



## RNAi, PTGS i *quelling* – trzy wariacje na jeden temat?

Zofia Szweykowska-Kulińska<sup>1</sup>, Artur Jarmołowski<sup>1</sup>,  
Marek Figlerowicz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,  
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

<sup>2</sup>Instytut Chemii Bioorganicznej, Polska Akademia Nauk, Poznań

### RNAi, PTGS and *quelling* – three variations on one subject?

#### Summary

In 1990, it was already discovered that plant transformation with a transgene containing its homologue in the plant nuclear genome is able to promote silencing of both the transgene and the homologous, endogenous gene. The phenomenon was named posttranscriptional gene silencing (PTGS) or co-suppression. The same results were obtained when a transgene was introduced into the nuclear genome of fungus *Neurospora crassa*. This process was termed *quelling*. In 1998, RNAi (RNA interference) was discovered in the *Caenorhabditis elegans* worm. Specific gene silencing occurred after the introduction into the worm cells of double stranded RNA with sequence complementarity to the endogenous gene. It was shown that RNAi operates at the stage of the mature mRNA in the cytoplasm. dsRNAs are converted into siRNAs (small interfering RNAs) due to the Dicer enzyme activity. siRNAs are incorporated into the RISC (RNA – induced silencing complex). Active RISC promotes specific mRNA degradation. RNAi/PTGS/*quelling* processes show many mechanistic similarities, but they also differ in some details. All of them represent an ancient mechanism that probably evolved to protect eukaryotic cells against invasive forms of nucleic acids like viruses, transposons, and others.

#### Key words:

RNAi, PTGS, *quelling*, siRNA, RISC, metabolic interconnections.

#### Adres do korespondencji

Zofia  
Szweykowska-Kulińska,  
Instytut Biologii  
Molekularnej  
i Biotechnologii,  
Uniwersytet  
im. Adama Mickiewicza,  
ul. Międzychodzka 5,  
60-371 Poznań.

### 1. Wprowadzenie

Proces potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów kojarzył się do niedawna jedynie z dojrzewaniem RNA: np. formowaniem dojrziałych końców 5' i 3', splicingiem (również alternatywnym),

czy wydajnością translacji. W 1998 r. Fire i in. (1) wykazali obecność dodatkowego, potranskrypcyjnego mechanizmu regulującego poziom RNA w komórkach *Caenorhabditis elegans*. Nowo odkryte zjawisko nazwano interferencją RNA (*RNA interference*). Wkrótce stało się jasne, że wcześniej obserwowane zjawiska kosupresji lub potranskrypcyjnego wyciszania genów (PTGS – *posttranscriptional gene silencing*) u roślin, czy tłumienia genów u grzybów (*gene quelling*), są wariantami RNAi. Już w 1990 r. Napoli i in. (2) odkryli, że wprowadzenie do rośliny transgeny ulegającego transkrypcji może wyciszyć ekspresję zarówno transgeny jak i homologicznego, endogennego genu. W przypadku obserwowanego u *C. elegans* zjawiska RNAi do wyciszenia genu dochodziło pod wpływem dwuniciowego RNA. Jedną z jego nici była komplementarna do fragmentu mRNA wyciszanego genu. Okazało się jednak, że zarówno RNAi, PTGS i *quelling*, prowadzi do wyciszenia ekspresji specyficznego genu poprzez degradację dojrzałego mRNA.

W dalszych badaniach wykazano, że jest to zjawisko powszechne u Eukaryota (z wyjątkiem drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (3)). Jego obecność stwierdzono u wszystkich dotąd przebadanych organizmów, tj. u świdrowców (pierwotniaki) (4), stulbii (jamochłony) (5), muszki owocowej (owady) (6), danio pręgowanego (ryby) (7), żaby (płazy) (8) *Neurospora crassa* (grzyby) (9), myszy, człowieka (ssaki) (10) i u różnych gatunków roślin niższych i wyższych (11).

W pracy przybliżono zjawiska opisywane jako PTGS, *quelling* i RNAi, wskazano na ich podobieństwa i różnice oraz opisano biologiczne znaczenie tych procesów. Ponieważ w tym numerze „Biotechnologii” znajduje się obszerny artykuł poświęcony PTGS i jego związkom z TGS (*transcriptional gene silencing* – transkrypcyjnym wyciszaniem genów) u roślin, proces ten zostanie omówiony skrótowo.

## 2. PTGS – potranskrypcyjne wyciszanie genów

PTGS zwany jest również kosupresją. To drugie określenie wynika z następujących obserwacji: wprowadzenie do *Petunia hybrida* dodatkowego genu syntazy chalkonowej, w celu wzmożenia syntezy antocyjanów i zintensyfikowania barwy kwiatów, wywołało całkowicie odwrotny efekt. Kwiaty, zamiast intensywnie fioletowe, były u większości roślin transgenicznych białe. Interpretacja tego zjawiska, choć nie wyjaśniająca mechanizmów molekularnych, prowadzących do utraty barwy, była następująca: wprowadzenie dodatkowej kopii genu hamuje zarówno ekspresję transgeny jak i genu endogennego – stąd zjawisko nazwano kosupresją (2). Dalsze badania nad PTGS, wyjaśniające co naprawdę dzieje się w komórkach roślinnych, rozpoczęły się w zasadzie dopiero po odkryciu RNAi u *C. elegans*, gdy okazało się, że mechanizmy obu zjawisk są bardzo podobne. PTGS można zainicjować w roślinie poprzez wprowadzenie transgeny mającego swój endogenny homolog lub za pomocą wektorów (mogą to być wektory integrujące się z genomem gospodarza, oparte na wirusach RNA lub do przejściowej ekspresji) zawierających, ulegające

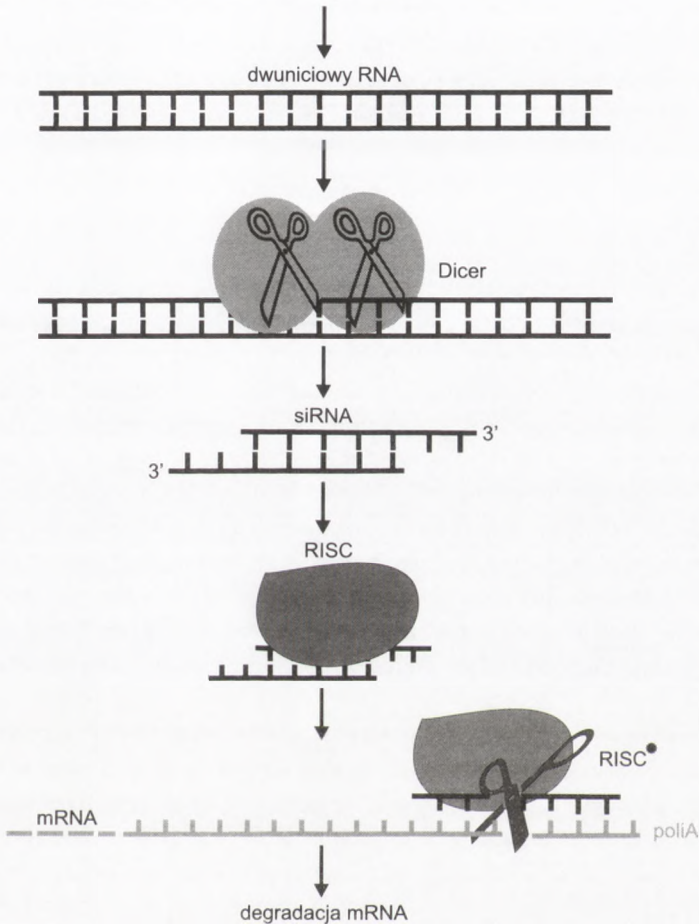
transkrypcji, fragmenty genu w orientacji sens i antysens. Okazało się, że indukowany lokalnie PTGS rozprzestrzenia się w roślinie, czyli roślina reaguje na taki bodziec systemicznie. Uzyskano homozygotyczne, transgeniczne linie roślin *Nicotiana benthamiana*, zawierające dodatkową kopię genu reduktazy azotynowej lub azotanowej. Skutkiem wprowadzenia transgenów, dochodziło do wyciszenia w niektórych roślinach ekspresji odpowiednich enzymów (od 3 do 57% linii wykazywało wyciszenie jednej z reduktaz). Jeśli następnie przeszczepiano fragmenty pędów z pączkami roślin niewyciszonych (zraz) na ukorzonioną część rośliny transgenicznej, z wyciszoną ekspresją reduktazy azotynowej lub azotanowej (podkładka), to wyciszenie ekspresji odpowiedniego genu rozprzestrzeniało się w kierunku zrazu. Jeśli natomiast wykonano eksperyment odwrotny – czyli przeszczepiano fragment pędu z pączkami rośliny wyciszonej na ukorzonioną część rośliny niewyciszonej, to sygnał odpowiedzi systemicznej nie rozprzestrzeniał się w kierunku podkładki. Wniosek z tych eksperymentów był następujący: sygnał odpowiedzi systemicznej rozprzestrzenia się jednokierunkowo, od podkładki do zrazu, nigdy w odwrotnym kierunku. Dodatkowo eksperymenty te wskazywały na istnienie dyfundującego sygnału, zależnego od obecności transgeny, przekazującego „polecenie” wyciszenia (12).

Okazało się, że tak jak w przypadku RNAi i tłumienia genów (*quelling*), zjawisku PTGS towarzyszy pojawienie się krótkich (21-25 nt), dwuniciowych fragmentów RNA (tzw. siRNA – *small interfering RNA*), których jedna nić jest komplementarna do mRNA wyciszanego genu. Cechą charakterystyczną siRNA są wystające, dwunukleotydowe końce 3' (13). Czy siRNA mogą być cząsteczkami sygnałowymi, przekazującymi polecenie wyciszenia? W zasadzie mogłyby być. Są wystarczająco małe by wędrować poprzez plasmodesmy lub systemem naczyniowym rośliny. Jednakże są pewne dane zaprzeczające takim spekulacjom. Otóż, jak już wspomniano, PTGS może być wywołany obecnością wirusa RNA. Jest to zatem system obrony rośliny przed infekcją. Wirusy oczywiście rozwinęły strategię uniknięcia konfrontacji z systemem obronnym rośliny. Niektóre z nich kodują białka supresorowe – blokujące obronę rośliny. Jednym z takich białek jest proteaza HcPro, kodowana przez wirusa ziemniaka Y (PVY – *potato virus Y*). Aktywność tej proteazy skorelowana jest z brakiem siRNA w roślinie. Eksperymenty z przeszczepianiem fragmentów roślin pozwalają sądzić, że proteaza HcPro blokuje odpowiedź rośliny, pomimo że sygnał jest przekazywany (14). Przeczyłoby to sugestiom, że siRNA są cząsteczkami sygnałowymi: tym tajemniczym sygnałem, jak się wydaje, są cząsteczki syntetyzowane lub aktywowane na etapie poprzedzającym produkcję siRNA (14).

Analiza mutantów *Arabidopsis thaliana* niezdolnych do indukcji PTGS pozwoliła zidentyfikować niezwykle ciekawy gen, którego produkt bierze udział w potranskrypcyjnym wyciszaniu u roślin. Gen ten, określanany mianem *SDE1/SGS2*, koduje polimerazę RNA zależną od RNA (*RNA-dependent RNA polymerase* – RdRp) (15). Stwierdzono, że wskutek aktywności tego enzymu pojawiają się w roślinie tzw. drugorzędowe cząsteczki siRNA. Odpowiadają one innym rejonom mRNA niż wprowadzone

**Czynniki indukujące specyficzną degradację RNA**

- wirusy RNA
- ekspresja transgenu
- wektory kodujące RNA sens i antysens
- nieprawidłowy RNA
- egzogennie wprowadzony dwuniciowy RNA



Rys. Przypuszczalny mechanizm specyficznego degradacji mRNA związanej ze zjawiskiem RNAi. Sygnałem indukującym zjawisko RNAi jest pojawienie się w komórce egzo- lub endogennego dwuniciowego RNA. dsRNA jest rozpoznawany przez Dicer i rozcinany na 21-25-nukleotydowe fragmenty tzw. siRNA. Następnie siRNA wiąże się z kompleksem RISC, którego aktywacja polega m.in. na usunięciu jednej nici siRNA. W ten sposób druga nici może służyć jako specyficzna sonda odpowiedzialna za odnalezienie właściwego mRNA. Związany z kompleksem RISC mRNA zostaje przecięty w obrębie lokalnego dupletu jaki tworzy z siRNA.

do rośliny dwuniciowe RNA, z których generowane były pierwotne siRNA. Zakładano, że komplementarna do mRNA nici siRNA, służy jako starter dla RdRp. W ten sposób powstają dwuniciowe cząsteczki RNA, które mogą być substratem do produkcji nowych, drugorzędowych siRNA. Takie założenie sugeruje, że powinniśmy obserwować jedynie takie siRNA; powinny one zawierać sekwencję komplementarną do rejonów w kierunku 5' mRNA w stosunku do pierwotnych siRNA. U roślin tak jednak nie jest. Stwierdzono, że wtórne siRNA zawierają nici komplementarną zarówno do rejonów rozciągających się w mRNA w kierunku 5' jak i 3' w stosunku do pierwotnych siRNA. Mechanizm produkcji wtórnych siRNA nadal pozostaje niewyjaśniony (16) (rys.).

Kolejnym ciekawym odkryciem dotyczącym zjawiska PTGS u roślin było znalezienie korelacji między wyciszeniem konkretnego genu, a miejscowospecyficzną metylacją tego genu. Wskazuje to na zależność między procesem PTGS a TGS.

### 3. *Quelling*

Zdecydowanie wcześniej niż odkryto zjawisko RNAi, wyciszenie genów stwierdzono u grzyba *Neurospora crassa* (17). W pracowni G. Macino zaobserwowano wyciszenie genu indukowane obecnością transgeny. Wprowadzenie do genomu *Neurospora crassa* fragmentów genów biosyntezy karotenoidów *albino-1* i *albino-2*, powodowało wyciszenie aktywności odpowiednich endogennych genów i skutkowało zanikiem pomarańczowego barwnika w konidiach. Transgeniczne osobniki *N. crassa* były zatem formami albinotycznymi. Minimalna długość wprowadzanych fragmentów transgeny, wyciszająca aktywność endogennych genów, wynosiła 132 par zasad (pz). Jedynie transgeny odpowiadające egzonom indukowały *quelling*, natomiast transformacja komórek grzybni sekwencjami promotorowymi nie prowadziła do wyciszenia genu. Dodatkowo zauważono, że uszkodzenie genu kodującego cytozyno 5-metylo transferazę DNA (*dim-2*), nie wpływało na wyciszenie genów biosyntezy karotenoidów, pomimo że specyficzna metylacja towarzyszy potranskrypcyjnemu wyciszaniu genów u *N. crassa* (18). Zaobserwowano, że zdolność do wyciszania jest cechą dominującą, obecną w szczepach zawierających w heterokariotycznej grzybni zarówno jądra transgeniczne jak i nietransgeniczne (18). Jest to zrozumiałe, jeśli weźmie się pod uwagę wyniki eksperymentów, w których wykazano, że tak jak w przypadku RNAi i PTGS, inicjacja wyciszania prowadzi do pojawienia się specyficznych siRNA (19). Obecność odpowiednich transgenów w jednym typie jąder heterokariotycznej grzybni wystarczy do produkcji siRNA, działających na terenie cytoplazmy. Akumulacja siRNA zależała od aktywności genów *qde-1* i *qde-3*, ale nie była uwarunkowana obecnością aktywnego genu *qde-2*. Gen *qde-1* koduje RdRp, której aktywność jest również krytyczna dla potranskrypcyjnego wyciszania genów w roślinach, *qde-3* koduje DNA helikazę, której rola w zjawisku *quelling* jest niejasna, aczkolwiek musi być skorelowana z produkcją siRNA, natomiast produkt genu *qde-2*

wchodzi w skład kompleksu RISC, operującego na późniejszym etapie wyciszania (19,20). Wszystkie dotąd prowadzone obserwacje dotyczące zjawiska *quelling* wskazują, jak się wydaje, na wysokie podobieństwo tego procesu do potranskrypcyjnego wyciszania genów u roślin.

#### 4. RNAi

W 1998 r. Fire i in. opublikowali, słynną obecnie pracę, w której zademonstrowali potranskrypcyjne wyciszanie genów wskutek wprowadzenia do komórek *C. elegans* dwuniciowych fragmentów RNA (1). Jednym z genów, którego aktywność została zbadana w tych eksperymentach, był gen *unc-22*. *unc-22* koduje białko miofilamentowe komórek mięśniowych, nieistotne dla życia nicienia. Białko to występuje w liczbie kilku tysięcy kopii w komórkach mięśni prążkowanych. Obniżenie jego poziomu w komórce powoduje pojawienie się specyficznego fenotypu, określanego mianem *twitching phenotype* (fenotyp skurczenia ciała). Całkowity brak tego białka w komórkach mięśniowych doprowadza do poważnych uszkodzeń aparatu kurczliwego komórek mięśniowych i do ograniczenia ruchliwości zwierzęcia. Wprowadzenie 30 000 kopii dwuniciowego RNA, pokrywającego 742-nukleotydowy segment części kodującej genu *unc-22*, do organizmu dorosłego zwierzęcia, prowadziło do pojawienia się fenotypu *twitching* średnio u stu osobników następnego pokolenia (zwykle samica składa około 200 jaj). Ekspresja genu *unc-22* rozpoczyna się na etapie embrionu zawierającego około 500 komórek. W tym momencie, wyjściowa liczba wstrzykniętych cząsteczek dwuniciowego RNA jest najprawdopodobniej zmniejszona, wskutek rozcieńczenia, do kilku kopii dsRNA na komórkę. Dalsze eksperymenty nad regulacją aktywności genu *unc-22* i innych genów pozwoliły na wyciągnięcie następujących wniosków. Fenomen RNAi rozprzestrzenia się w organizmie i jest przekazywany następnym pokoleniom. Do wywołania zjawiska RNAi wystarcza kilka kopii dsRNA na komórkę, co sugeruje obecność katalitycznego i/lub amplifikującego mechanizmu zwiększającego liczbę dwuniciowych cząsteczek RNA. RNAi zachodzi na poziomie dojrzałego mRNA, ponieważ wprowadzenie dwuniciowych kopii RNA odpowiadających sekwencjom intronowym lub promotorowym genu nie wywołuje efektu wyciszenia genu. Zjawisko RNAi jest niezwykle specyficzne: dostarczenie dwuniciowych cząsteczek RNA odpowiadających egzonom konkretnego genu wywoła obniżenie poziomu mRNA tylko tego genu. Opisane eksperymenty były wykonywane drogą wstrzyknięcia dwuniciowych cząsteczek RNA do jelita. Później okazało się, że te cząsteczki można wprowadzać karmiąc zwierzęta bakteriami *Escherichia coli*, zawierającymi odpowiednie plazmidy produkujące dwuniciowe cząsteczki RNA (21), podając ekstrakt z roślin, w których produkowane są siRNA (22), a nawet przez „moczenie” *C. elegans* w roztworze zawierającym dsRNA (23).

W dalszych badaniach wykazano, że RNAi można indukować dwuniciowymi cząsteczkami RNA u *Drosophila melanogaster*, u myszy, u ryb, u człowieka. W produk-

cię siRNA zaangażowany jest enzym, po raz pierwszy odkryty u *D. melanogaster* i nazywany „Dicer”. Początkowo zaliczono go do rodziny enzymów rybonukleolitycznych, działających podobnie jak RNaza III z *E. coli* (24). Obecnie enzymy o podobnej aktywności nukleazowej dzieli się na trzy klasy: jedną, do której zalicza się RNazę III *E. coli*, zawierającą jedną domenę katalityczną i domenę wiążącą dwuniciowy RNA, drugą, zwaną rodziną nukleaz Drosha zawierającą enzymy posiadające dwie domeny katalityczne oraz trzecią klasę, zawierającą białka mające dwie domeny katalityczne, dodatkowo domenę helikazową i domenę PAZ (24). Trzecia klasa jest obecnie nazywana rodziną Dicer (24). Aktywność katalityczna białka Dicer zależy od ATP. Enzym zawiera kilka domen: poczynając od N – końca białka znajduje się domena helikazowa, następnie domena PAZ (nazwa domeny pochodzi od znalezienia jej również w białkach zaangażowanych w kontrolę rozwoju organizmu takich jak Piwi/Argonaute/Zwille u *Drosophila melanogaster* i *Arabidopsis thaliana*), dwie domeny o aktywności RNazy III oraz domena wiążąca dwuniciowy RNA (25). Homologi genu białka Dicer odkryto u *C. elegans* (*dcr-1*), *Homo sapiens* (Dicer), *A. thaliana* (CAF/Sin-1 – obecnie nazywane DCL-1) (26). Enzym rozcina dwuniciowe cząsteczki RNA na krótkie siRNA (13).

Kolejne odkrycia związane z mechanizmem RNAi zaowocowały stwierdzeniem, że siRNA zostają włączone do białkowego kompleksu enzymatycznego, nazywanego RISC (27). Początkowo kompleks ten jest nieaktywny. Przejście w stan aktywny wymaga rozplecenia siRNA i reorganizacji kompleksu (27,28). Jedna z nici pozostaje w kompleksie RISC, gdzie pełni rolę specyficznej sondy, umożliwiającej znalezienie odpowiedniego mRNA. W dalszym etapie dochodzi do utworzenia lokalnego dupleksu siRNA:mRNA. Rozcięcie mRNA następuje pośrodku sekwencji nukleotydowej mRNA, hybrydującej z siRNA (27,29). Frakcjonowanie chromatograficzne surowego ekstraktu z embrionalnych komórek *Drosophila* i ludzkich komórek HeLa wskazało, że mRNA jest degradowany przez specyficzną nukleazę, różną od białka Dicer. Aktywne frakcje zawierały 25-nukleotydowe siRNA, homologiczne do hydrolizowanego rejonu mRNA (28). Dalej oczyszczono kompleks RISC z ekstraktu *Drosophila* i jego masę oszacowano na 360 kDa (28). Kompleks ten nie wymagał obecności ATP do utworzenia się, zawierał dwuniciowe siRNA i nie był zdolny do cięcia mRNA. Inny wyizolowany kompleks RISC z tego samego ekstraktu miał około 232 kDa, zawierał jedną nić pochodzącą z siRNA i hydrolizował docelowy mRNA (27). Stwierdzono, że jego tworzenie wymagało obecności ATP. Wyizolowano również aktywny kompleks RISC z ekstraktu komórek HeLa. Ciężar cząsteczkowy tego kompleksu został oszacowany na 90-160 kDa. Zidentyfikowano dwa białka wchodzące w jego skład, oba należą do rodziny *Argonaute* (eIF2C1 i eIF2C2/GERp95). Ich rola w kompleksie RISC jest nieznana, choć wiadomo, że są to białka biorące dodatkowo udział w translacji (30). Choć uważa się, że RNAi nie wywiera bezpośredniego wpływu na translację, to jednak obecność pewnych białek w RISC może kierować ten kompleks do różnych miejsc w komórce, gdzie wypełnia on odmienne funkcje. Do takich refleksji skłania fakt, że stRNA (*small temporal RNA*, np. *lin-4* i *let-7* u *C. elegans*), będące produktem

działania enzymu Dicer, regulują ekspresję genetyczną na poziomie translacji (31). Nie wiadomo, czy przypadkiem i one nie wchodzi w skład pewnej odmiany kompleksu RISC, kierowanego w tym przypadku do rybosomu. Obecność czynników translacyjnych w tym kompleksie, jak się wydaje, jest intrygująca. W ostatnich badaniach nad dojrzewaniem miRNA (*micro* RNA) w komórkach ssaczych wykazano, że endogennie kodowane miRNA również kierowane są do kompleksu RISC. Udowodniono, że ludzki homolog *let-7* *C. elegans* zostaje wbudowany w kompleks RISC i kieruje rozcięciem komplementarnego RNA (32). Obserwacje te skłoniły do zaproponowania hipotezy, że kompleksy RISC zawierające miRNA mogą być zaangażowane w dwóch różnych szlakach metabolicznych: w RNAi albo w translacji. W tej sytuacji obecność czynników translacyjnych w kompleksie RISC zaczyna być coraz bardziej zrozumiała (32).

Nie ulega wątpliwości, że w skład aktywnego kompleksu RISC musi, przynajmniej przejściowo, wchodzić RNA helikaza, rozplatająca dwuniciowe siRNA, oraz RNaza, rozcinająca docelowy mRNA.

W poszukiwaniach genów odpowiedzialnych za zjawisko RNAi u *C. elegans* wykazano, że w proces ten zaangażowana jest RdRp. U badanego nicienia w genomie znajduje się rodzina genów zawierająca czterech członków: *ego-1*, *rrf-1*, *rrf-2* i *rrf-3*. Wśród nich gen *rrf-1* koduje RdRp zaangażowaną w proces RNAi. Tak jak u roślin, zaobserwowano pojawianie się puli wtórnych cząsteczek siRNA, będących najprawdopodobniej efektem aktywności tego enzymu (33). Nie zidentyfikowano jednak homologów takiego genu ani w genomie *D. melanogaster*, ani w genomie człowieka. Opublikowane zostały dwa sprzeczne raporty dotyczące zaangażowania RdRp w zjawisko RNAi u muszki owocowej. W jednym z nich potwierdzono aktywność RdRp w lizatach komórek embrjonalnych (34). W drugim wykazano, że w rekonstruowanym układzie *in vitro* komórek owadzich, zachowującym aktywność RNAi, występują jedynie siRNA odpowiadające wprowadzonym dwuniciowym cząsteczkom RNA (35). Ten ostatni eksperyment zaprzecza obecności i działaniu RdRp w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów u *D. melanogaster*. W niedawnych badaniach nad mechanizmem RNAi u człowieka również zaprzecza się udziałowi RdRp w RNAi. Pokazano mianowicie, że w aktywnych pod kątem RNAi ekstraktach komórek ludzkich, zablokowanie 3' końca antysensowej nici siRNA nie blokuje potranskrypcyjnego wyciszania (a zatem grupa 3'OH tej nici hybrydującej z mRNA nie służy jako starter do wydłużania RNA) (30). Warto nadmienić, że identyczny eksperyment u *C. elegans* powodował zahamowanie procesu RNAi (30). Opisane wyniki wymagają z pewnością dodatkowych doświadczeń wyjaśniających te rozbieżności. Wynikać one mogą z faktu, że omawiane eksperymenty zostały wykonane w układach *in vitro* i nie wiadomo, czy pewne składniki maszyny RNAi nie zostały utracone podczas izolacji.

PTGS/*quelling*/RNAi mogą być indukowane u roślin, grzybów i *C. elegans* za pomocą wprowadzania długich, dwuniciowych fragmentów RNA. Ten sposób indukcji RNAi wydaje się niemożliwy w przypadku niektórych komórek ssaczych. Wprowadzenie długich, dwuniciowych RNA do tych komórek powoduje zablokowanie synte-



zy białka poprzez odpowiedź interferonową i skierowanie komórek na drogę apoptozy. W odpowiedzi interferonowej dwuniciowe RNA, o długości przynajmniej 30 pz, wiążą i aktywują białkową kinazę PKR i syntetazę 2',5'-oligoadenylanową (2',5'-AS – *oligoadenylate synthetase*). Kinaza PKR fosforyluje czynnik translacyjny eIF2 $\alpha$ , przez co blokuje translację. Z kolei 2',5'-AS indukuje niespecyficzną degradację komórkowego mRNA poprzez aktywację rybonukleazy L 2',5'-oligoadenylanem (30). Co intrygujące, fenomen ten zaobserwowano w liniach komórek ludzkich 293 (embrionalne komórki ludzkich nerek), NIH/3T3 (mysie fibroblasty), CHO (komórki jajników chomika chińskiego), czy wreszcie w komórkach HeLa (30). Równocześnie nie stwierdzono tego typu odpowiedzi w mysich oocytach i we wczesnych mysich komórkach embrionalnych (10,36). Dlaczego te obserwacje są niespójne – nie wiadomo. Bezpieczniej jest jednak indukować RNAi w komórkach ssaczy wprowadzając syntetyczne, „gotowe” siRNA. W tym przypadku indukcja RNAi jest prawidłowa i degradacja mRNA – specyficzna.

Podsumowanie znanych faktów dotyczących mechanizmu RNAi pozwala wyróżnić jego cztery podstawowe etapy: 1) trawienie dwuniciowego RNA, 2) utworzenie kompleksu wyciszającego, 3) aktywowanie kompleksu wyciszającego i 4) degradację mRNA. Podczas pierwszego etapu dochodzi do hydrolizy długich dsRNA na 21-25 pz fragmenty czyli siRNA. Proces ten jest zależny od ATP, a siRNA zawierają fosforan na swoich końcach 5' oraz grupę hydroksylową na końcach 3'. Dodatkowo, na końcach 3' obserwujemy obecność dwóch niesparowanych (wystających) nukleotydów. Taka struktura siRNA jest optymalna w dalszych etapach RNAi: modyfikacja końca 5' nici antysensowej siRNA blokuje aktywność małych interferujących RNA, podczas gdy zakończone „na tępo” siRNA nie są bardzo wydajne. Za produkcję siRNA odpowiedzialne są enzymy z rodziny Dicer. W drugim etapie siRNA zostają włączone do nieaktywnego białkowego kompleksu RISC. Trzeci etap to rozplecenie siRNA i remodelowanie kompleksu RISC. Proces jest zależny od ATP, wymaga aktywności RNA helikazy. Zreorganizowany RISC jest aktywny i gotowy do specyficznej degradacji mRNA. W czwartym etapie dochodzi do rozcięcia docelowego mRNA w obszarze hybridyzującym z antysensowym siRNA, znajdującym się w aktywnym kompleksie RISC. U pewnych organizmów eukariotycznych (*C. elegans*, *A. thaliana*) ma miejsce jeszcze piąty etap, w którym dochodzi do syntezy wtórnych siRNA, będących produktem aktywności RdRp. Na rysunku podsumowano znane fakty dotyczące mechanizmu RNAi.

Warto nadmienić, że wiele białek zaangażowanych w proces RNAi/PTGS/*quelling* wykazuje silną homologię, co sugeruje wspólne ewolucyjne pochodzenie tych dróg metabolicznych. W tabeli przedstawiono wybrane białka zaangażowane w procesy RNAi/PTGS/*quelling*. Dane w tabeli zostały tak ułożone, by podkreślić wspólne etapy tych procesów, jak i wspólne pochodzenie zaangażowanych w nie białek.

Tabela

Najważniejsze zidentyfikowane białka zaangażowane w procesy PTGS/RNAi i *quelling*

Białko	Organizm	Funkcja w RNAi/PTGS/ <i>quelling</i>
Dicer	<i>Drosophila melanogaster</i>	RNAi, dojrzewanie długich dwuniciowych cząsteczek RNA prowadzące do powstania siRNA i stRNA
Dicer	<i>Homo sapiens</i>	RNAi, dojrzewanie długich dwuniciowych cząsteczek RNA prowadzące do powstania siRNA i miRNA
DCR-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNAi, dojrzewanie długich dwuniciowych cząsteczek RNA prowadzące do powstania siRNA i stRNA
CARPEL FACTORY (CAF/Sin-1), obecnie nazywane DCL 1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PTGS, dojrzewanie długich dwuniciowych cząsteczek RNA prowadzące do powstania siRNA i miRNA
RDE-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNAi, inicjacja
Argonaute-1 (Ago-1)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PTGS, inicjacja
Argonaute-2 (Ago-2)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PTGS, składnik kompleksu RISC
eIF2C1	<i>Homo sapiens</i>	RNAi, składnik kompleksu RISC, inicjacja translacji
eIF2C2/GERp95	<i>Homo sapiens</i>	RNAi, składnik kompleksu RISC, inicjacja translacji, składnik aparatu Golgiego lub retikulum endoplazmatycznego
QDE-2	<i>Neurospora crassa</i>	<i>quelling</i> , udział w formowaniu kompleksu RISC
SDE 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PTGS, RNA helikaza, rozplatanie RNA
QDE 3	<i>Neurospora crassa</i>	<i>quelling</i> , DNA helikaza, rola niejasna
SMG-2	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNAi, homolog drożdżowej RNA helikazy, należy do rodziny helikaz Upf1p, białko jest odpowiedzialne za utrzymywanie się wyciszenia
MUT 6	<i>Cblamydomonas reibardtii</i>	PTGS, DEAH-box helikaza, rozplatanie RNA
EGO-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNAi, RNA-zależna RNA polimeraza, białko jest zaangażowane w RNAi komórek zarodkowych
RRF-1	<i>Caenorhabditis elegans</i>	RNAi, RNA-zależna RNA polimeraza, białko jest zaangażowane w RNAi komórek somatycznych
SDE 1/SGS 2	<i>Arabidopsis thaliana</i>	PTGS, RNA-zależna RNA polimeraza
QDE-1	<i>Neurospora crassa</i>	<i>quelling</i> , RNA-zależna RNA polimeraza
SGS 3	<i>Arabidopsis thaliana</i>	funkcja nieznana

5. RNAi/PTGS/*quelling*: podobieństwa i różnice, znaczenie biologiczne

Istnieje szereg dowodów świadczących o tym, że RNAi/PTGS i *quelling* mają wiele cech wspólnych. Zaliczyć do nich można podobny mechanizm inicjacji poprzez dwuniciowy RNA, homologiczny do egzonu/egzonów specyficznego genu. Dowiedzono, że substratem we wszystkich tych procesach jest cytoplazmatyczny mRNA. Wprowadzenie dwuniciowego RNA, skierowanego na sekwencje intronowe genu lub na sekwencje promotorowe, nie indukuje potranskrypcyjnego wyciszenia. U wszystkich przebadanych organizmów w trakcie potranskrypcyjnego wyciszenia dochodzi do produkcji siRNA zaangażowanych w degradację specyficznego mRNA. Budowa siRNA jest również uniwersalna. Istnieją silne przesłanki by sądzić, że we wszystkich trzech przypadkach dochodzi do tworzenia kompleksu RISC. W rozdziale poświęconym PTGS wspomniano, że zjawisko to jest jednym ze składników systemu obronnego rośliny, skierowanego między innymi przeciwko wirusom RNA. Wirusy jedno-

częściej często kodują supresory PTGS. W niedawnych badaniach pokazano, że także u *D. melanogaster* infekcja wirusem RNA prowadzi do indukcji RNAi. Dodatkowo, podobnie jak roślinne wirusy RNA, zwierzęce wirusy RNA kodują białka supresorowe, przeciwdziałające RNAi.

Powstaje tu pytanie: co różni te trzy zjawiska?

Wspomniano w tej pracy o roli RdRp w procesie PTGS u roślin, *quelling*-u u grzybów i RNAi u *C. elegans*. Wydaje się, że polimeraza ta nie odgrywa żadnej roli w RNAi u *D. melanogaster* i u człowieka. Być może obecność RdRp u owadów i ssaków, jak się okazało, była bardziej szkodliwa niż użyteczna i odpowiednie geny zostały usunięte z genomów tych organizmów (przynajmniej jak dotąd nie udało się ich zidentyfikować). Wyniki przeprowadzonych eksperymentów sugerują ponadto, że produkcja pierwotnych siRNA jest wystarczająca dla efektywnego wyciszenia specyficznych mRNA u *D. melanogaster* czy u człowieka. U roślin PTGS, jak się wydaje, jest silnie powiązany z transkrypcyjnym wyciszaniem genów (TGS) poprzez indukowaną *de novo* specyficzną metylację DNA. W przypadku RNAi nie dochodzi do metylacji DNA. Przez lata uważano, że DNA *C. elegans* i *D. melanogaster* wcale nie jest metylowany. O ile nadal, jak się wydaje, jest to prawdą dla nicienia (37), to ostatnio ukazały się doniesienia, że u muszki owocowej obserwuje się metylację DNA, aczkolwiek w znacznie mniejszym stopniu niż przykładowo u człowieka (ta ostatnia, jak się wydaje, nie jest związana z RNAi) (38). Czy metylacja DNA u tego owada jest powiązana z RNAi – nie wiadomo. Wreszcie ostatnia różnica, chociaż wcale nie najmniej istotna. Otóż wprowadzenie do większości ssaczych komórek długich cząsteczek dwuniciowego RNA, powoduje odpowiedź interferonową i niespecyficzną degradację mRNA. Natomiast w przypadku roślin, *C. elegans*, *D. melanogaster* i grzybów można wprowadzać takie cząsteczki i indukować specyficzną degradację mRNA. Wprowadzenie odpowiedzi interferonowej u ssaków, zamiast indukcji RNAi okazało się najprawdopodobniej bardziej korzystne dla funkcjonowania całego organizmu. Ponieważ siRNA indukują RNAi u ssaków, nie można wykluczyć, że cząsteczki tego typu tworzą się również samoistnie w komórkach ssaczych, w odpowiedzi na konkretne bodźce. Będzie bardzo interesujące wyjaśnienie ich potencjalnej roli w regulacji ekspresji genetycznej.

Jaka jest biologiczna rola opisanych procesów w komórce? Wielu naukowców skłania się do poglądu, że RNAi/PTGS i *quelling* reprezentują odmiany prastarego mechanizmu obronnego pierwszych eukariontów, kontrolującego inwazję obcych kwasów nukleinowych do komórki. Po rozejściu się dróg ewolucyjnych Eukaryota mechanizm ten koewoluował wraz z głównymi liniami rozwojowymi, czego efektem są obserwowane dziś PTGS (królestwo roślin), *quelling* (królestwo grzybów) i RNAi (królestwo zwierząt). Znane są wyniki doświadczeń, w których udowodniono, że mechanizmy te są zdolne do wyciszenia transpozonów, wirusów i innych pasożytniczych form kwasów nukleinowych. Przykładowo, u pewnych mutantów *A. thaliana* (39), *C. elegans* (40) i *Chlamydomonas reinhardtii* (41), w których zakłócony został proces potranskrypcyjnego wyciszenia genów, dochodziło do reaktywacji wyciszonych

transpozonów. Mechanizmy RNAi/PTGS i *quelling*-u nie działają „w próżni”. Mamy szereg dowodów, że enzymy zaangażowane w te procesy uczestniczą również w innych procesach komórkowych. Tak też mutacje w genie kodującym Dicer lub jego homologach u innych organizmów eukariotycznych, mają dramatyczne konsekwencje rozwojowe. U *Arabidopsis thaliana* różne mutacje w genie DCL1 (homolog Dicera) powodują zakłócenia we wzroście rośliny i prawidłowym wykształceniu kwiatów. Ponieważ wiemy, że enzym Dicer jest zaangażowany w roślinach w dojrzewanie siRNA oraz, najprawdopodobniej również w proces dojrzewania miRNA (*micro*-RNA), można spekulować, że małe RNA odgrywają podstawową rolę w kontrolowaniu rozwoju osobniczego (42). Przypuszczenia te szczególnie uprawnia fakt, że u *C. elegans* enzym Dicer bierze udział w dojrzewaniu małych cząsteczek RNA, zwanych małymi tymczasowymi RNA (*small temporal* RNA – stRNA). Te ostatnie z kolei zaangażowane są w kontrolę ekspresji specyficznych mRNA na poziomie translacji (hybrydują do 3' UTR – *untranslated region* – i blokują translację) w określonych stadiach larwalnych nicienia. Ich rola polega na regulowaniu prawidłowego rozwoju osobniczego robaka (31). Odkryto również, że z siedmiu genów *smg1-7* u *C. elegans*, których produkty są odpowiedzialne za przeprowadzanie degradacji cząsteczek mRNA zawierających przedwczesne kodony stop (NMD – *nonsense mediated decay*), trzy zaangażowane są również w proces RNAi (43). Chociaż połączenia tych szlaków w sensie biochemicznym nadal nie są zrozumiałe, to jasno z podanych przykładów widać, że szlak metaboliczny RNAi/PTGS, jak i najprawdopodobniej *quelling* jest integralnym elementem metabolizmu komórkowego działającym na poziomie mRNA.

## Literatura

1. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-811.
2. Napoli C., Lemieux C., Jorgens R., (1990), *Plant Cell*, 2, 279-289.
3. Aravind L., Watanabe H., Lipman D. J., Koonin V., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 11319-11324.
4. Ngo H., Tschudi C., Gull K., Ullu E., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 14687-14692.
5. Lohman J. U., Endl I., Bosch T. C., (1999), *Dev. Biol.*, 214, 211-214.
6. Kennerdell J. R., Carthew R. W., (1998), *Cell*, 95, 1017-1026.
7. Wargelius A., Ellingsen S., Fjose A., (1999), *BBRC*, 263, 156-161.
8. Oelgeschlager M., Larrain J., Geissert D., DeRobertis E. M., (2000), *Nature*, 405, 757-763.
9. Cogni C., Irelan J. T., Schumacher M., Schidkauer T. J., Selker E. U., Macino G., (1996), *EMBO J.*, 15, 3153-3163.
10. Wianny F., Zernicka-Goetz M., (2000), *Nature Cell Biol.*, 2, 70-75.
11. Waterhouse P. M., Graham M. W., Wang M. B., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 13959-13964.
12. Palauqui J-C., Elmayan T., Pollien J-M., Vaucheret H., (1997), *EMBO J.*, 16, 4738-4745.
13. Hamilton A. J., Baulcombe D. C., (1999), *Science*, 286, 950-952.
14. Mallory A. C., Ely L., Smith T. H., Marathe R., Avandalakshmi R., Fagard M., Vaucheret H., Pruss G., Bowman L., Vance V. B., (2002), *Plant Cell*, 13, 571-583.
15. Dalmay T., Horsfield R., Braunstein T. H., Baulcombe D. C., (2001), *EMBO J.*, 20, 2069-2077.
16. Fabian E., Jones L., Baulcombe D. C., (2002), *Plant Cell*, 14, 857-867.
17. Romano N., Macino G., (1992), *Mol. Microbiol.*, 6, 3343-3353.

18. Cogni C., Irelan J. T., Schumacher M., Schmidhauser T. J., Selker E. U., Macino G., (1996), *EMBO J.*, 15, 3153-3163.
19. Catalanotto C., Azzalin G., Macino G., Cogni C., (2002), *Gen. Dev.*, 16, 790-795.
20. Cogni C., Macino G., (1999), *Nature*, 399, 166-169.
21. Timmons L., Fire A., (1998), *Nature*, 395, 854.
22. Boulta A., Kalantidis K., Tavernarakis N., Tsagris M., Tabler M., (2002), *Nucl. Acids Res.*, 30, 1688-1694.
23. Tabara H., Sarlissian M., Kelly W. G., Fleenor J., Grishok A., Timmons L., Fire A., Mello C. C., (1999), *Cell*, 99, 123-132.
24. Hannon G. J., (2002), *Nature*, 418, 244-251.
25. Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J., (2001), *Nature*, 409, 363-366.
26. Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T., (2001), *Genes Dev.*, 15, 188-200.
27. Nykänen A., Haley B., Zamore P. D., (2001), *Cell*, 107, 309-321.
28. Hammond S. M., Bernstein E., Beach D., Hannon G. J., (2000), *Nature*, 404, 293-296.
29. Hutvagner G., Zamore P. D., (2002), *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 12, 225-232.
30. Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luehrmann R., Tuschl T., (2002), *Cell*, 110, 563-574.
31. Grishok A., Pasquinelli A. E., Conte D., Li N., Parrish S., Ha I., Baillie D. L., Fire A., Ruvkun G., Mello C. C., (2001), *Cell*, 106, 23-34.
32. Hutvagner G., Zamore P. D., (2002), *Science*, 297, 2056-2060.
33. Sijen T., Fleenor J., Simmer F., Thijssen K. L., Parish S., Timmons L., Plasterk R. H. A., Fire A., (2001), *Cell*, 107, 465-476.
34. Lipardi C., Wei O., Paterson B. M., (2001), *Cell*, 107, 297-307.
35. Zamore P., Tuschl T., Sharp P., Bartel D., (2000), *Cell*, 101, 25-23.
36. Svoboda P., Stein P., Hayashi H., Schultz R. M., (2000), *Development*, 127, 4147-4156.
37. Wassenegger M., (2002), *Int. Rev. Cytol.*, 219, 61-113.
38. Lyko F., (2002), *Trends Genet.*, 17, 169-172.
39. Hiroshika H., Okamoto H., Kakutani T., (2000), *Plant Cell*, 12, 357-369.
40. Ketting R. F., Overkamp T. H., van Luenen H. G., Plasterk R. H., (1999), *Cell*, 99, 133-141.
41. Wu-Scharf D., Jeong B-R., Zhang C., Cerutti H., (2000), *Science*, 290, 1159-1162.
42. Kidner C. A., Martienssen R. S., (2003), *Trends Genet.*, 19, 13-16.
43. Mango S. E., (2001), *Trends Genet.*, 17, 646-652.