



RNA w biotechnologii

Marek Figlerowicz

Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

RNA in biotechnology

Summary

The studies conducted during the last decade revealed that RNA molecules play much more different roles in the living world than it had been expected earlier. They can function in biological systems as: carriers of genetic information, enzymes, cofactors inducing or mediating biochemical reactions, inhibitors which deactivate enzymes or agents that regulate cellular processes. Consequently, several new RNA-based methods and techniques have been elaborated. They permit to identify RNA molecules that display many different activities. Generally, it is becoming increasingly apparent that RNA-based technologies should be considered one of the major factors influencing further development of modern biotechnology.

Key words:

RNAzymes, *in vitro* RNA selection, RNAi phenomenon, noncoding RNA.

1. Wprowadzenie

Jeszcze do niedawna wszelkie rozważania na temat roli, jaką w nowoczesnej biotechnologii odegrać może RNA uznano by za pozbawione praktycznego znaczenia, czysto akademickie dyskusje. Dokonane w drugiej połowie ubiegłego wieku odkrycia stworzyły bowiem i utrwaliły dość jednoznaczny, i jak sądziliśmy, całościowy obraz procesów zachodzących w organizmach żywych. Zaproponowany schemat akcentował szczególną rolę DNA jako nośnika informacji genetycznej oraz białek – produktów końcowych procesu ekspresji genów. Często, gdzieś w tle, pojawiał się RNA jako cząsteczka wspomagająca zajście niektórych procesów, jednak nigdy jako ich główny element. Jeszcze w la-

Adres do korespondencji

Marek Figlerowicz,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań.

tach osiemdziesiątych XX w. obecnemu w komórkach RNA przypisywano tylko trzy podstawowe funkcje:

1) struktury szkieletowej ułatwiającej formowanie rybosomów (rybosomalne RNA, rRNA) czy spliceosomów (małe jądrowe RNA, snRNA),

2) przekaźnika informacji genetycznej z jądra komórkowego do cytoplazmy (informacyjny RNA, mRNA),

3) adaptera umożliwiającego przepisanie zawartej w mRNA informacji na sekwencję aminokwasową (transferowy RNA, tRNA).

Na podstawie ówczesnego stanu wiedzy nie można było sądzić, by którakolwiek z właściwości RNA mogła szybko znaleźć zastosowanie praktyczne. Dodatkowo, brak efektywnych metod syntezy (chemicznej czy enzymatycznej) oraz niestabilność RNA sprawiała, że cząsteczka ta nie wzbudzała większego entuzjazmu wśród biotechnologów. Nie może zatem dziwić fakt, że przez długie lata głównymi obiektami ich zainteresowań były kodujące informację genetyczną cząsteczki DNA, katalityczne czy strukturalne białka oraz różnego typu produkty i półprodukty powstające w wyniku przemian metabolicznych.

Sytuacji tej nie zmieniło dokonane na początku lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku odkrycie autokatalitycznych właściwości RNA (1,2). W zapoczątkowanych przez Cecha i Altmana badaniach wykazano, że występujące w naturze cząsteczki RNA (nazwane rybozymami) mogą katalizować reakcję hydrolizy oraz syntezy wiązania fosfodiesterowego. Właściwość ta objawiała się wobec pojedynczych, specyficznie usytuowanych wiązań internukleotydowych. Substratami w takich reakcjach mogły zatem być tylko nieliczne cząsteczki RNA posiadające odpowiednią strukturę pierwszo-, drugo- i trzeciorzędową. Wyniki prac Cecha i Altmana nie znajdowały bezpośredniego zastosowania praktycznego, ukazując jednak całkowicie nowe oblicze RNA, stały się bodźcem do dalszych intensywnych badań. W krótkim czasie zaowocowały one prawdziwym przełomem w naszym dotychczasowym myśleniu o roli, jaką w nowoczesnej biotechnologii może odegrać RNA. Patrząc z perspektywy kilku ostatnich lat wyróżnić można trzy szczególnie istotne powody panującego obecnie niezwykłego zainteresowania cząsteczkami RNA: 1) opracowanie metody selekcji RNA *in vitro*, 2) odkrycie zjawiska interferencji RNA oraz 3) identyfikacji licznych tzw. niekodujących cząsteczek RNA, pełniących w komórkach funkcje regulatorowe.

2. Selekcja RNA

Odkrycia Cecha i Altmana dowiodły, że cząsteczki RNA mogą, podobnie jak białka, pełnić rolę biokatalizatorów (1,2). Fakt ten zrodził szereg istotnych pytań dotyczących zakresu katalitycznej aktywności RNA oraz sposobu identyfikacji aktywnych cząsteczek. Pierwsze z pytań nie doczekało się jeszcze jednoznacznej odpowiedzi. W reakcji na drugie opracowana została metoda selekcji cząsteczek RNA wykazujących pożądaną właściwość zwana SELEX-em (*Systematic Evolution of Ligands*

by *Exponential Enrichment*) (3). Odbywający się *in vitro* proces selekcji podzielić można na trzy etapy:

1. Syntezy odpowiednio dużej puli cząsteczek RNA o określonej długości i całkowicie przypadkowej sekwencji nukleotydowej. Otrzymany zbiór cząsteczek zwany jest biblioteką kombinatoryczną. Ponieważ RNA składa się tylko z czterech różnych nukleotydów, stąd dla określonej długości oligorybonukleotydu liczba wszystkich możliwych wariantów wynosi 4^n , gdzie n określa liczbę nukleotydów tworzących oligomer.

2. Wielokrotnej selekcji zawężającej badaną pulę cząsteczek do tych wykazujących poszukiwaną właściwość fizyczną lub chemiczną.

3. Identyfikacji najaktywniejszych cząsteczek RNA.

Stosując metodę selekcji zidentyfikowano w ostatnich latach szereg nowych rybozymów, czyli cząsteczek RNA wykazujących właściwości katalityczne. Tą drogą otrzymano niebiałkowe enzymy (tzw. RNAzymy), których substratami są: **kwasy nukleinowe lub ich komponenty** (ligaza DNA (4) i RNA (5), nukleaza DNA (4), polimeraza RNA (6), kinaza polinukleotydowa (7), fosforybozylotransferaza uracylowa (8), syntetaza aminoacylo tRNA (9), **białka** (proteaza (10), transferaza peptydylowa (11) oraz **inne biomolekuły** (izomeraza bifenylowa (12), diels-alderaza (13), ferrocchelataza (14)).

Dodatkowo powstał pomysł, by metodę SELEX wykorzystać do poszukiwania cząsteczek RNA specyficznie wiążących wybrane molekuly, np. białka, kofaktory enzymów, różnego typu produkty i półprodukty metabolizmu komórkowego, czy mniej lub bardziej skomplikowane związki chemiczne. Pokazano, że wyselekcjonowane cząsteczki zwane aptamerami mogą znaleźć wiele interesujących zastosowań na przykład jako inhibitory enzymów komórkowych czy wirusowych (15,16).

3. Zjawisko interferencji RNA

Zjawisko interferencji RNA (RNAi – RNA *interference*) zdefiniować można jako proces polegający na wyciszeniu ekspresji genu pod wpływem dwuniciowego RNA (dsRNA) homologicznego do DNA, w obrębie którego wyłączany gen jest zakodowany (17-20). Odkrycie RNAi, jak się wydaje, jest jednym z najbardziej spektakularnych, a zarazem obiecujących osiągnięć biologii molekularnej końca XX w. U jego podstaw legły prowadzone od wielu już lat badania zjawiska kosupresji genów oraz antysensowych RNA (21-25). W pierwszym przypadku zaobserwowano, że wprowadzenie do genomu roślinnego dodatkowej kopii genu nie prowadzi do podwyższenia, lecz wręcz przeciwnie, do zahamowania jego ekspresji (21-23). Równie zagadkowe rezultaty przyniosły badania antysensowych RNA (24,25). Obserwowano bowiem, że ekspresja genu może zostać całkowicie zahamowana przez wprowadzenie do komórki oligorybonukleotydu komplementarnego do fragmentu mRNA. Przyjęto, że oligorybonukleotyd łączy się z mRNA lub bezpośrednio z genem i w ten spo-

sób uniemożliwia proces translacji lub transkrypcji. Okazało się jednak, że ten sam efekt wywołuje obecność RNA o sekwencji identycznej jak fragment mRNA. Co więcej, zjawisko wyciszania genu wzmagало się, gdy zastosowano równocześnie obie cząsteczki, tj. komplementarną i identyczną z sekwencją mRNA, a zatem dsRNA (25).

Pierwsze próby wyjaśnienia opisanych zjawisk pojawiły się pod koniec lat dziewięćdziesiątych. Badania kosupresji genów roślinnych i antysensowych RNA wykazały, że w obu przypadkach mamy do czynienia z tym samym zjawiskiem nazwanym RNAi (17-20,26,27). Stwierdzono, że transkrypcja wyciszanych genów zachodzi bez przeszkód, jednak powstała mRNA jest w jakiś sposób identyfikowana i wybiórczo degradowana na 20-23-nukleotydowe odcinki (26). Wynik ten świadczył, że obserwowane zjawisko jest procesem potranskrypcyjnym. Rezultaty najnowszych prac pozwoliły zaproponować następujący mechanizm RNAi (17-20). Pojawienie się w komórce dsRNA indukuje specyficzną nukleazę, która wycina z niego 20-23-nukleotydowe fragmenty. W rezultacie powstaje kompleks dsRNA-rybonukleaza. W kolejnym etapie zasocjowana z kompleksem helikaza usuwa jedną z nici RNA, podczas gdy druga nić pozostaje związana w kompleksie i może selektywnie hybrydyzować z mRNA. Kiedy odpowiednia cząsteczka mRNA zostanie odnaleziona, nukleaza z kompleksu rozcina ją na krótkie 20-23-nukleotydowe fragmenty, uniemożliwiając zajście procesu translacji. Dowiedziono, że indukcja RNAi w jednej komórce powoduje jego rozprzestrzenienie w całym organizmie.

Podsumowując, stwierdzić można, że zjawisko RNAi charakteryzują następujące cztery cechy: 1) jest indukowane przez dsRNA, 2) jest wysoce specyficzne, 3) jest niezwykle efektywne (tylko kilka cząsteczek dsRNA wymaganych jest do indukowania RNAi), 4) rozprzestrzenia się w całym organizmie niezależnie od miejsca, w którym było indukowane.

Odkrycie zjawiska RNAi ma, jak się wydaje, podstawowe znaczenie dla dalszego dynamicznego rozwoju genomiki funkcjonalnej. Poznanie sekwencji nukleotydowej całych genomów dostarczyło bowiem olbrzymią ilość informacji jednak niezwykle trudnych do zinterpretowania bez wykonania odpowiednich testów funkcjonalnych. Prowadzenie skutecznych badań w zakresie genomiki funkcjonalnej wymaga zatem zastosowania efektywnych metod selektywnego włączania i wyłączania ekspresji genów. Wykorzystywane dotąd metody pozwalały uzyskiwać tego rodzaju efekty jedynie poprzez ingerencję genetyczną na poziomie DNA. Techniki te nie stwarzały możliwości otrzymania mutantów, w których uszkodzeniu ulegałyby geny istotne dla przeżycia badanego organizmu. Odkrycie zjawiska RNAi otwiera całkowicie nowe możliwości badań nad funkcjonowaniem poszczególnych genów, bez konieczności ingerencji w strukturę genomu. Ingerencja ta odbywa się na poziomie transkryptu. Można zatem w dowolnym momencie zahamować ekspresję konkretnego genu (lub kilku genów), nawet o podstawowym znaczeniu dla życia badanego organizmu.

4. Niekodujące, regulatorowe RNA

Kolejną klasą cząsteczek, które w najbliższym czasie mogą wzbudzić duże zainteresowanie biotechnologów są niekodujące RNA uczestniczące w licznych procesach komórkowych. Przez wiele lat wyraźnie bagatelizowano fakt, że jedynie niewielki procent syntetyzowanego podczas transkrypcji RNA wykorzystywany jest jako matryca do produkcji białek. Do dzisiaj nie potrafimy także powiedzieć jaką informację niosą lub jaką rolę pełnią tzw. niekodujące sekwencje DNA, tj. sekwencje, w obrębie których nie występują otwarte ramki odczytu (w przypadku człowieka niekodujące białek sekwencje stanowią prawie 95% genomu). Jest mało prawdopodobne, jak się wydaje, by były one jedynie „śmieciem” genetycznym (*junk DNA*).

Poważne nadzieje na rozwikłanie przedstawionych problemów pokładane są w nowo wyodrębnionych dziedzinach biologii molekularnej – genomice funkcjonalnej i proteomice. Obiektem ich zainteresowań jest odpowiednio genom i proteom jako całość, ich organizacja i funkcjonowanie. Obie dziedziny wykorzystują najnowocześniejsze metody biologiczne, fizykochemiczne czy bioinformatyczne, by stworzyć bardziej precyzyjny obraz procesów zachodzących w komórkach żywych.

Jednym z ważnych osiągnięć genomiki i proteomiki jest odkrycie licznych cząsteczek RNA pełniących funkcje regulatorów procesów komórkowych zachodzących zarówno w jądrze jak i cytoplazmie. Szczególnie interesującymi przykładami takich cząsteczek są: 1) występujące w bakteriach transferowo-informacyjne RNA (tmRNA), które łączą się z nieprawidłowo zsintetyzowanymi białkami i kierują ich degradacją (28), 2) RNA Xist oraz roX zaangażowane w proces regulacji ekspresji genów sprzężonych z płcią (*chromosome dosage compensation*) odpowiednio u ssaków i muszki owocówki (29), 3) mini-RNA uczestniczące w regulacji procesu rozwojowego nicieni poprzez hybrydyzację z niekodującym końcem 3' odpowiednich cząsteczek mRNA (30), 4) małe jąderkowe RNA (snoRNA) kierujące metylacją i pseudouracylowaniem rRNA (31,32), 5) zidentyfikowane w komórkach mózgowych, tkankowospecyficzne snoRNA (33) (niezwykle interesujący, jak się wydaje, jest fakt, że geny kodujące mózgowospecyficzne snoRNA, ulokowane są w rejonie odpowiedzialnym za występowanie wieloukładowej choroby zwanej zespołem Pradera-Williego).

5. Podsumowanie

Prowadzone w latach dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku, badania podstawowe wykazały niezwykłą uniwersalność RNA. Wynika z nich, że jest on nie tylko nośnikiem informacji genetycznej, lecz i enzymem zaangażowanym m.in. w biosyntezę białka, kofaktorem umożliwiającym zajście wielu przemian biochemicznych, dezaktywującym enzymy inhibitorem czy regulatorem procesów komórkowych. Obserwując wysiłki, jakie obecnie podejmują naukowcy w najlepszych laboratoriach amerykańskich i europejskich łatwo można dostrzec, że ich głównym celem jest jak najszyb-

sze i jak najpełniejsze wykorzystanie praktyczne przedstawionych właściwości RNA.

Już w najbliższych latach nastąpić powinien dynamiczny rozwój technologii opartych na RNA. Szczególnie nadzieje badaczy wzbudza rychła perspektywa praktycznego zastosowania zjawiska RNAi. Obecnie zarówno w USA jak i Europie powoływane są specjalne konsorcja, których głównym celem jest opracowanie odpowiednich metod umożliwiających regulację ekspresji genów za pomocą dsRNA. Dzięki takim metodom będziemy mogli w bardzo krótkim czasie dowiedzieć się jak funkcjonują pojedyncze geny, czy całe grupy sprzężonych ze sobą genów. Będziemy także w stanie identyfikować geny warunkujące korzystne lub niekorzystne cechy organizmów o istotnym znaczeniu biotechnologicznym, rolniczym czy przemysłowym. Równocześnie istnieje szansa, że interferencyjne RNA staną się kluczem do rozwiązania najistotniejszych problemów medycznych. Umożliwią identyfikację genów odpowiedzialnych za rozwój wielu chorób czy też spowodują, że prowadzona na masową skalę terapia genowa okaże się realnym faktem.

Równoległe w licznych laboratoriach prowadzone są poszukiwania nowych RNAzymów mogących znaleźć zastosowanie nie tylko w przemyśle biotechnologicznym czy chemicznym, lecz i farmaceutycznym. Pokazano m.in., że oligorybonukleotydy (otrzymane na drodze selekcji *in vitro*) mogą być wykorzystane jako efektywne niebiałkowe katalizatory lub skuteczne leki przeciwwirusowe (inhibitory enzymów wirusowych czy rybozomy selektywnie degradujące genom wirusa). Coraz powszechniej akceptowany staje się pogląd, że jednym z głównych czynników kształtujących rozwój nauk biologicznych w tym i biotechnologii będą w obecnej dekadzie badania RNA, zarówno te o charakterze podstawowym jak i aplikacyjnym.

Opracowanie powstało w ramach realizacji projektów badawczych finansowanych przez KBN (projekt nr 6 P04A 3819 i PBZ-KBN-040/P04/2001 – PBZ/KBN/040/P04/24).

Literatura

1. Kruger K., Grabowski P. J., Zaug A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., (1982), *Cell*, 31, 147-157.
2. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S., (1983), *Cell*, 35, 849-857.
3. Ellington S., Szostak J. W., (1990), *Nature*, 346, 818-820.
4. Robertson D. L., Joyce G. F., (1990), *Nature*, 344, 467-468.
5. Ekland E. H., Szostak J. W., Bartel D. P., (1995), *Science*, 269, 364-370.
6. Ekland E. H., Bartel D. P., (1996), *Nature*, 382, 373-376.
7. Lorsch J. R., Szostak J. W., (1994), *Nature*, 371, 31-36.
8. Unrau P. J., Bartel D. P., (1998), *Nature*, 395, 260-263.
9. Illangasekare M., Sanchez G., Nickles T., Yarus M., (1995), *Science*, 267, 643-647.
10. Dai X. D., Mesmaeker A. D., Joyce G. F., (1995), *Science*, 267, 237-239.
11. Lohse P. A., Szostak J. W., (1996), *Nature*, 381, 442-444.
12. Prudent J. R., Uno T., Schultz P. G., (1994), *Science*, 264, 1924-1927.
13. Tarasow T. M., Tarasow S. L., Eaton B. E., (1997), *Nature*, 389, 54-57.
14. Conn M. M., Prudent J. R., Schultz P. G., (1996), *J. Am. Chem. Soc.*, 118, 7012-7013.

15. Krakowiak A., Koziolkiewicz M., (1998), *Postępy Biochem.*, 44, 306-317.
16. Chen H., Brown D., Gold L., (1996), *Methods in Enzymol.*, 275, 503-522.
17. Marx J., (2000), *Science*, 288, 1370-1372.
18. Bass B. L., (2000), *Cell*, 101, 235-238.
19. Sharp P. A., (2001), *Genes and Development*, 15, 485-490.
20. Tuschl T., Zamore P. D., Lehmann R., Bartel D. P., Sharp P. A., (1999), *Genes and Development*, 13, 3191-3197.
21. Bahramian M. B., Zarbl H., (1999), *Mol. Cell. Biol.*, 19, 274-283.
22. Waterhouse P. M., Graham M. W., Wang M. B., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 13959-13964.
23. Vaucheret H., Beclin C., Elmayan T., Feuerbach F., Godon C., Morel J.B., Mourrain P., Palauqui J.C., Vernhettes S., (1998), *Plant J.*, 16, 651-659.
24. Montgomery M. K., Fire A., (1998), *Trends in Genet.*, 14, 255-258.
25. Tabara H., Grishok A., Mello C. C., (1998), *Science*, 282, 430-431.
26. Zamore P. D., Tuschl T., Sharp P. A., Bartel D. P., (2000), *Cell*, 101, 25-33.
27. Cagioni C., Macino G., (1999), *Nature*, 399, 166-169.
28. Karzai A. W., Roche E. D., Sauer R. T., (2000), *Nat. Struct. Biol.*, 7, 449-455.
29. Kelley R. L., Kuroda M. I., (2000), *Cell*, 103, 9-12.
30. Moss E. G., (2000), *Curr. Biol.*, 10, 436-439.
31. Filipowicz W., Pelczar P., Pogacic V., Dragon F., (1999), *Acta Biochem. Pol.*, 46, 377-389.
32. Weinstein L., Steitz J. A., (1999), *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11, 378-384.
33. Cavaille J., Buiting K., Kiefmann M., Lalande M., Brannan C. I., Horsthemke B., Bachellerie J. P., Brosius J., Huttenhofer A., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 14311-14316.