

Marek Figlerowicz¹, Agata Tyczewska¹, Magdalena Figlerowicz²

WPLYW MAŁYCH REGULATOROWYCH RNA NA PRZEBIEG ZAKAŻEŃ WIRUSOWYCH – NOWE STRATEGIE LECZENIA ZAKAŻEŃ HCV

¹ Zespół Wirusologii Molekularnej, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu,
Kierownik Zespołu: Marek Figlerowicz

² Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej, Akademia Medyczna im. Karola
Marcinkowskiego w Poznaniu,
Kierownik Kliniki: Wojciech Służewski

Zidentyfikowane w ostatnich latach krótkie regulatorowe RNA (srRNA) odgrywają niezwykle istotną rolę w regulacji ekspresji genetycznej w organizmach eukariotycznych. Dodatkowo wpływają one na przebieg infekcji wirusowych. Wykazano, iż srRNA mogą indukować degradację wirusowych RNA, hamować ich replikację lub translację. Wydaje się zatem, że już wkrótce srRNA staną się orężem w walce z wirusami.

Słowa kluczowe: zjawisko RNAi, małe regulatorowe RNA, HCV

Key words: RNAi phenomenon, small regulatory RNA, HCV

WSTĘP

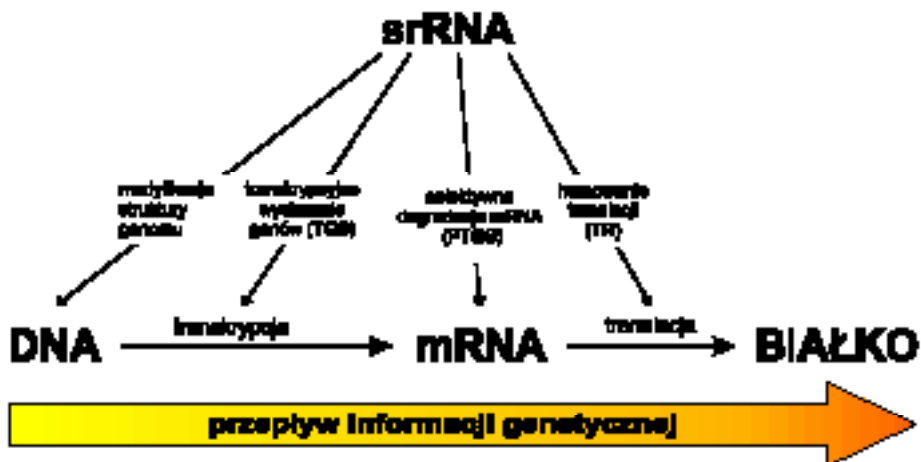
Odczytanie informacji zapisanej w genomach organizmów żywych to jedno z najważniejszych zadań stawianych współczesnej biologii molekularnej i bioinformatyce. Jeszcze do niedawna sądziliśmy, że znając strukturę DNA, kod genetyczny, mechanizmy replikacji i transkrypcji genów, będziemy w stanie stosunkowo szybko uporać się z tym wyzwaniem. Stworzony w drugiej połowie XX wieku schemat ekspresji informacji genetycznej wydawał się być logiczny i spójny. W szczególności sposób akcentował on rolę DNA, jako nośnika informacji genetycznej oraz białek, będących zarówno głównymi produktami, jak i regulatorami procesu wyrażania genów. Dokonane w ostatnich latach obserwacje zrodziły jednak wiele wątpliwości, których nie udawało się rozwiązać w oparciu o przyjęte wcześniej założenia. Na przykład, nieprawdziwą okazała się być teoria, w myśl której jeden gen koduje tylko jedno białko. Wykazano bowiem, że pojedynczy gen może być źródłem wielu transkryptów, a z pojedynczego transkryptu może powstać wiele różnych mRNA. Nie stwierdzono ponadto, by istniała prosta korelacja pomiędzy wielkością genomu, a złożonością organizmu. Dodatkowo okazało się, że jedynie u bakterii i prostych organizmów zwierzęcych lub roślinnych większość genomu koduje białka. U organizmów wyższych sekwencje kodujące

białka stanowią jedynie niewielką część materiału genetycznego (u człowieka mniej niż 5%). Co więcej, w wyniku poznania pełnej sekwencji genomu ludzkiego stwierdzono, iż wbrew wcześniejszym oczekiwaniom nie zawiera on 150 tysięcy, a jedynie około 25 tysięcy genów, a więc mniej więcej tyle samo, co prosta roślina modelowa *Arabidopsis thaliana*. Jednak prawdziwy przełom w naszym myśleniu o mechanizmach rządzących procesem ekspresji informacji genetycznej dokonał się dopiero w ostatnich latach, głównie za sprawą nieoczekiwane odkrycia zjawiska interferencji RNA (RNAi, ang. *RNA interference*) (1).

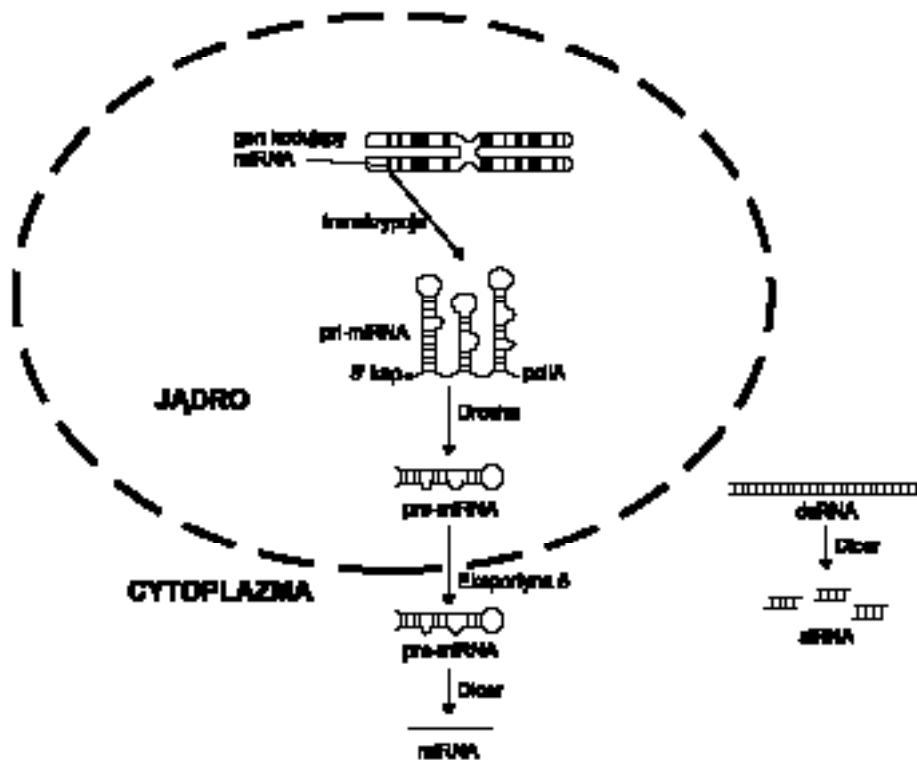
UDZIAŁ RNA W REGULACJI EKSPRESJI GENÓW

Pierwsze sugestie dotyczące istnienia nieznanego mechanizmu regulacji ekspresji genów pojawiły się na początku lat 90-tych ubiegłego wieku wraz z rozpoczęciem masowych badań roślin transgenicznych. Często, aby polepszyć cechy użytkowe jakiejś rośliny wprowadzano do jej genomu dodatkową kopię istniejącego już wcześniej genu (genu endogennego). Ku zaskoczeniu badaczy, zamiast wydajniejszej syntezy białka, zwykle obserwowano wyciszenie obu genów (2). Wyjaśnienie tego zjawiska przyniosły przeprowadzone osiem lat później badania zmierzające do selektywnego wyłączenia genów w modelowym organizmie zwierzęcym *Caenorhabditis elegans*. Wykazano, iż wprowadzenie do komórek *C. elegans* krótkich (około 20 nukleotydowych) dwuniciowych cząsteczek RNA, homologicznych do wybranego genu, prowadzi do jego całkowitego wyciszenia (3). Stwierdzono, iż gen jest transkrybowany, jednak powstający mRNA ulega degradacji w cytoplazmie. Początkowo sądzono, iż odkryty został unikalny mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania genów polegający na selektywnym trawieniu mRNA. Kolejne badania pokazały jednak, iż zaobserwowane zjawisko, zwane interferencją RNA, stanowi niewielką część niezwykle skomplikowanego mechanizmu regulacji ekspresji genów, w którym kluczową rolę odgrywają niewielkie cząsteczki RNA (srRNA; ang. *small regulatory RNA*) (1,3).

Obecnie wiemy, iż czynnikiem indukującym zjawisko wyciszania genów jest dwuniciowy RNA (dsRNA) (1). Jeżeli pojawi się on w komórce, wówczas jest rozpoznawany przez enzym zwany Dicerem. Dicer tnie dsRNA na 20-23 nukleotydowe dwuniciowe odcinki, zwane krótkimi interferencyjnymi RNA (siRNA; ang. *small interfering RNA*). Następnie siRNA przenoszone są do innego kompleksu białkowego noszącego nazwę RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*). W kolejnym etapie RISC zostaje zaktywowany. Proces ten polega na usunięciu jednej z nici siRNA, podczas gdy druga pozostaje w kompleksie i służy jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznawanie komplementarnych cząsteczek RNA lub DNA. Aktywny kompleks RISC (oznaczany czasami jako RISC*) może działać na wiele sposobów. Może on pozostać w cytoplazmie i wiązać się z mRNA. Jeżeli mRNA jest w pełni komplementarny do znajdującej się w RISC nici siRNA, wówczas zostaje on przecięty (mniej więcej w środku dupleksu mRNA/siRNA). W konsekwencji w stosunkowo krótkim czasie cała pula mRNA zostaje zdegradowana – proces ten nazwano potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS; ang. *posttranscriptional gene silencing*). Jeśli jednak mRNA jest tylko częściowo komplementarny do występującej w RISC nici siRNA, wówczas nie ulega on degradacji, jednakże pozostaje związany z kompleksem białkowym, przez co nie może służyć jako matryca do syntezy białka. Dochodzi zatem do wyciszenia genu na poziomie translacji (TR ang. *translational repression*). Kolejne badania pokazały, iż aktywny kompleks RISC może przedostawać się do jądra komórkowego i oddziaływać z komplementarnymi do nici



Rycina 1. Udział srRNA w regulacji ekspresji informacji genetycznej.
 Figure 1. Involvement of srRNA in the regulation of genetic material expression.



Rycina 2. Powstawanie siRNA i miRNA w komórkach ludzkich.
 Figure 2. siRNA and miRNA formation in human cells.

siRNA fragmentami genomu. Oddziaływania te indukują zależną od RNA metylację DNA. W rezultacie dochodzić może do przekształcenia euchromatyny w heterochromatynę, przez co gen staje się nieaktywny. Zjawisko to nazwano transkrypcyjnym wyciszaniem genów (TGS; ang. *transcriptional gene silencing*) (1).

Kolejnym momentem przełomowym w badaniach mechanizmów regulujących ekspresję informacji genetycznej było odkrycie cząsteczek mikro RNA (miRNA) (4). Okazało się, iż w genomach organizmów eukariotycznych, w tym i w genomie człowieka, obecne są sekwencje kodujące regulatorowe cząsteczki RNA tzw. miRNA. Sekwencje takie mogą występować w obrębie genów kodujących białka (często w intronach), jak i tworzyć niezależne geny nie kodujące białek a jedynie RNA. Transkrypty kodujące miRNA zwane są pri-miRNA. W ich strukturze występują zazwyczaj około 50-80 nukleotydy, nie w pełni komplementarne rejony dwuniciowe, które ze względu na swój kształt określane są mianem struktur typu spinki do włosów (ang. *hairpin*). Stwierdzono, iż miRNA powstają zarówno w organizmach roślinnych, jak i zwierzęcych, jednak proces ich dojrzewania w obu typach komórek jest wyraźnie różny. W przypadku komórek ludzkich wyróżnić można trzy podstawowe etapy tworzenia miRNA. W pierwszym, enzym o nazwie Drosha wycina z pri-miRNA dwuniciowy fragment przyjmujący strukturę typu spinki do włosów. W drugim etapie nowo powstała 50-80 nukleotydomowa cząsteczka zwana pre-miRNA transportowana jest z jądra komórkowego do cytoplazmy przez eksportynę 5. W trzecim etapie pre-miRNA rozpoznawany jest przez Dicer, który wycina z niego 20-23 nukleotydomowe jednociowe miRNA. miRNA włączany jest do kompleksu RISC, w którym pełni analogiczną funkcję jak jedna z nici siRNA (4).

Z przedstawionych powyżej faktów wynika, iż srRNA mogą wpływać na każdy z etapów procesu ekspresji informacji genetycznej (ryc. 1). Sytuacja taka ma jak się wydaje miejsce w przypadku roślin i niektórych zwierząt np. owadów. U organizmów wyższych w tym ssaków srRNA uczestniczą jedynie w potranskrypcyjnym wyciszaniu genów (siRNA) i wyciszaniu na poziomie translacji (miRNA) (ryc. 2). Obecnie uważa się, iż około 30% ludzkich genów znajduje się pod kontrolą miRNA.

RNAi JAKO SPECYFICZNY MECHANIZM CHRONIĄCY PRZED ZAKAŻENIEM WIRUSOWYM

Wiele obserwacji wskazuje na to, iż RNAi uczestniczy nie tylko w regulacji ekspresji genów, lecz również w obronie komórki przed infekcją wirusową (5,6). Szczególnie silnymi induktorami zjawiska RNAi są wirusy RNA, replikacja ich genomu wymaga bowiem tworzenia długich cząsteczek dwuniciowych. W przypadku wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) dsRNA powstaje zarówno podczas syntezy nici (-), jak i w trakcie replikacji nici (+). Dwuniciowe produkty przejściowe powstające podczas kopiowania wirusowych cząsteczek RNA są doskonałym substratem dla Dicera. Wytworzone przez niego dwuniciowe siRNA włączane są do kompleksu RISC, w którym służą jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznawanie i selektywną degradację wirusowych RNA. Dodatkowo wykazano, iż substratem dla Dicera mogą być również dwuniciowe struktury typu spinki do włosów występujące w obrębie wirusowych RNA, lub częściowo komplementarne transkrypty powstające w oparciu o genomowe cząsteczki zarówno wirusów RNA, jak i DNA. W rezultacie okazało się, iż RNAi może służyć do obrony organizmu nie tylko przed wirusami RNA, ale i przed retrowirusami oraz wirusami DNA (5, 6).

Można zatem zadać pytanie, jak to się dzieje, że pomimo istnienia tak skutecznego mechanizmu obronnego wirus może przetrwać w zainfekowanej komórce, dlaczego nie wszystkie wirusowe RNA ulegają degradacji? Okazuje się, iż w toku ewolucji powstały liczne mechanizmy chroniące wirusowe RNA przed degradacją (6). Na przykład wirusy grypy (A, B i C), wirus ospy, wirus La Crosse podobnie, jak i wiele wirusów roślinnych kodują białka będące supresorami RNAi. Niezwykle ciekawy mechanizm obronny odkryty został u adenowirusów. Kodują one niewielkie około 160 nukleotydowe cząsteczki RNA zwane VA-RNA (ang. *virus-associated RNA*). Wcześniej stwierdzono, iż cząsteczki te są inhibitorami kinazy białkowej PKR odpowiedzialnej za hamowanie translacji w zainfekowanych wirusem komórkach. Przeprowadzone niedawno badania wykazały, iż VA-RNA są także doskonałym substratem zarówno dla enzymu odpowiedzialnego za wycinanie pre-miRNA z pri-miRNA, jak i dla Dicer. Podczas zakażenia cząsteczki te są niezwykle wydajnie syntetyzowane (w każdej komórce powstać może 10^8 cząsteczek VA-RNA), w wyniku czego dochodzi do wysycenia zdolności katalitycznych enzymów uczestniczących w procesie RNAi (Dicer, RISC, eksportyna 5). Białka te nie są więc w stanie uczestniczyć w degradacji innych cząsteczek RNA (6).

UDZIAŁ miRNA W ODDZIAŁYWANIACH WIRUS – GOSPODARZ

Opisane wcześniej badania adenowirusów pozwalały przypuszczać, iż na przebieg infekcji wirusowej mogą wpływać nie tylko siRNA powstające z długich dsRNA, lecz również miRNA zakodowane w genomie wirusa lub gospodarza. Z jednej strony wirus może starać się zapanować nad procesami komórkowymi produkując własne miRNA, z drugiej w genomie gospodarza mogą być zakodowane miRNA hamujące rozwój wirusa. Zgodnie z wyrażonym powyżej poglądem, w krótkim czasie zidentyfikowano co najmniej kilkanaście miRNA kodowanych zarówno przez wirusy DNA, jak i RNA (7-11).

Okazało się, iż ludzki herpeswirus KSHV (ang. *Kaposi's sarcoma-associated virus*) koduje aż 11 miRNA (10,11). Podczas fazy latentnej zakażenia wszystkie mikroRNA podlegają ekspresji na bardzo niskim, trudno wykrywalnym poziomie. Analiza bioinformatyczna pozwoliła zidentyfikować kilka genów, których produkty transkrypcji mogą być cząsteczkami docelowymi dla tych miRNA. Na tej podstawie autorzy badań postawili hipotezę, że miRNA KSHV odgrywają istotną rolę w powstaniu i utrzymaniu utajonej infekcji, jak i w indukowanej przez wirusa onkogenezie (11). W tym samym czasie Pfeiffer i wsp. zidentyfikowali cząsteczki miRNA kodowane przez myszy i ludzki wirus należący do rodziny herpeswirusów (MHV68, HCMV) (10). Zidentyfikowano również 5 miRNA kodowanych przez ludzki cytomegalowirus. Wszystkie one ulegają ekspresji we wczesnym etapie infekcji wirusowej (12).

Opisano również ekspresję kilku wirusowych miRNA w ludzkich komórkach limfocytów typu B zainfekowanych wirusem EBV (*Epstein-Barr virus*). Na podstawie analiz komputerowych stwierdzono, że celem dla tych miRNA mogą być produkty mRNA kodujące białka zaangażowane w podziały komórkowe i apoptozę – specyficzne chemokiny i cytokiny, będące regulatorami transkrypcyjnymi i komponentami ścieżki transdukcji sygnałów komórkowych (9). Pomimo ustalenia, które mRNA są potencjalnym celem dla poszczególnych miRNA, nie ma jak dotąd żadnych danych eksperymentalnych potwierdzających wyniki analizy bioinformatycznej.

Jedynie w przypadku miRNA kodowanych przez wirus SV40 (*simian virus 40*) udało się poznać funkcję, jaką pełnią one w cyklu replikacyjnym wirusa (13). Analiza bioinformatyczna wykazała, iż miRNA wirusa SV40 są całkowicie komplementarne do wczesnych transkryptów wirusowych kodujących antygeny nowotworowe „T” i „t”. Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły powyższą hipotezę wykazały bowiem, iż wirusowe RNA są cięte jedynie w przypadku zakażenia wirusem typu dzikiego. Do degradacji transkryptów nie dochodziło u mutanta posiadającego zaburzoną strukturę pre-miRNA. Ponadto stwierdzono, że gromadzące się na późnym etapie infekcji miRNA SV40, powodują obniżenie poziomu wirusowego antygeny T, ale nie wpływają na poziom akumulacji cząstek wirusowych. Wydaje się, że poprzez obniżenie poziomu antygeny T zredukowana zostaje wrażliwość wirusa na cytotoksyczne limfocyty T oraz na komórkowe cytokiny. Zaobserwowany u SV40 mechanizm regulacji ekspresji genów stanowi doskonały przykład, w jaki sposób wirus może wykorzystać miRNA, by wymknąć się spod kontroli systemu obronnego organizmu gospodarza (13).

Kolejny, niezwykle ciekawy przypadek wykorzystania miRNA do regulacji cyklu replikacyjnego wirusa został niedawno odkryty u wirusa HCV (14). Stwierdzono, iż do jego efektywnej replikacji potrzebny jest tkankowo-specyficzny miRNA (miR-122) występujący w komórkach wątroby. Szczegółowsze badania pozwoliły ustalić, że miR-122 oddziałuje z niekodującym 5'-końcowym fragmentem genomowej cząsteczki HCV. Jest to jedyny poznany dotąd przypadek, by w komórkach zwierzęcych lub ludzkich miRNA regulował poziom akumulacji RNA poprzez oddziaływanie z końcem 5'. Zwykle w oddziaływania z miRNA zaangażowany jest koniec 3' mRNA. Jeszcze bardziej niezwykła i równie unikalna była obserwacja, iż oddziaływanie genomowej cząsteczki HCV z miRNA nie prowadzi do jej degradacji, a wprost przeciwnie do wzrostu poziomu jej akumulacji. Ponadto nie stwierdzono, aby obecność lub brak miR-122 zmieniał wydajność syntezy białek wirusowych. Autorzy opisanych badań sugerują więc, iż miR-122 wpływa korzystnie na oddziaływanie genomowej cząsteczki HCV z wirusowym kompleksem replikacyjnym (14).

W ostatnim czasie zidentyfikowano także komórkowy miRNA, który w przeciwieństwie do miR-122 jest negatywnym regulatorem poziomu akumulacji wirusowych RNA (7). Stwierdzono, że jeden z ludzkich miRNA (miR-32) ogranicza replikację retrowirusa PFV-1 (ang. *primate foamy virus type 1*) w kulturach komórek ludzkich. Ustalono, iż miR-32 oddziałuje z fragmentem kodującym genomu wirusowego powodując jego degradację. Dodatkowo odkryto, że PFV-1 chcąc ochronić swój genom przed degradacją wytwarza białko Tas będące supresorem RNAi (7).

PODSUMOWANIE

Odkrycie zjawiska RNAi oraz małych regulatorowych RNA (siRNA i miRNA) radykalnie zmieniło nasze spojrzenie na wiele procesów zachodzących w organizmach żywych, w tym także na zakażenia wirusowe. Stwierdziliśmy, iż oddziaływanie pomiędzy wirusem a gospodarzem mogą być zdecydowanie bardziej skomplikowane niż wcześniej można było przypuszczać. Równocześnie jednak zaczęliśmy lepiej rozumieć molekularne uwarunkowania procesu replikacji cząstek wirusowych, czy komórkowe mechanizmy obronne. Kolejnym niezwykle istotnym rezultatem dokonanych odkryć było otwarcie całkowicie nowych perspektyw w zakresie leczenia chorób wirusowych. Wykazano na przykład, iż

wprowadzając do zakażonych komórek syntetyczne siRNA można wyraźnie ograniczyć, a w niektórych przypadkach nawet całkowicie zahamować replikację wirusa. To niezwykle istotne spostrzeżenie dotyczy także szczególnie groźnych wirusów, w przypadku których stosowane dotąd metody leczenia okazały się mało skuteczne. Między innymi zidentyfikowano szereg siRNA inhibujących replikację wirusa HCV (15).

Niezwykle istotne dla stworzenia nowych sposobów leczenia HCV są także obserwacje dotyczące oddziaływań genomu wirusowego z miR-122. Wydaje się, że ta niewielka cząsteczka RNA lub kodujący ją gen, już niedługo staną się celem dla różnego typu środków przeciwwirusowych. Dodatkowo dalsze badania miR-122 pozwolą nam lepiej zrozumieć mechanizm molekularny procesu replikacji wirusowych RNA i być może wyjaśnią, dlaczego optymalnym miejscem replikacji HCV są komórki wątroby. Jednak niezależnie od tego, jaka będzie odpowiedź na to pytanie, już dziś możemy być pewni, że najbliższe lata przyniosą nam wiele fascynujących i zaskakujących informacji dotyczących udziału srRNA w takich procesach, jak replikacja lub translacja wirusowych RNA.

M Figlerowicz, A Tyczewska, M Figlerowicz

THE INFLUENCE OF SMALL REGULATORY RNAs ON THE VIRAL INFECTION
– NEW STRATEGIES IN HCV THERAPY

SUMMARY

The discovery of the RNAi phenomenon drastically changed our thinking about the mechanisms affecting the expression of genetic information. It demonstrated that not only proteins but also small regulatory RNAs (srRNAs) are the key players in this process. In addition, it was shown that srRNAs can influence viral infections. They are able to mediate viral RNA degradation or to inhibit viral RNA replication and translation. The collected data suggest that srRNAs will soon become an important tool in our struggle with viruses.

PIŚMIENNICTWO

1. Hannon GJ. RNA interference. *Nature* 2002; 11: 244-51.
2. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homolous genes in trans – *Plant Cell* 1990; 2: 279-289.
3. Fire A, Xu S, Montgomery MK, i in. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-811.
4. Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
5. Silva IM, Hammond SM, Hannon GJ. RNA interference: a promising approach to antiviral therapy? *Trends Mol Med.* 2002; 8: 505-508.
6. Schutz S, Sarnow P. Interaction of viruses with the mammalian RNA interference pathway. *Virology* 2006; 344: 151-157.
7. Lecellier CH, Dunoyer P, Arar K, i in. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005; 308: 557-560.
8. Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J. Virol.* 2005; 79: 7371-7379.
9. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, i in. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304: 734-736.

- 10 Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, i in. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat. Methods* 2005; 2: 269-276.
11. Cai X, Lu S, Zhang Z. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus expresses an array of viral microRNAs in latently infected cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 5570-5575.
12. Grey F, Antoniewicz A, Allen E, i in. Identification and characterization of human cytomegalovirus-encoded microRNAs. *J. Virol.* 2005; 79: 12095-12099.
13. Sullivan CS, Grundhoff AT, Tefethia S, i in. SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells. *Nature* 2005; 435: 682-686.
14. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, i in. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science* 2005; 309: 1577-1581.
15. Kapadia SB, Brideau-Andersen A, Chisari FV. Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 2014-2018.

Otrzymano: 11.07.2006 r.

Adres do korespondencji:

Prof. dr hab. Marek Figlerowicz
Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań
tel.: 0618528503 w. 142, 103, 249
e-mail: marekf@ibch.poznan.pl