcięty w połowie rejonu sparowanego z miRNA, natomiast sam miRNA pozostaje niezmienny i może ponownie wziąć udział w rozpoznawaniu i degradacji mRNA (35). W efekcie, podobnie jak w przypadku procesu RNA_i, następuje obniżenie poziomu określonego transkryptu i syntezy białka, które koduje. Mechanizm ten funkcjonuje powszechnie w świecie roślin, natomiast u zwierząt dotychczas scharakteryzowano tylko jeden miRNA (miR-196), który działa w taki sposób (35,36).

Z kolei regulacja ekspresji genów na drodze hamowania translacji nie zależy od pełnej komplementarności pomiędzy miRNA a docelowym mRNA (8,9). Przyłączenie regulatorowego RNA następuje zazwyczaj w obrębie 3'UTR (*untranslated region*) i prowadzi do zahamowania już zainicjowanej syntezy białka. Antysensowymi repre-



Rys. 3. Dwa mechanizmy działania miRNA. A. cząsteczka miRNA (składnik kompleksu rybonukleoproteinowego miRNP) wiąże się do docelowego mRNA na zasadzie całkowitej komplementarności i wyznacza miejsce rozcięcia transkryptu. Mechanizm ten jest powszechny w świecie roślin, ale funkcjonuje również w komórkach zwierzęcych. B. Cząsteczka miRNA zasocjowana z białkami (cząstka miRNP) wiąże się do (zazwyczaj) niecałkowicie komplementarnego rejonu docelowego mRNA (najczęściej w obrębie 3'UTR), co prowadzi do zahamowania już zainicjowanej syntezy białka. Mechanizm ten jest powszechny w świecie zwierząt, ale funkcjonuje również w komórkach roślinnych.

sorami translacji są wszystkie scharakteryzowane dotąd miRNA organizmów zwierzęcych, a także jeden z miRNA syntetyzowanych w *A. thaliana* (miR-172) (4).

Zarówno w przypadku degradacji mRNA, jak i hamowania translacji, w procesie, oprócz miRNA, biorą udział białka z rodziny Argonaute (zwane również białkami PPD, *PIWI/PAZ domain proteins*, ze względu na obecność dwóch konserwatywnych domen: PAZ i PIWI) oraz dodatkowe proteiny (37). Oddziałują one z cząsteczkami miRNA tworząc kompleksy miRNP. W komórkach człowieka zidentyfikowano szereg cząstek rybonukleoproteinowych o stałej sedymentacji ok. 15S, zawierających różne miRNA oraz białka, m.in. Gemin3 (helikazę RNA), Gemin4 oraz ludzki homolog białka Argonaute – eIF2C2 (32).

7. stRNA (*small temporal RNA*)

Pierwszym poznany miRNA była cząsteczka kodowana przez gen *lin-4* (*lineage-4*) *C. elegans*, pełniąca ważną rolę w regulacji przebiegu rozwoju tego nicienia (38). Wykazano, że RNA o długości 22 nt powstaje z dłuższego (61 nt) prekursora

o strukturze pnia i pętli, a w rejonie 3'UTR transkryptu *lin-14* występuje 7 sekwencji do niego komplementarnych. Obecność miRNA *lin-4* koreluje ze zmniejszeniem ilości białka LIN-14, natomiast nie wpływa ani na poziom mRNA stanowiącego matrycę do jego syntezy, ani na jego poliadenylację, transport czy zdolność wiązania się z rybosomami. Dlatego uważa się, że parowanie wymienionych cząsteczek RNA prowadzi do zahamowania translacji i w konsekwencji umożliwia przejście do drugiego stadium larwalnego (39). W dalszych badaniach wykazano, że *lin-4*, poprzez oddziaływanie miRNA:mRNA w obrębie rejonu 3'UTR mRNA *lin-28*, bierze udział w negatywnej kontroli poziomu także i tego transkryptu (40).

Kolejnym ważnym etapem badań było odkrycie, że inny gen *C. elegans*, *let-7* (*let-hal-7*), także koduje ~22-nukleotydowy regulatorowy RNA, a jego ekspresja umożliwia przejście z ostatniego (czwartego) stadium larwalnego do formy dojrzałej (40). Powstały miRNA hybrydyzuje bowiem w obrębie 3'UTR *lin-41* i prowadzi do obniżenia poziomu syntezy kodowanego przez niego białka. Ponadto *let-7* jest komplementarny do sekwencji w rejonie 3'UTR transkryptów: *lin-14*, *lin-28*, *lin-42* i *daf-12*. Występowanie ok. 21-nukleotydowych cząsteczek RNA o sekwencji bardzo podobnej do *let-7* stwierdzono także u dużej grupy innych zwierząt o symetrii dwubocznej: pierścienic, stawonogów, mięczaków, półstrunowców i kręgowców (19,21). Zachowawczy charakter ma nie tylko sekwencja cząsteczki, ale również czas jej syntezy w procesie ontogenezy. U *D. melanogaster* *let-7* pojawia się pod koniec rozwoju larwalnego. W początkowym okresie stadium poczwarki ulega on akumulacji aż do osiągnięcia określonego poziomu, na którym utrzymuje się do czasu wykształcenia się postaci dorosłej. U *Danio rerio* ekspresja *let-7* rozpoczyna się 24-48 godzin po zapłodnieniu i zachodzi we wszystkich późniejszych etapach rozwoju. Obecność *let-7* wykryto także u dorosłych pierścienic i mięczaków oraz u człowieka, przy czym spośród ludzkich narządów najniższym poziomem tego stRNA charakteryzuje się szpik kostny (19). Najprawdopodobniej wynika to stąd, że w znacznej mierze tworzą go komórki jeszcze niedojrzałe, podczas gdy *let-7* pełni ważną rolę w procesie różnicowania.

Ze względu na to, że opisane cząsteczki RNA są syntetyzowane w organizmach nicieni tylko na określonych etapach ich rozwoju, nazwano je małymi przejściowymi RNA (*small temporal RNAs*, *stRNAs*). W późniejszych badaniach wykazano obecność w innych organizmach eukariotycznych wielu podobnych (pod względem struktury i biogenezy) regulatorowych cząsteczek RNA, dla których przyjęto nazwę miRNA (5,6,21).

8. Funkcje miRNA

Znaczna część scharakteryzowanych roślinnych miRNA jest zaangażowana w regulację ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne, w szczególności tych pełniących ważną rolę w różnicowaniu komórek i ontogenezie (4,9,12-14,41,42).



Rys. 4. Zależności pomiędzy miR-162 i 168 oraz białkami DCL-1 i AGO1. DCL-1 bierze udział w jądrowym etapie dojrzewania prekursorów miRNA, w tym także miR-162 i 168. AGO1 jest zaangażowane w biogenezę i funkcjonowanie dojrzałych cząsteczek miRNA. Z kolei miR-162 i miR-168 działają jako negatywne regulatory ekspresji genów *DCL-1* i *AGO1* (ujemne sprzężenie zwrotne). Obniżenie poziomu białek DCL-1 i AGO1 prowadzi do spadku poziomu miRNA, tak zatem miR-162 i 168 pośrednio biorą udział w kontroli puli miRNA.

Blokowanie ekspresji tych genów może zachodzić już na poziomie transkrypcji, jednak aby szybko całkowicie zahamować syntezę określonego białka konieczne jest wyeliminowanie już istniejącego mRNA, co jest możliwe dzięki miRNA. Ponadto u roślin miR162 i miR168 biorą udział w negatywnej kontroli poziomu transkryptów odpowiednio: *DCL-1* i *AGO1*, kodujących białka ważne w biogenezie i funkcjonowaniu miRNA, a zatem regulują m.in. własny poziom poprzez ujemne sprzężenie zwrotne (rys. 4) (13,14,41,43).

U roślin miRNA najczęściej „wyciszają” na poziomie mRNA czynniki transkrypcyjne zaangażowane w kontrolę rozwoju organizmu, natomiast u ssaków większość miRNA „wycisza” transkrypty, których produkty nie wpływają bezpośrednio na ekspresję innych genów (9,45).

Funkcjonowanie miRNA ma wpływ m.in. na rozwój liści (46,47) i kwiatów (48) oraz na funkcjonowanie merystemów wierzchołkowych i powstawanie wiązek przewodzących (49) u roślin, na proliferację komórek, apoptozę oraz metabolizm tłuszczów u muszki owocowej (50-54), hematopoezę (55) i różnicowanie komórek nerwowych u ssaków (56). Ponadto niektóre ludzkie geny *mir* są zlokalizowane w rejonach związanych z rozwojem chorób nowotworowych, takich jak białaczki, rak piersi, jajników i prostaty, co dodatkowo wskazuje, że miRNA biorą udział w regulacji podziałów komórkowych i apoptozy (56,57).

8.1. Udział miR165 i miR166 w kształtowaniu polarności liści u *Arabidopsis*

Prawidłowo wykształcony liść *A. thaliana* wykazuje spłaszczenie grzbietobrzuszne i cechuje się polarnością układu tkanek. [Począwszy od strony brzusznej, tj. spodniej, wyróżniamy: epidermę dolną z aparatami szparkowymi, mięksisz gąbczasty i wiązki przewodzące, mięksisz palisadowy, skórę]. Duże znaczenie dla właściwego rozwoju liści mają dwa czynniki transkrypcyjne, należące do rodziny HD-ZIP III (*homeodomain/leucine zipper*): PHB (PHABULOSA) i PHV (PHAVOLUTA) (56,58). Obecność tych białek w ściśle zdefiniowanych komórkach zawiązków liści jest konieczna

do prawidłowego wykształcenia doosiowej (grzbietowej) strony dojrzałych organów.

W mutantach *ago1* występują nieprawidłowości dotyczące funkcjonowania merystemu i polarności liści – komórki są kierowane przede wszystkim na drogę różnicowania w komórki doosiowej części liścia (47,57,59). Ponieważ białko AGO1 (ARGONAUTE1) jest zaangażowane w powstawanie i funkcjonowanie miRNA, obserwowane objawy fenotypowe mutantów *ago1* wskazują na udział tego niskocząsteczkowego regulatorowego RNA w kontroli poziomu białek PHB i PHV, a poprzez to – w procesie rozwoju liści.

Najprawdopodobniej zmniejszenie ilości mRNA jest możliwe dzięki działaniu miR165 i miR166 (46). Częsteczki te ulegają nagromadzeniu najpierw w merystemie zarodka, a następnie w części odosiowej (brzuszej) rozwijającego się liścia. Przypuszcza się, że parują one z transkryptami *PHB* i *PHV* i umożliwiają ich degradację, w wyniku czego nie dochodzi do syntezy obu białek i możliwe jest prawidłowe wykształcenie spodniej strony liścia. Potwierdzono to w analizie mutantów *phb/phv* – zmiany wprowadzone do sekwencji mRNA, kodujących oba czynniki transkrypcyjne nie powodują zaburzeń w ich funkcjonowaniu, jednak uniemożliwiają parowanie z miR165 i miR166. Brak zróżnicowania przestrzennego w rozmieszczeniu PHV i PHB prowadzi do przesunięcia naturalnej równowagi w kierunku różnicowania w komórki grzbietowej strony liści, w wyniku czego organy te przyjmują trąbkowaty kształt.

8.2. Udział miR172 w regulacji czasu kwitnienia i morfogenezie kwiatów

Kwitnienie roślin jest kontrolowane przez szereg czynników środowiskowych i endogennych. U *Arabidopsis* na przebieg tego procesu ma wpływ ponad 80 genów, w tym także kodujących miRNA (60). Nadekspresja miR172 przyspiesza kwitnienie i powoduje zaburzenia w rozwoju kwiatów (48). Obserwowany efekt fenotypowy jest wynikiem obniżenia poziomu syntezy czynników transkrypcyjnych z rodziny APETALA2, wśród których przynajmniej niektóre funkcjonują jako represory kwitnienia.

Dojrzały miR172 ma długość 21 nukleotydów i może hybrydyzować blisko 3' końca mRNA *AP2*. Miejsce wiązania miR172 występuje także przy 3' końcu transkryptów kodujących trzy inne białka z rodziny APETALA2 (*TOE1*, *TOE2* i *TOE3*) oraz w mRNA kukurydzy, powstałych w wyniku ekspresji genów *INTERMINATE SPIKELET1* i *GLOSSY15*. Nadekspresja zarówno *MIR172a-1*, jak i *MIR172a-2* sprawia, że kwitnienie jest znacznie przyspieszone, a w rozwoju kwiatów występuje szereg zaburzeń, m.in. brak jest płatków korony, zalążki rozwijają się na zewnątrz słupka, a w kątach liści wstępują pojedyncze owocolistki.

Mimo że miR172 wykazuje niemal całkowitą komplementarność do docelowych mRNA (sparowaniu ulega 19 z 21 zasad azotowych), w odróżnieniu od innych dotąd scharakteryzowanych roślinnych miRNA, reguluje ekspresję genów na poziomie

translacji. W wyniku nadekspresji *MIR172* dochodzi do znacznego (w porównaniu z rośliną dziką) obniżenia poziomu AP2, przy niezmienionym poziomie transkryptów, zarówno kodujących to właśnie białko, jak i inne białka należące do tej samej rodziny, m.in. TOE1 i TOE2. Możliwe, że o tym, iż miR172 nie bierze udziału w rozcinaniu mRNA, lecz wchodzi w skład kompleksu zaangażowanego w hamowanie syntezy białek, decyduje jego sekwencja lub nawet pojedynczy nukleotyd (szczególną uwagę zwraca to, że jest to jedyny znany w świecie roślin miRNA, który na 5' końcu posiada resztę A).

8.3. Udział miR-JAW w morfogenezie roślin

Właściwie wykształcone liście wyżlinu (*Antirrhinum*) są płaskie, jednakże zaburzenia regulacji ekspresji genu *CIN* (*CINCINNATA*) prowadzą do nieprawidłowości w kontroli podziałów komórkowych i deformacji liści (47,61). Białko CIN jest czynnikiem transkrypcyjnym i przeciwdziała zatrzymaniu cyklu komórkowego w stadium interfazy i kierowaniu komórek na drogę różnicowania. W komórkach prawidłowo ulegających różnicowaniu poziom mRNA *CIN* jest obniżony w stosunku do komórek zdolnych do podziałów. Natomiast w mutantach o podwyższonym poziomie ekspresji genu *CIN* zahamowanie podziałów mitotycznych (a w konsekwencji różnicowania) komórek jest opóźnione, co prowadzi do nadmiernego peryferycznego ich nagromadzenia i pofałdowania blaszki liściowej.

W genomie *Arabidopsis* występują geny *TCP*, będące homologami *CIN*. Wykazano, że w negatywnej kontroli poziomu akumulacji ich transkryptów bierze udział miRNA określanej jako miR-JAW. Te spośród białek TCP, dla których mRNA zawierają sekwencje komplementarne do miR-JAW, charakteryzują się obecnością konserwatywnego motywu długości 7 aminokwasów. Zróżnicowany poziom ich syntezy w poszczególnych tkankach podczas embriogenezy i morfogenezy liści warunkuje prawidłowy rozwój *Arabidopsis*.

Obecność prekursora miR-JAW, jak i specyficznego motywu w białkach TCP, kodowanych przez docelowe mRNA wykazano u szeregu roślin kwiatowych, różniących się morfologią liści i sposobem ich rozwoju.

8.4. Udział miR171 w rozcinaniu mRNA *SCL* (*SCARECROW-LIKE*)

Obecność miR171 (określanego także jako miRNA 39) wykazano w tkankach *A. thaliana*, *N. benthamiana* i *O. sativa* (62). Część ta ulega akumulacji przede wszystkim w kwiatostanach, natomiast w liściach i łodygach występuje w niewielkich ilościach, bądź jest syntetyzowana na niewykrywalnym poziomie.

U *Arabidopsis* miR171 charakteryzuje się całkowitą komplementarnością do sekwencji w wewnętrznym rejonie transkryptów: *SCL6-II*, *SCL6-III* i *SCL6-IV* i umożliwia

ich rozcinanie. W transkryptomie ryżu wyróżniono cztery mRNA wykazujące komplementarność do miR171 – wszystkie kodują białka SCL (11). Wiadomo, że białka z rodziny SCARECROW-LIKE (zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych) funkcjonują jako czynniki transkrypcyjne i są zaangażowane w kontrolę takich procesów, jak podział komórek merystemu korzeniowego czy przekazywanie sygnałów z udziałem hormonów roślinnych (62-65). Dotychczas jednak nie powiązano mutacji wpływających na funkcjonowanie miR171 z określonym fenotypem (62).

8.5. Udział miRNA *bantam* w kontroli apoptozy i proliferacji komórek u *Drosophila*

Bantam stymuluje proliferację komórek i poprzez to – wzrost tkanek, a jednocześnie bierze udział w hamowaniu apoptozy (efekt jego działania jest podobny do skutków ekspresji onkogenu) (50-53). Ekspresja *bantam* zachodzi we wszystkich stadiach rozwojowych muszki, ale na różnym poziomie – najwięcej miRNA wykrywa się w okresie późnego rozwoju embrionalnego (od 12 do 24 godzin po zapłodnieniu) oraz w czasie pierwszego stadium larwalnego.

Obecność *bantam* wykryto w dyskach (tarczach) imaginalnych, tj. zespoleniach komórek, tworzących się z ektodermy w toku rozwoju zarodkowego owadów ulegających przeobrażeniu zupełnemu. Podczas metamorfozy komórki te ulegają różnicowaniu i tworzą poszczególne struktury ciała dorosłego owada (53). W okresie embriogenezy dyski tworzone są przez 20-50 komórek, które następnie w ciągu trzech dni rozwoju larwalnego ulegają intensywnym podziałom tak, że ich liczba wzrasta około 1000-krotnie. U homozygotycznych mutantów *bantam* (z delecją rejonu zawierającego sekwencję kodującą 21-nt miRNA) stwierdzono brak niektórych (lub nawet wszystkich!) dysków imaginalnych oraz spowolniony wzrost tkanek larwy (52). Muszki takie zwykle przechodzą rozwój larwalny, jednak giną wkrótce po przeobrażeniu. Heterozygoty nie są letalne, ale jednoczesne występowanie niewielkich delecji lub insercji w jedynej kopii genu sprawia, że owady są mniejsze (53). Komórki ich ciała mają wprawdzie normalną wielkość, ale występują w znacznie mniejszej liczbie. Zależność pomiędzy aktywnością *bantam* a intensywnością podziałów komórkowych wykazano również w badaniach *in vitro*: klony komórek – mutantów *bantam* ulegają podziałom trzykrotnie wolniej niż klony komórek typu dzikiego. Co więcej, ekspresja *bantam* w komórkach nie ulegających podziałom mitotycznym umożliwia ich przejście z fazy G1 do fazy S oraz z fazy G2 do fazy M.

Przy 3' końcu w rejonie UTR transkryptu kodującego proapoptyczne białko Hid występuje 5 sekwencji niecałkowicie komplementarnych do miRNA *bantam*. Ponieważ w wyniku działania *bantam* następuje obniżenie poziomu syntezy białka Hid, mimo że transkrypcja kodującego go genu zachodzi z jednakową intensywnością, najprawdopodobniej kontrola z udziałem miRNA zachodzi na etapie translacji. *Bantam* po części niweluje również efekt aktywności innych białek proapoptycznych, np.

Reaper. Ich transkrypty nie zawierają sekwencji komplementarnych do tego miRNA, dlatego można przypuszczać, że bantam bierze udział w negatywnej kontroli ich ekspresji w sposób pośredni.

8.6. Udział miR-14 w supresji apoptozy i metabolizmie tłuszczów u *Drosophila*

mir-14 ulega ekspresji zarówno w czasie rozwoju *Drosophila*, jak i u form dorosłych (54). Niski poziom akumulacji miR-14 prowadzi do obniżenia żywotności i zwiększenia wrażliwości na czynniki stresowe. Wprawdzie przeżywalność homozygot *mir-14 Δ ¹* (z delecją rejonu zawierającego sekwencję kodującą miRNA) w okresie rozwoju larwalnego kształtuje się na takim samym poziomie, jak u muszek typu dzikiego, jednak w stadium poczwarki ginie większość mutantów. Osobniki, które osiągną postać dorosłą, żyją krócej niż owady nie posiadające mutacji, przy czym samice charakteryzują się mniejszą żywotnością niż samce.

W mutantach *mir-14* stwierdzono wysoki poziom ekspresji *drice*, co wskazuje na to, że badany miRNA bierze udział (bezpośrednio lub pośrednio) w negatywnej regulacji poziomu kodowanego przez ten gen białka. Drice jest efektorową kaspazą aktywowaną przez Dronc, która z kolei bierze udział w propagacji sygnału włączenia programu śmierci komórkowej, indukowanego przez Reaper, Hid i Grim. miR-14 funkcjonuje jako supresor apoptozy zachodzącej z udziałem tych białek.

Delecja *mir-14* prowadzi także do zwiększenia ilości diacylo- i triacylogliceroli w organizmie muszki (odpowiednio o około 50 i 100%). Ulegają one akumulacji w adipocytach, w postaci dużych kropli. Docelowe transkrypty dla miR-14, działającego jako regulatora metabolizmu lipidów oraz jako represora apoptozy, mogą być całkowicie odmienne. Jednakże znanych jest szereg zależności pomiędzy przemianą tłuszczów a uruchamianiem programu śmierci komórkowej, toteż nie można wykluczyć istnienia takich powiązań także w przypadku działania miR-14.

8.7. Udział miRNA w regulacji hemocytopoezy u ssaków

Na podstawie analizy rozmieszczenia poszczególnych miRNA w organizmie myszy wykazano, że spośród około 100 różnych miRNA zidentyfikowanych w narządach hemocytopoetycznych, trzy cząsteczki: miR-142s, miR-181 oraz miR-223 funkcjonują głównie w tych właśnie tkankach (55).

miR-142s wykryto w dużych ilościach w komórkach progenitorowych limfocytów B i granulocytów, co tłumaczy jego występowanie w szpiku kostnym, grasicy i śledzionie. Ekspresja *mir-181* zachodzi przede wszystkim w dojrzałych limfocytach B, natomiast w przypadku *mir-223* jest ograniczona do komórek progenitorowych granulocytów, stąd ich obecność w szpiku kostnym, a brak w śledzionie i grasicy.

Wykazano, że wprowadzenie do genomu dodatkowych kopii *mir-142s*, *mir-181* i *mir-223* znacząco wpływa na przebieg hemocytopoezy. W efekcie nasilenia ekspresji *mir-181* nastąpiło podwojenie liczby komórek różnicujących się w limfocyty B, natomiast liczba limfocytów T pozostała niezmieniona. W przypadku *mir-142s* i *mir-223* stwierdzono ~35% wzrost liczby komórek ulegających różnicowaniu w limfocyty T przy braku wpływu lub jedynie niewielkiej redukcji liczby komórek w stadium pośrednim różnicowania w limfocyty B. Częsteczki te działają zatem jedynie jako modulatory hematopoezy. Nie można także wykluczyć, że efekt ich funkcjonowania jest uzależniony od obecności innych miRNA.

8.8. Udział miRNA w hamowaniu translacji w mózgu ssaków

Neurony charakteryzują się subkomórkowym zróżnicowaniem rozmieszczenia transkryptów kodujących poszczególne białka. Przypuszcza się, że białka syntetyzowane w dendrytach i aksonach neuronów w mózgu mają duże znaczenie dla plastyczności połączeń synaptycznych, a poprzez to wpływają na procesy uczenia się i zapamiętywania (67-71). Wykazano, że aktywność połączeń nerwowych stymuluje syntezę białek kodowanych przez zakumulowane w wypustkach nerwowych transkrypty. W wyniku lokalnej regulacji translacji, spośród tysięcy połączeń synaptycznych tworzonych przez komórkę nerwową, modyfikowane są tylko te, które pozostają aktywne.

Mechanizm kontrolujący translację w neuronach, warunkujący specyfikę puli białek syntetyzowanych w dendrytach i aksonach, nie jest dobrze poznany, jednak na podstawie wyników przeprowadzonych badań *in vitro* wykazano, że w regulację tego procesu zaangażowane są cząsteczki miRNA (70). Dotychczas wykryto 86 różnych miRNA syntetyzowanych w ssących neuronach. Część z nich ulega akumulacji na określonym etapie różnicowania komórek nerwowych.

Spośród dwunastu miRNA występujących w neuronach mózgu szczura i przebadanych pod kątem specyficzności tkankowej, osiem (miR-103, miR-124a, miR-129-2*, miR-128, miR-323, miR-326, miR-329 oraz miR-344) ulega akumulacji przede wszystkim w korze mózgu i w mózgdzku, natomiast pozostałe cztery wykazują szerszy zakres występowania w organizmie (70). Po wirowaniu neuronów korowych w liniowym gradiencie sacharozy, charakterystyczne dla tkanki nerwowej miRNA wykryto we frakcji rybosomalnej, natomiast nie stwierdzono ich obecności we frakcji zawierającej makromolekularne struktury, biorące udział w transporcie mRNA do dendrytów. Z tego też powodu uważa się, że badane miRNA są zaangażowane w regulację ekspresji na poziomie translacji.

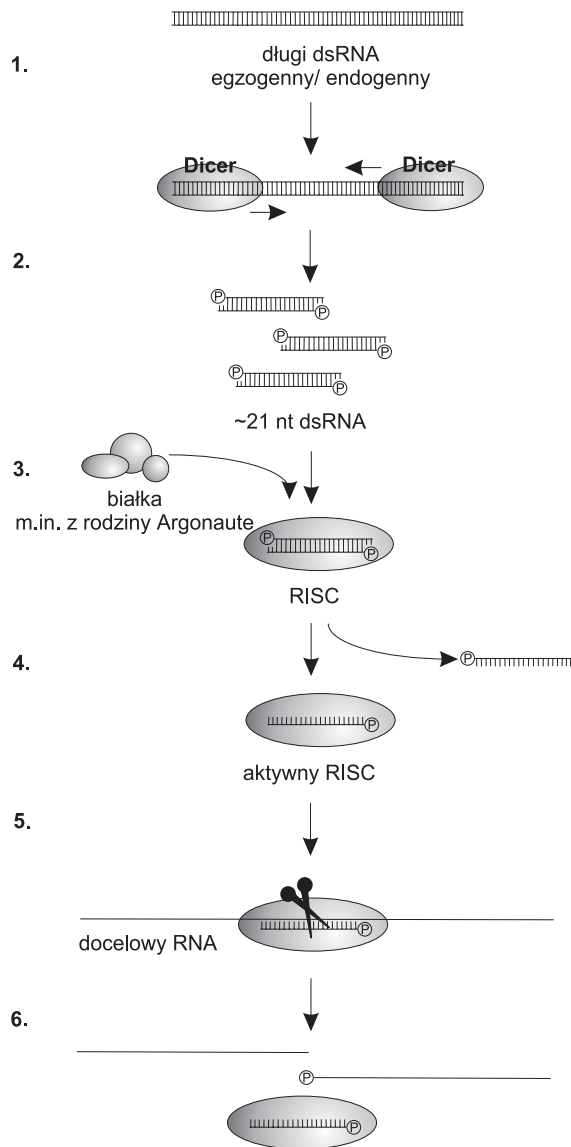
9. miRNA a siRNA

Zarówno miRNA, jak siRNA (*small interfering RNAs*) należą do grupy małych niekodujących cząsteczek RNA, biorących udział w regulacji ekspresji genów. Mimo że w biogenezie i mechanizmie działania miRNA i siRNA istnieje wiele podobieństw, cząsteczki te wykazują szereg różnic dotyczących m.in. ich pochodzenia i funkcji (9,43).

siRNA mogą powstawać zarówno z endo-, jak i egzogennych długich cząsteczek dsRNA i stanowią system ochrony genomu m.in. przed wirusami RNA – ich replikacją i ekspresją genów wirusowych oraz przed powielaniem transpozonów i sekwencji powtórzonych, mogących naruszać stabilność genomu komórki (rys. 5). Podobnie jak w przypadku miRNA, w proces ich powstawania zaangażowana jest rybonukleaza Dicer lub jej homologi (9,72). W genomie *A. thaliana* zlokalizowano cztery geny *DICER-LIKE* (*DCL-1* – *DCL-4*). Podczas analiz mutantów insercyjnych wykazano, że *DCL-2* i *DCL-3* nie mają wpływu na powstawanie miRNA, są natomiast zaangażowane w biogenezę odpowiednio: wirusowych i endogennych siRNA (73).

Dojrzałe cząsteczki siRNA tworzą kompleks rybonukleoproteinowy RISC (*RNA – Induced Silencing Complex*), w skład którego wchodzi m.in. białka z rodziny Argonaute. Wykazano, że kompleks RISC tworzony w komórkach człowieka zawiera białka: eIF2C1 i/lub eIF2C2 (homolog białka Argonaute), Gemin3 i Gemin4 – składniki miRNP (35,74,75). Z kolei w badaniach dotyczących biogenezy i funkcjonowania siRNA i miRNA u *Drosophila* wykazano, że tworzenie kompleksów rybonukleoproteinowych z udziałem tych dwóch klas małych regulatorowych RNA, wymaga obecności odmiennych białek Argonaute (76). AGO2 jest niezbędne w procesie RNA_i, gdyż bierze udział w inkorporacji siRNA do kompleksu RISC i jego aktywacji. Brak syntezy AGO2 w embrionach muszki nie wpływa negatywnie na degradację docelowych transkryptów z udziałem miRNA. Natomiast ważną rolę w powstawaniu dojrzałych cząsteczek miRNA i ich funkcjonowaniu odgrywa AGO1. Odmiennie funkcje pełnią także obecne w komórkach muszki owocowej rybonukleazy: Dicer-1 i Dicer-2 (77). Mutacje w genie *dicer-1* uniemożliwiają powstanie dojrzałych miRNA i ich udział w regulacji poziomu docelowych mRNA poprzez degradację tychże transkryptów. Z kolei mutanty *dicer-2* wykazują nieprawidłowości w powstawaniu siRNA. W degradacji RNA kierowanej przez dojrzałe cząsteczki siRNA bierze udział zarówno Dicer-1, jak i Dicer-2, ale tylko pierwsze z tych białek pełni funkcję rybonukleazy.

Funkcjonowanie siRNA umożliwia m.in. selekcję transkryptów i ukierunkowywanie działania rybonukleazy, dzięki której zachodzi degradacja docelowego mRNA. W odróżnieniu od miRNA, cząsteczka siRNA wchodzi w skład kompleksu RISC w postaci duplesu RNA-RNA. Następnie nici ulegają rozpleceniu i jedna z nich bierze udział w rozpoznaniu transkryptu. O tym, która z nici pozostaje w kompleksie rybonukleoproteinowym, decyduje nakład energetyczny konieczny do rozplecenia końców dwuniciowej cząsteczki przez helikazę (78). Niekiedy stabilność obu końców jest zbliżona – wówczas każda z nici bierze udział w regulacji ekspresji genów



Rys. 5. Powstawanie i funkcjonowanie siRNA. 1. Egzo- lub endogenny dwuniciowy RNA (sztucznie wprowadzony, powstały w wyniku transkrypcji odpowiednio zaprojektowanego wektora, nieprawidłowy, endogenny, transpozonowy, wirusowy) zostaje rozpoznany przez Dicer. 2. Począwszy od końców cząsteczki nukleaza odcina ~21 nt fragmenty (siRNA). Powstałe dwuniciowe cząsteczki mają wystające (2 nt) końce 3', a na 5' końcach posiadają grupę fosforanową. 3. SiRNA wraz z białkami z rodziny Argonaute tworzą kompleksy RISC. 4. Rozplcenie nici siRNA i usunięcie jednej z nich prowadzi do aktywacji kompleksu rybonukleoproteinowego. 5. Nić siRNA pozostająca w kompleksie RISC wiąże się do komplementarnego rejonu docelowego RNA i wyznacza miejsce jego rozcięcia. 6. Docelowy RNA ulega degradacji, a nić siRNA może wziąć udział w degradacji kolejnej cząsteczki docelowego RNA. (W schemacie nie uwzględniono działania RdRp).

z podobną częstością, jednak z danego dupleksu tylko jedna z nich jest składnikiem RISC. Mimo że siRNA ma początkowo postać dupleksu RNA, nici go tworzące nie są funkcjonalnie równoważne. Asymetria jest zatem cechą łączącą działanie siRNA i biogenezę miRNA.

siRNA hybrydują z docelowym mRNA na zasadzie całkowitej komplementarności. W przeprowadzonych *in vivo* eksperymentach wykazano jednak, że siRNA nie w pełni komplementarne do docelowego mRNA mogą brać udział w regulacji ekspresji poprzez hamowanie translacji (75). Wprowadzenie do komórek takich właśnie syntetycznych cząsteczek siRNA nie spowodowało obniżenia poziomu docelowych transkryptów ani pojawienia się produktów ich rozcięcia, stwierdzono natomiast obniżenie poziomu syntezy kodowanych przez nie białek.

Endogenne siRNA biorą udział w wyciszaniu tych samych (lub bardzo podobnych) genów, które kodują prekursorowe RNA, z których powstały, dlatego mutacje powodujące zmianę sekwencji siRNA są jednocześnie obecne w docelowym mRNA (9). Może to stanowić wytłumaczenie faktu, że siRNA organizmów ze sobą spokrewnionych nie wykazują konserwatywnego charakteru. Natomiast miRNA pochodzą z *loci* innych niż docelowe mRNA, toteż mutacje w obrębie ich sekwencji nie są kompensowane przez zmiany transkryptów.

Mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów z udziałem siRNA funkcjonuje zarówno w komórkach zwierząt (RNA_i), jak i roślin (PTGS) i grzybów (*quelling*). U *C. elegans*, *A. thaliana* i *N. crassa* wykryto ponadto obecność RNA-zależnej RNA polimerazy (RdRp), która umożliwia wydłużanie siRNA sparowanych z docelowym mRNA i tworzenie długiej dwuniciowej cząsteczki RNA, z której przy udziale Dicer powstają wtórne cząsteczki siRNA. SiRNA biorą udział w regulacji ekspresji genów nie tylko na poziomie potranskrypcyjnym, ale są również zaangażowane w metylację histonów i tworzenie heterochromatyny (blokowanie transkrypcji) (9,73).

10. Podsumowanie

Mimo że od odkrycia miRNA minęło już ponad 10 lat procesy związane z powstawaniem i funkcjonowaniem tych cząsteczek wciąż kryją przed nami wiele tajemnic. Dotychczasowe wyniki doświadczeń dowodzą, że ta niezwykle liczna klasa małych RNA jest zaangażowana w regulację ekspresji genów na etapie potranskrypcyjnym, a poprzez to wpływa na szereg procesów ważnych dla prawidłowego rozwoju organizmów, zarówno roślinnych jak i zwierzęcych. W ostatnich badaniach wskazuje się ponadto, że miRNA biorą udział w reakcjach komórek roślinnych na stres i mogą mieć znaczenie w regulacji innych szlaków metabolicznych, jednakże szczegółowe wyjaśnienie tych kwestii wymagać będzie dalszych eksperymentów (79).

Niezwykle ciekawe i ważne zarazem są wyniki najnowszych prac dotyczących medycznych aspektów nieprawidłowości związanych z funkcjonowaniem miRNA.

Stwierdzono m.in., że około 50% ludzkich genów *mir* jest zlokalizowanych w miejscach częstych pęknięć chromosomów (i utraty ich części lub rearanzacji) oraz w rejonach związanych z rozwojem nowotworów (56,57).

miRNA są elementem fascynującego mechanizmu, od milionów lat umożliwiającego harmonijny rozwój i prawidłowe funkcjonowanie roślin i zwierząt. Kontrola sprawowana przez te cząsteczki ze względu na ich wielkość ma charakter „mikro”. Niemniej jednak poważne następstwa zaburzeń w działaniu miRNA świadczą o tym, jak ważną rolę pełnią one w precyzyjnym „zarządzaniu” w organizmach żywych. Z tego względu poznanie procesów powstawania i działania miRNA stanowi wielkie wyzwanie dla naukowców i lekarzy. Zdobywana na ten temat wiedza będzie nas przybliżać nie tylko do rozwiązania niezwyklej zagadki natury, ale również – wyjaśnienia przyczyn groźnych chorób i opracowania skutecznych metod ich leczenia.

Praca powstała w ramach projektu finansowanego przez Komitet Badań Naukowych (PBZ- KBN-089/P06/2003).

Literatura

1. Szymański M., Barciszewski J., (2002), *Genome Biol.*, 3, 00051-00058.
2. <http://biobases.ibch.poznan.pl/ncRNA>
3. Gottesman S., (2002), *Genes Dev.*, 16, 2829-2842.
4. Baulcombe D., (2002), *Science*, 297, 2002-2003.
5. Lau N. C., Lim L. P., Wienstein E. G., Bartel D. P., (2001), *Science*, 294, 858-862.
6. Lee R. C., Ambros V., (2001), *Science*, 294, 862-864.
7. Grosshans H., Slack F. J., (2002), *J. Cell Biol.*, 156, 17-21.
8. Nelson P., Kiriakidou M., Sharma A., Maniatakis E., Mourelatos Z., (2003), *Trends Biochem. Sci.*, 28, 534-540.
9. Bartel B. P., (2004), *Cell*, 116, 281-297.
10. Lee Y., Jeon K., Lee J. T., Kim S., Kim V. N., (2002), *EMBO J.*, 21, 4663-4670.
11. Reinhart B. J., Weinstein E. G., Rhoades M. W., Bartel B., Bartel D. P., (2002), *Genes Dev.*, 16, 1616-1626.
12. Jones L., (2002), *Trends Plant Sci.*, 7, 473-475.
13. Kidner C. A., Martienssen R. A., (2003), *Trends Genet.*, 19, 13-16.
14. Bartel B., Bartel D. P., (2003), *Plant Physiol.*, 132, 709-717.
15. <http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna/index.shtml>, The miRNA Registry; Griffiths-Jones S., (2004), *Nucleic Acids Res.*, 32, D109-D111.
16. Pfeffer S., Zavolan M., Grasser F. A., Chien M., Russo J. J., In J., John B., Enright A. J., Marks D., Sander C., Tuschl T., (2004), *Science*, 304, 734-736.
17. Lim L. P., Glasner M. E., Yekta S., Burge C. B., Bartel D. P., (2003), *Science*, 299, 1540.
18. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J., Borkhardt A., Tuschl T., (2003), *RNA*, 9, 175-179.
19. Pasquinelli A. E., Reinhardt B. J., Slack F., Martindale M. Q., Kuroda M., Maller B., Hayward D., Ball E., Degan B., Müller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G., (2000), *Nature*, 408, 86-89.
20. Lim L. P., Lau N. C., Wienstein E. G., Abdelhakim A., Yekta S., Rhoades M. W., Burge C. B., Bartel D. P., (2003), *Genes Dev.*, 17, 991-1008.
21. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Science*, 294, 853-858.
22. Aravin A. A., Lagos-Quintana M., Yalcin A., Zavolan M., Marks D., Snyder B., Gaasterland T., Meyer J., Tuschl T., (2003), *Dev. Cell*, 5, 337-350.

23. Ambros V., (2001), *Cell*, 107, 823-826.
24. Bracht J., Hunter S., Eachus R., Weeks P., Pasquinelli A. E., (2004), *RNA*, 10, 1586-1594.
25. Lee Y., Ahn C., Han J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S, Kim V. N., (2003), *Nature*, 425, 415-419.
26. Gwizdek C., Ossareh-Nazari B., Brownawell A., Doglio A., Bertrannnd E., Macara I. G., Dargemont C., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 5505-5508.
27. Lund E., Güttinger S., Calado A., Dahlberg J. E., Kutay U., (2004), *Science*, 303, 95-98.
28. Carmell M. A., Xuan Z., Zhang M. Q., Hannon G. J., (2002), *Genes Dev.*, 16, 2733-2742.
29. Park W., Li J., Song R., Messing J., Chen X., (2002), *Curr Biol.*, 12, 1484-1495.
30. Finnegan E. J., Margis R., Waterhouse P. M., (2003), *Curr Biol.*, 13, 236-240.
31. Provost P., Dishart D., Doucet J., Fren Dewey D., Samuelsson B., Radmark O., (2002), *EMBO J.*, 21, 5864-5874.
32. Mourelatos Z., Dostie J., Paushkin S., Sharma A., Charroux B., Abel L., Rappsilber J., Mann M., Dreyfuss G., (2002), *Genes Dev.*, 16, 720-728.
33. Lee P., Lim L. P., Nelson C., Lau N. C., Earl G., Weinstein E. G., Abdelhakim A., Yekta S., Rhoades M. W., Burge Ch. B., Bartel D. P., (2003), *Genes Dev.*, 17, 991-1008.
34. Luciano D. J., Mirsky H., Vendetti J. N., Maas S., (2004), *RNA*, 10, 1174-1177.
35. Hutvágner G., Zamore P. D., (2002), *Science*, 297, 2056-2060.
36. Yekta S., Shih I-h., Bartel D. P., (2004), *Science*, 304, 594-596.
37. Grishok A., Pasquinelli A. E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Mello C. C., (2001), *Cell*, 106, 23-34.
38. Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V., (1993), *Cell*, 75, 843-854.
39. Olsen P. H., Ambros V., (1999), *Dev. Biol.*, 216, 671-680.
40. Reinhart B. J., Slack. F. J., Basson M., Bettinger J. C., Pasquinelli A. E., Rougrie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G., (2000), *Nature*, 403, 901-906.
41. Rhoades M. W., Reinhart B J., Lim L. P., Burge C. B., Bartel B., Bartel D. P., (2002), *Cell*, 110, 513-520.
42. Hake S., (2003), *Curr Biol.*, 13, 851-852.
43. Xie Z., Kasschau K. D., Carrington J. C., (2003), *Curr Biol.*, 13, 784-789.
44. Lai E. C., Tomancak P., Wiliams R. W., Rubin G. M., (2003), *Genome Biol.*, 4, R42.
45. Lewis B. P., Shih I., Jones- Rhoades M. W., Bartel D. P., Burge C. B., (2003), *Cell*, 115, 787-798.
46. Kidner C. A., Martienssen R. A., (2004), *Nature*, 428, 81-84.
47. Palatnik J. F., Allen E., Wu X., Schommer C., Schwab R., Carrington J. C., Weigel D., (2003), *Nature*, 425, 257-263.
48. Aukerman M. J., Sakai H., (2003), *Plant Cell*, 15, 2730-2741.
49. Emery J. F., Floyd S. K, Alvarez J., Eshed Y., Hawker N. P., Izhaki A., Baum S. F., Bowman J. L., (2003), *Curr Biol.*, 13, 1768-1774.
50. Bergmann A., Lane E., (2003), *Trends Biochem. Sci.*, 28, 461-463.
51. Ambros V., (2003), *Cell*, 113, 673-676.
52. Brennecke J., Hipfner D. R., Stark A., Russel R. B., Cohen S. M., (2003), *Cell*, 113, 25-36.
53. Hipfner D. R., Weigmann K., Cohen S. M., (2002), *Genetics*, 161, 1527-1537.
54. Xu P., Vernooy S. Y., Guo M., Hay B. A., (2003), *Curr Biol.*, 13, 790-795.
55. Chang Ch-Z., Li L., Lodish H. F., Bartel D. P., (2004), *Science*, 303, 83-86.
56. Sempere L. F., Freemantle S., Pitha- Rowe I., Moss E., Dmitrovsky E., Ambros V., (2004), *Genome Biol.*, 5, R13.
57. Calin G. A., Dumitru C. D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., Rassenti L., Kipps T., Negrini M., Bullrich F., Croce C. M., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 15524-15529.
58. McConnell J. R., Emery J., Eshed Y., Bao N., Bowman J., Barton M. K., (2001), *Nature*, 411, 709-713.
59. Bohmert K., Camus I., Bellini C., Bouchez D., Caboche M., Benning C., (1998), *EMBO J.*, 14, 170-180.
60. Simpson G. G., Dean C., (2002), *Science*, 296, 285-289.
61. Nath U., Crawford B. C., Carpenter R., Coen E., (2003), *Science*, 299, 1404-1407.
62. Llave C., Xie Z., Kasschau K. D., Carrington J. C., (2002), *Science*, 297, 2053-2056.

63. Lim J., Helariuta Y., Specht Ch. D., Jung J., Sims L., Bruce W. B., Diehn S., Benfey P. N., (2000), *Plant Cell*, 12, 1307-1318.
64. Kamiya N., Itoh J., Morikami A., Nagato Y., Matsuoka M., (2003), *Plant J.*, 36, 45-54.
65. Morohashi K., Minami M., Takase H., Hotta Y., Hiratsuka K., (2003), *J. Biol. Chem.*, 278, 20865-20873.
66. Silverstone A. L., Ciampaglio Ch. N., Sun T., (1998), *Plant Cell*, 10, 155-169.
67. Jiang C., Schuman E. M., (2002), *Trends Biochem. Sci.*, 27, 506-513.
68. Brittis P. A., Lu Q., Flanagan J. G., (2002), *Cell*, 110, 223-235.
69. Steward O., (2002), *Cell*, 110, 537-540.
70. Kim J., Krichewsky A. M., Grad Y., Hayes G. D., Kosik K. S., Church G. M., Ruvkun G., (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 360-365.
71. Krichevsky A. M., Kosik K. S., (2001), *Cell*, 32, 683-696.
72. Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. E., Balint É., Tuschl T., Zamore P. D., (2001), *Science*, 293, 834-838.
73. Xie Z., Johansen L. K., Gustafson A. M., Kasschau K. D., Lellis A. D., Zilberman D., Jacobsen S. E., Carrington J. C., (2004), *PloS Biol.*, 2, 0642-0652.
74. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
75. Zeng Y., Yi R., Cullen B. R., (2003), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 9779-9784.
76. Okamura K., Ishizuka A., Siomi H., Siomi M. C., (2004), *Genes Dev.*, 18, 1655-1666.
77. Lee Y. S., Nakahara K., Pham J. W., Kim K., He Z., Sonthaimer E. J., Carthew R. W., (2004), *Cell*, 117, 69-81.
78. Schwarz D. S., Hutvagner G., Du T., Xu Z., Aronin N., Zamore P. D., (2003), *Cell*, 115, 199-208.
79. Jones- Rhoades M. W., Bartel D. P., (2004), *Mol. Cell*, 14, 787-799.