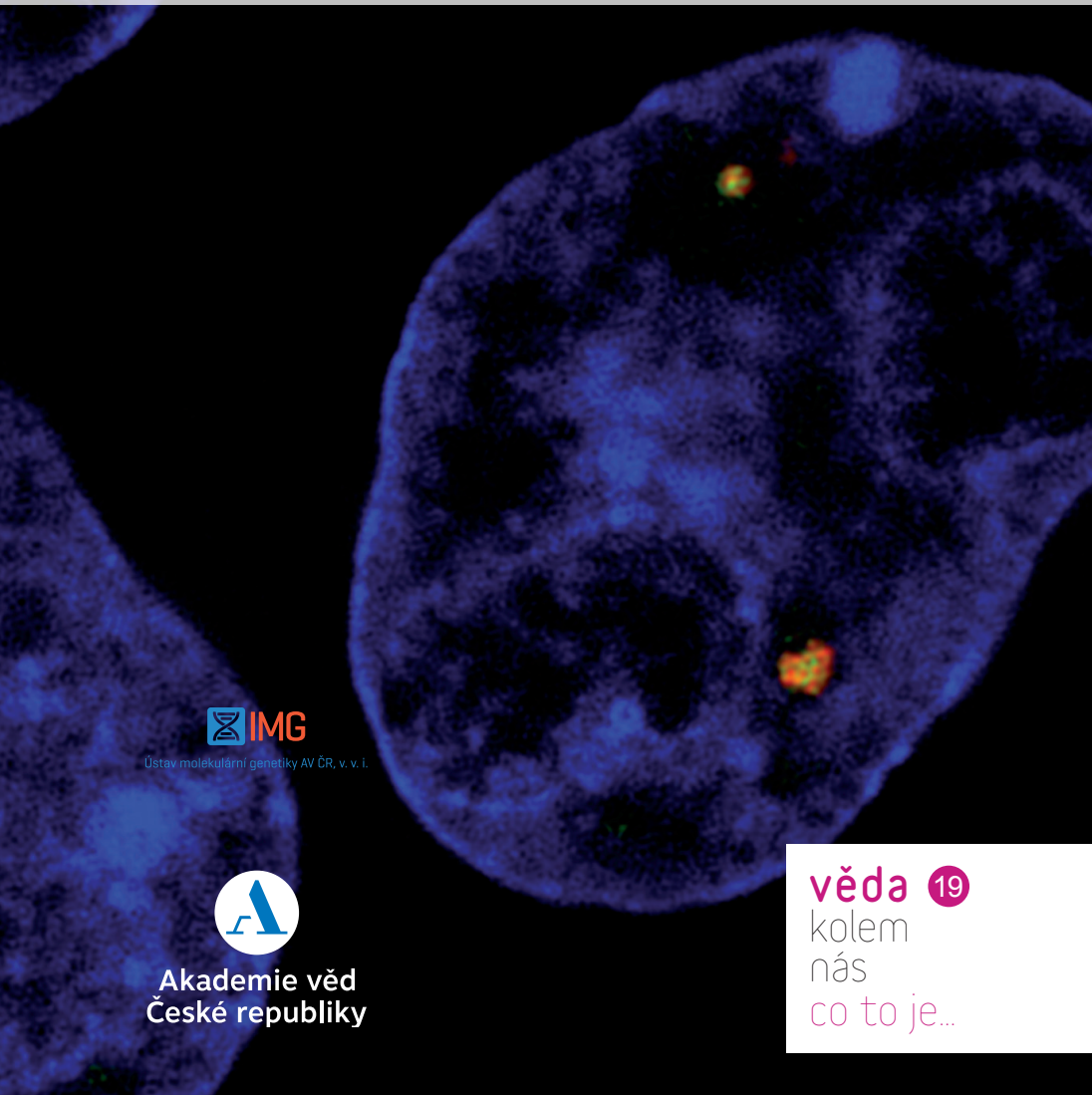
RNA – temná hmota v našich buňkách



IMG
Ústav molekulární genetiky AV ČR, v. v. i.

Akademie věd
České republiky

věda 19
kolem
nás
co to je...

Historie **Ústavu molekulární genetiky AVČR, v. v. i.** (ÚMG) se odvíjí od Oddělení experimentální biologie a genetiky Biologického ústavu ČSAV, jehož vedoucím byl od roku 1953 Milan Hašek, spoluobjevitel imunologické tolerance.

V roce 1962 byl založen Ústav experimentální biologie a genetiky ČSAV (ÚEBG), jehož ředitelem byl až do roku 1970 Milan Hašek. Šedesátá léta 20. století jsou asi nejslavnější kapitolou ústavu – v té době se zrodila „československá imunogenetická škola" reprezentovaná kromě Haška jmény jako Pavol a Juraj Iványi, Jan Klein, Tomáš Hraba, Ivan Hilgert, Věra Hašková, Alena Lengerová a další. Je všeobecně známo, že Milan Hašek měl blízko k Nobelově ceně (za objev imunologické tolerance byla udělena P. Medawarovi a M. Burnetovi); Pavol Iványi se významně podílel na experimentech, za které později dostal Nobelovu cenu Jean Dausset; Jan Klein se po emigraci do USA stal v sedmdesátých letech pravděpodobně nejvýznamnějším světovým imunogenetikem (spoluobjevitelem zásadního imunologického významu MHC proteinů). Na ÚEBG se v té době také výrazně rozvíjel světově prioritní výzkum retrovirů (Jan Svoboda).

V letech 1964–2006 sídlila větší část ústavu v budově Ústavu organické chemie a biochemie ČSAV (ÚOCHB) na Flemingově náměstí v Dejvicích, menší část pak v komplexu biologických ústavů AV ČR v Krči. Důležitou součástí ústavu bylo (a je) také chovné a experimentální zařízení v Kolči (asi 20 km od Prahy).

Konec „pražského jara" po srpnu 1968 znamenal konec této slavné éry – mnozí nadějní mladí pracovníci emigrovali (a velmi úspěšně si vedli na nových působištích), Milan Hašek byl zbaven vedení ústavu, byly drasticky omezeny zahraniční kontakty.

V roce 1977 byl ÚEBG spojen s několika biochemickými laboratořemi ÚOCHB a přejmenován na Ústav molekulární genetiky ČSAV (ÚMG). Za definitivní datum vzniku ÚMG tedy někteří považují teprve tento rok. Ředitelem ÚMG se stal Josef Říman (pozdější dlouholetý předseda ČSAV) a zůstal jím do roku 1991. Od té doby se hlavním tématem ústavu stala molekulární biologie, avšak pokračovaly i dřívější tradiční směry (imunogenetika, retrovirologie, nádorová imunologie), které však také stále více přecházely na molekulární úroveň. Mezi výraznými úspěchy z jinak obtížných sedmdesátých a osmdesátých let lze uvést např. spoluobjevení reverzní transkriptázy (J. Říman), objev virogenie (J. Svoboda) či sekvenování jednoho z prvních virových genomů (V. Pačes).

Po roce 1989 pokračoval na ústavu trend posilování molekulárněbiologických přístupů k řešení tradičních i nově zaváděných problematik. Ředitelem byl Jan Svoboda (1991–1999) a poté Václav Pačes (1999–2005). Po zvolení V. Pačesa předsedou Akademie věd České republiky se v roce 2005 stal ředitelem Václav Hořejší.

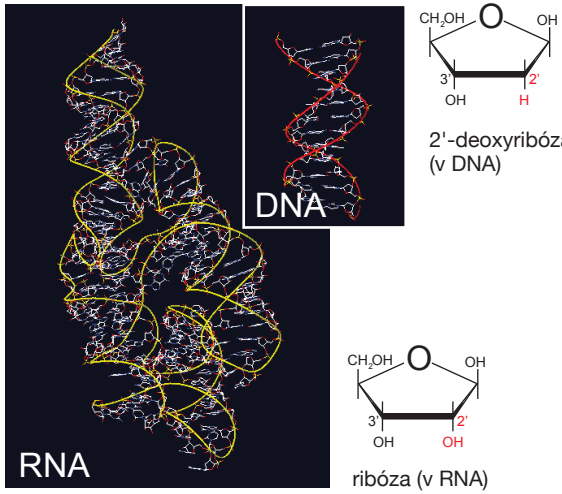
RNA – temná hmota uvnitř našich buněk

RNA neboli ribonukleová kyselina je jednou z klíčových molekul v našich buňkách. Byla poprvé popsána na začátku 20. století, kdy si chemici pracující s nukleovými kyselinami uvědomili chemické rozdíly mezi DNA a RNA. Zpočátku se jí nedostávalo takové pozornosti jako její větší sestře DNA, která je nositelkou dědičné informace. Intenzivněji se RNA začala studovat až v šedesátých letech 20. století, kdy Francis Crick postuloval základní biologické dogma, které definuje tok informace v živých organizmech ve směru DNA → RNA → protein. RNA se, podobně jako DNA, skládá ze stavebních kamenů, kterým se říká **nukleotidy**. Ty jsou tvořeny vždy jednou ze čtyř základních bází (u RNA jsou to adenin, uracil, guanin a cytosin, viz obr. 1b), cukrem ribózou a fosfátovou skupinou. Nukleotidy se v RNA řadí za sebou a tvoří lineární řetězec. Hlavní rozdíl mezi DNA a RNA je hydroxylová skupina (-OH) na 2' uhlíku ribózy v RNA, která v nukleotidech tvořících DNA chybí. Jak uvidíme později, tato 2'-OH skupina hraje důležitou roli v chemických reakcích, kterých se RNA účastní. RNA molekuly také zaujímají daleko různorodější tvary než DNA. Zatímco nejznámější a zdaleka nejčastější formou DNA je dvojitá šroubovice, tak RNA molekuly vytvářejí vlásenky, smyčky, dvojité a trojité šroubovice (obr. 1). Buňky této flexibility využívají a RNA molekuly slouží k nejrůznějším úkolům: od strukturních molekul, které tvoří základ buněčných organel, přes RNA molekuly, které kontrolují a regulují výrobu bílkovin, až po RNA molekuly, které katalyzují nejrůznější chemické reakce.

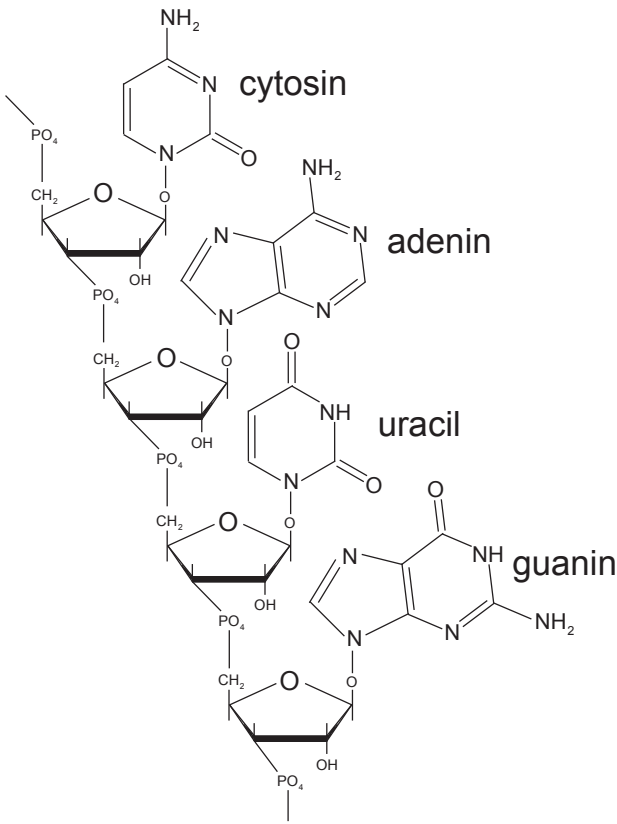
Přenos informace od DNA k bílkovině

Asi nejznámější funkcí RNA je přenos informace mezi DNA a proteinem. K tomu slouží molekula, která se nazývá **mRNA** (z anglického *messenger* = posel). Česky se překládá jako mediátorová RNA. V eukaryotických buňkách (tedy i těch našich, lidských), se mRNA vyrábí v buněčném jádře a po nezbytných úpravách (včetně sestřihu, viz níže) je dopravena do cytoplazmy, kde slouží jako předloha (templát) pro výrobu bílkovin. Rozložení mRNA v našich buňkách je vidět na obr. 2.

Na první pohled by se mohlo zdát, že přenášet informaci z jednoho místa na druhé je poměrně nudná záležitost. Na konci sedmdesátých let se ale ukázalo, že jednoduchá rovnice při přenosu informace DNA → RNA → protein platí jen v bakteriích. V eukaryotických buňkách je informace v DNA pro výrobu bílkovin fragmentována a musí se nejdříve správně poskládat. V drtivé většině lidských genů kódujících proteiny jsou relativně krátké sekvence DNA obsahující informaci pro syntézu proteinu (exony) odděleny až 10× delšími sekvencemi, které (většinou) žádnou informaci nenesou (introny). Informace v DNA je nejdříve kompletně přepsána do prekurzorové mRNA (pre-mRNA) a teprve vystřižením intronů a spojením exonů se vytvoří mRNA, která pak slouží jako templát pro výrobu bílkoviny (obr. 3). Vyjmutí intronů a složení exonů (tzv. pre-mRNA sestřih) musí proběhnout s naprostou přesností, protože chyba a posunutí i jen o jeden nukleotid má za následek výrobu špatného, v některých případech i toxického proteinu.



Obr. 1a Vlevo ukázka komplexní struktury RNA (RNáza P) a vpravo pro porovnání ukázka dvoušroubovice DNA (hydroxylová skupina chybějící v DNA je vyznačena červeně)

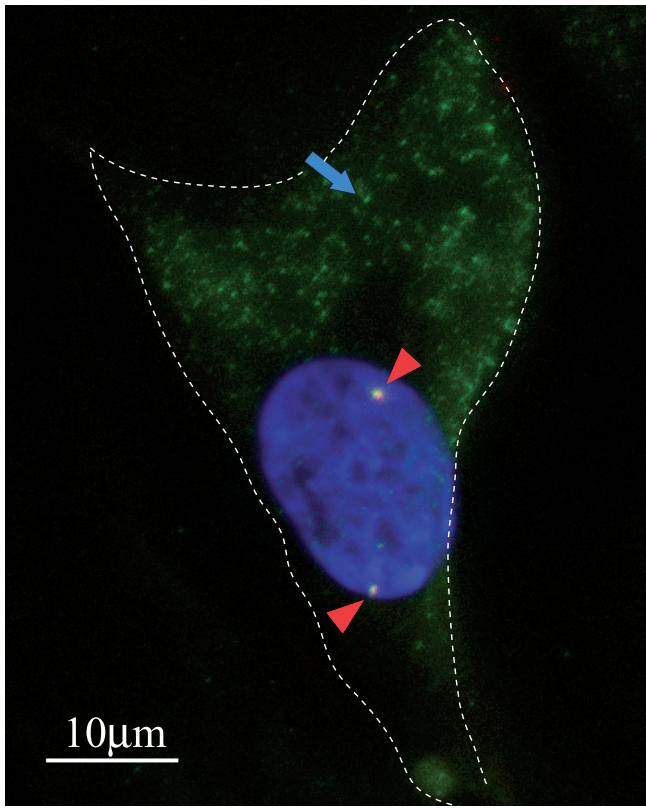


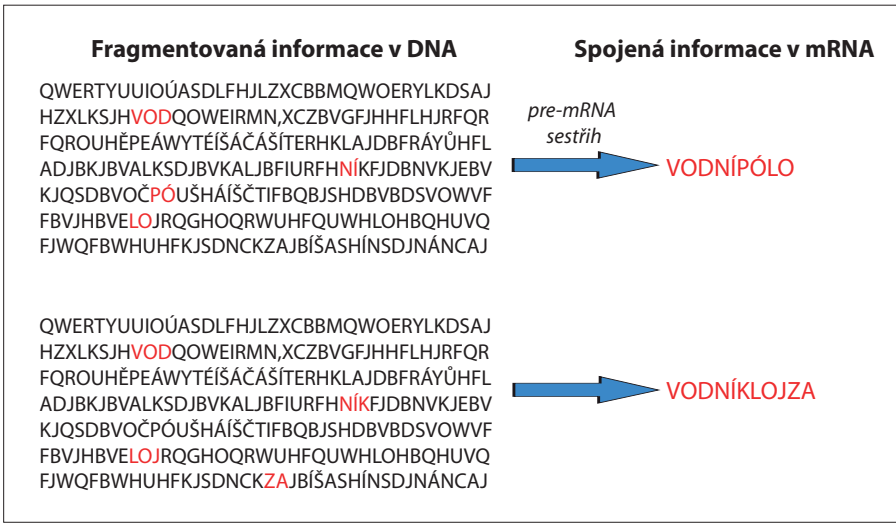
Obr. 1b Ukázka čtyř bází spojených přes ribózu a fosfát do řetězce RNA

Existuje několik teorií, proč naše geny obsahují introny. Jedna z nich předpokládá, že v dávných dobách byli předchůdci dnešních eukaryotických organizmů podrobeni silné invazi mobilních pra-intronů, které se vkládaly do jejich DNA. Po přepisu do mRNA se introny dokázaly „vystřihnout", buňky je přepsaly do DNA, která se vložila do genomu na jiném místě, a tak zaplavily genom. Aby naši buněční předchůdci přežili, vytvořili si jako obranu aparát, který tyto invazivní agresory z RNA odstranil. Jako připomínku této invaze nacházíme v některých organizmech introny, které se stále dokáží samy vystřihnout (viz níže v kapitole o katalyticky aktivních RNA).

Otázkou zůstává, proč během následující evoluce nebyly tyto invazivní sekvence odstraněny a proč dnes tvoří čtvrtinu naší DNA. Tyto elementy musí být při každém buněčném dělení replikovány a při každém přepisu genu přepsány do

Obr. 2 Ukázka rozložení mRNA v lidské buňce (fibroblast). pre-mRNA je syntetizována v buněčném jádře, které je nabarveno modře; pre-mRNA je syntetizována v místě, kde se nachází gen, který ji kóduje (žluté tečky označené červenými šipkami). Po syntéze a pre-mRNA sestřihu je hotová mRNA dopravena do cytoplazmy, kde slouží pro výrobu proteinů. Modrou šipkou je označena mRNA v cytoplazmě (obarvena zeleně). Buněčné okraje jsou naznačeny bílou přerušovanou čárou. Měřítko v levém dolním rohu ukazuje 10μm (Dr. Eva Kozáková, Oddělení biologie RNA, ÚMG AV ČR)





Obr. 3 Ukázka, jak je informace pro výrobu proteinu uložena v DNA (vlevo) a v konečné mRNA (vpravo). Na tomto příkladu je též ukázáno, jak může být stejná informace v DNA různě přeložena a vyrobeny odlišné mRNA

pre-mRNA, aby hned nato byly odstraněny. To pro buňky představuje ohromnou energetickou zátěž, což znamená, že udržování intronů v genomu musí představovat nějakou evoluční výhodu, jinak by již byly během vývoje organizmů eliminovány. Definitivní odpověď na tuto otázku neznáme, ale ukazuje se, že fragmentovaná informace poskytuje větší flexibilitu při přenosu informace z DNA do proteinů. Naše buňky jsou schopné jednotlivé fragmenty různě kombinovat a díky tomu vyrábět pozměněné proteiny, aniž by musely měnit informaci uloženou v DNA. Asi nejlépe toto kombinování exonů, kterému se říká **alternativní pre-mRNA sestřih**, dokumentuje obr. 3, kdy jiným složením kódujících sekvencí vzniknou z identické původní informace dvě různé zprávy. Buňky tak mohou relativně „levně“ testovat nové varianty bílkovin.

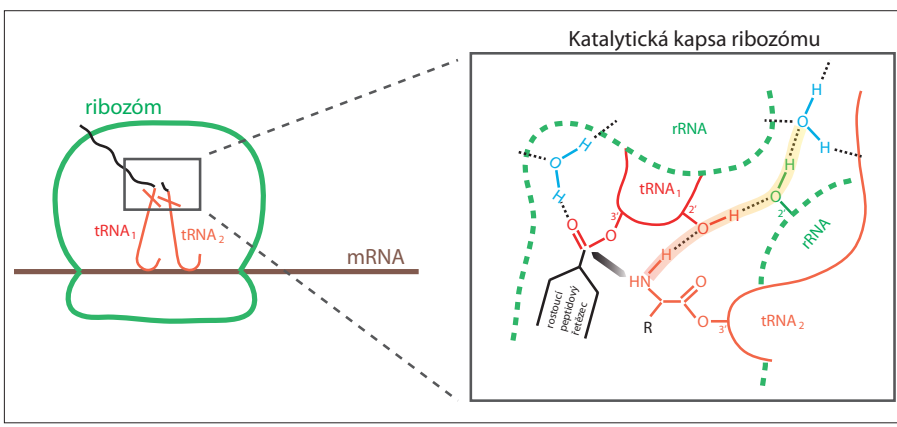
Alternativní pre-mRNA sestřih kontroluje řada faktorů. Jsou to primárně proteiny, které se na pre-mRNA váží. Tyto proteiny slouží jako jakési majáky, které navigují sestřihový aparát a určují tak, který exon bude do konečné mRNA vložen a který naopak přeskočen. Ale výzkumy v posledních pěti letech naznačují, že o alternativním pre-mRNA sestřihu je částečně rozhodnuto ještě před započetím pre-mRNA syntézy. Jak je to možné? Naše DNA je obalena a chráněna proteiny, kterým se říká histony. Tyto proteiny jsou označkovány pomocí malých molekul, většinou přidáním methylové (-CH_3) nebo acetylové (CH_3-CO-) skupiny. Tyto značky pomáhají buňce při orientaci ve třech miliardách nukleotidů, ze kterých se naše DNA skládá, a pomáhají například určit, kde začíná a končí gen, který gen má být přepsán a který naopak umlčen a podobně. Výzkumy posledních let, na kterých se podílela i naše skupina na Ústavu molekulární genetiky, ukazují, že histony jsou jinak modifikovány na DNA kódující exony, které mají být vloženy do finální mRNA, a jinak na DNA kódující exony, které mají být přeskočeny. Jak buňky „vědí“, který

exon má být přeskočen a který vložen, je záhadou stejně jako mechanizmus, jakým značky na histonech ovlivňují alternativní pre-mRNA sestřih. To, jak buňky rozhodnou, kterou variantu mRNA vyprodukují, je předmětem intenzivního zkoumání a domnívám se, že v této oblasti je toho stále více, co nevíme, než toho, co víme. Ukazuje se též, že chyby v pre-mRNA sestřihu jsou v pozadí mnoha genetických chorob, a tak výzkum v pre-mRNA sestřihu může v budoucnu pomoci při pochopení a eventuální léčbě genetických poruch.

Ribozomální a transferové RNA – sehraná parta pro výrobu proteinů

Přes jejich důležitost pro přenos informace pro syntézu bílkovin tvoří mRNA jen malé procento celkové RNA v našich buňkách. Zdaleka nejhojnější RNA molekuly (přibližně 80 % celkové buněčné RNA) jsou ribozomální RNA (**rRNA**), které tvoří jádro ribozómů. Ribozómy jsou ohromné komplexy čtyř rRNA a několika desítek proteinů, které jsou schopné, za pomoci transferových RNA (**tRNA**), „přečíst" informaci uloženou v mRNA a vyrobit podle ní určenou bílkovinu. Na přelomu druhého a třetího tisíciletí se v několika laboratořích podařilo zjistit vnitřní uspořádání ribozómu a k velkému překvapení se ukázalo, že aktivní místo, kde dochází ke spojení aminokyselin při syntéze proteinu, je tvořeno téměř výhradně rRNA. Ve světě molekulární biologie, kde enzymatická aktivita je, až na výjimky, o kterých budu psát níže, svěřena proteinům, to bylo překvapení. Později se ukázalo, že rRNA slouží hlavně k správné orientaci tRNA a na nich navázaných aminokyselin a hlavním činitelem, který katalyzuje syntézu proteinů, je výše zmiňovaná 2'-OH skupina v ribóze tRNA. Nejnovější výsledky z roku 2014 ukazují, že nukleotidy rRNA v okolí aktivního místa ribozómu pomáhají rozložit elektrický náboj tak,

Obr. 4 Model aktivního místa ribozómu, kde dochází k syntéze bílkoviny. Na zvětšenině je naznačeno rozložení náboje z dusíku v aminokyslině atakujícího uhlík, na kterém je pověšen rostoucí peptidový řetězec (nukleofilní atak je naznačen šedivou šipkou, rozložení náboje a participující chemické skupiny oranžovo-žlutou čárou). Povšimněte si participujících -OH skupin pocházejících z tRNA a rRNA. Molekuly vody jsou označeny modře (upraveno Polikanov et al. 2014, Nat. Struct. Mol. Biol.)



Obr. 5 Setkání vědeckých skupin sdružených v Centru excelence pro RNA biologii v Želivu v roce 2013

Obr. 6 RNA klub 2014 – diskuze nad výsledky

aby katalýza 2'-OH skupinou byla co nejúčinnější (obr. 4). Takže všechny bílkoviny v našem těle byly vyrobeny vzornou spoluprací mRNA, která poskytuje program pro výrobu, tRNA, které tento program čtou, a rRNA, které vytvářejí ideální prostředí pro rychlou a přesnou syntézu bílkovin.

Výzkum RNA v České republice

Počet vědců zabývajících se různými aspekty RNA biologie je v České republice poměrně vysoký a naše země je v komunitě vědců, kteří RNA studují, velmi pozitivně vnímána. Kvalita RNA výzkumu byla ohodnocena i Grantovou agenturou ČR, která grantově podpořila vytvoření Centra excelence pro RNA biologii. Čeští vědci studující RNA se každoročně setkávají na vědecké konferenci „RNA klub", jejíž tradici založil v roce 2003 Dr. Martin Pospíšek. Vědecký význam této konference stále vzrůstá a v posledních letech na ni pravidelně přijíždějí prezentovat své výsledky i vědci z okolních zemí.

Mnoho skupin, které zde nemohu pro jejich počet vyjmenovat, zkoumá změny v genové expresi během různých stadií zárodečného vývoje a během nemocí, hlavně při rakovinném bujení. Zde bych chtěl hlavně zmínit vědecké skupiny, které studují RNA jako takovou. Na Ústavu molekulární genetiky AV ČR je to naše skupina, v níž studujeme skládání snRNA do komplexů důležitých pro pre-mRNA sestřih, regulaci alternativního pre-mRNA sestřihu a chyby při skládání sestřihové mašinerie, které způsobují dědičnou degeneraci oční sítnice – *retinitis pigmentosa*. Dále je zde skupina doc. Petra Svobody, který se intenzivně zabývá rolí miRNA a siRNA během přeprogramování oplodněných vajíček na pluripotentní zárodečné buňky během raného embryonálního vývoje. Další skupiny působí jak v rámci Akademie věd, tak univerzit v Praze, Brně a Českých Budějovicích. Na Mikrobiologickém ústavu AV ČR působí skupiny Dr. Libora Krásného, který studuje regulaci bakteriální RNA polymerázy pomocí nekódující RNA, Dr. Bronislava Večeřka, který studuje krátké regulační RNA v bakteriích, ing. Jiřího Vohradského, který používá matematické modelování a bioinformatickou analýzu pro předpovědi týkající se struktury a funkce RNA, a Dr. Leoše Valáška, jehož tým zkoumá regulaci translace mRNA do proteinu. V Brně na Biofyzikálním ústavu AV ČR skupina prof. Jiřího Šponera modeluje RNA struktury a v Českých Budějovicích na Parazitologickém ústavu AV ČR skupina vedená prof. Juliem Lukešem studuje editování mRNA v parazitu *Trypanosoma brucei*, který způsobuje spavou nemoc. Několik skupin na Ústavu organické chemie a biochemie AV ČR (prof. Michal Hocek a Ing. Ivan Rosenberg, Dr. Zlatko Janeba, Dr. Marcela Krečmerová a Dr. Radim Nencka) se zabývá syntézou a studiem vlastností modifikovaných nukleotidů a nukleosidů a z nich složených nukleových kyselin. Na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy působí pod vedením doc. Petra Folka a doc. Františka Půty vědecká skupina studující pre-mRNA sestřih v kvasinkách a Dr. Martin Pospíšek vede tým, který zkoumá regulaci translace kvasinkové a virové RNA. Na 1. lékařské fakultě Univerzity Karlovy studuje prof. Ivan Raška a jeho tým regulaci syntézy rRNA a Dr. Christian Lanctôt a doc. Dušan Cmarko syntézu RNA v kontextu buněčného jádra. Na brněnské Masarykově univerzitě v rámci projektu CEITEC zkoumá doc. Štěpánka Vaňáčová a její tým řízenou degradaci RNA a skupina pod vedením doc. Richarda Štefla se zabývá strukturou RNA a bílkovin, které jsou důležité pro syntézu RNA. Na stejné univerzitě se skupina vědců vedená Dr. Peterem J. Lukavskym orientuje na strukturu bílkovin rozpoznávajících specifické RNA sekvence.

Nejen proteiny katalyzují chemické reakce – na scénu přicházejí ribozymy, riboswitche, aptamery

To, že RNA molekuly jsou schopné katalyzovat chemické reakce, nebylo ale v roce 2000 již takové překvapení. V roce 1989 byla udělena Nobelova cena za chemii dvěma biochemikům, Sydney Altmanovi a Thomasi Czechovi, kteří objevili a popsali katalyticky aktivní RNA, tzv. **ribozymy**. První zmiňovaný ji dostal za popsání RNA (RNáza P), která štěpí tRNA (toto štěpení je nezbytné pro správnou funkci tRNA). Thomas Czech popsal introny v RNA nálevníka *Tetrahymena termophila*, které jsou schopné vyštěpit samy sebe. Od té doby bylo objeveno mnoho RNA, které mají katalytické vlastnosti (hlavně štěpení RNA), a další katalyticky aktivní RNA molekuly byly připraveny uměle v laboratořích. Mnoho katalyticky aktivních RNA se nachází v RNA virech a viroidech, kde slouží k finálnímu štěpení virové RNA před jejím zabalením do virové kapsule. Díky své struktuře, která připomíná kladivo, se tyto ribozymy nazývají *hammerhead* (doslovný překlad z angličtiny by zněl „hlava kladiva“).

Objev katalyticky aktivních RNA přispěl i k novému pohledu na raný vznik života. Vyjma některých retrovirů uchovávají všechny současné organizmy genetickou informaci v DNA, která má téměř nulový katalytický potenciál. Na druhé straně jsou bílkoviny, které umí katalyzovat spoustu chemických reakcí, ale jejich možnosti uchovávat a předávat dědičnou informaci z generace na generaci jsou minimální. A náhle se objevila molekula RNA, která je schopná, podobně jako DNA, uchovávat a předávat genetickou informaci a zároveň katalyzovat různé chemické reakce. To vedlo k teorii „**RNA světa**“, tedy hypotetických prehistorických buněk, v nichž RNA molekuly uchovávaly a předávaly z generace na generaci genetickou informaci a zároveň katalyzovaly chemické reakce nezbytné pro život. Tím by se vyřešil problém, jestli byla dřív slepice (DNA) nebo vejce (bílkoviny). S postupem času se uchování genetické informace přeneslo z RNA na DNA, která je pro ten účel vhodnější díky své větší chemické stabilitě. A proteiny převzaly většinu katalytických a dalších buněčných funkcí, pro které se lépe hodí. Klíčovou molekulou pro fungování RNA světa je molekula RNA, která katalyzuje syntézu RNA a tak je schopna kopírovat sama sebe a zároveň vyrábět jiné RNA. Tato molekula se intenzivně hledá a před třemi lety se podařilo připravit ribozym, který nasyntetizoval řetězec RNA dlouhý 95 nukleotidů! A vývoj nových ribozymů pokračuje, takže i na tomto poli se pravděpodobně dočkáme nových a překvapujících objevů.

Kromě katalytické aktivity jsou RNA molekuly schopné „vnímat“ různé malé molekuly, např. aminokyselinu glycin. Tyto malé molekuly se váží na speciální RNA, kterým se anglicky říká „**riboswitch**“, a mění jejich strukturu. Riboswitche jsou často nacházeny v bakteriálních mRNA, kde fungují jako biosenzory reagující na koncentraci dané malé molekuly v bakterii a podle toho zapínají nebo vypínají produkci bílkovin nutných pro syntézu této malé molekuly (obr. 7).

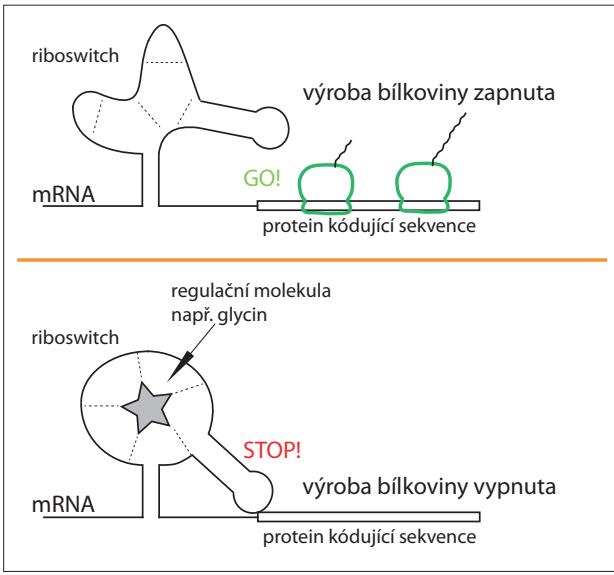
A jako mnohokrát v historii vědy, i zde si lidé vzali příklad z přírody (konkrétně z výše popsaných přirozených RNA biosenzorů) a začali připravovat umělé RNA a DNA molekuly – **aptamery** (z latinského *aptus* – schopný, připojený a řeckého *meros* – část), které rozpoznávají různé malé molekuly (např. cukry, aminokyseliny,

Výzkum RNA ve světě

Na celém světě zkoumají RNA tisíce vědců, počínaje biofyziky a organickými chemiky a konče buněčnými a vývojovými biology a neurobiology. Tito vědci se každoročně setkávají na vědecké konferenci o RNA, jejíž 19. ročník proběhl v tomto roce v Quebeku. Je dobré vědět, že v posledních letech jsou čeští vědci pravidelnými účastníky a jejich příspěvky jsou vybírány pro přednášky, což jistě svědčí o kvalitě našeho výzkumu. Navíc na základě návrhu doc. Petra Svobody byla Praha vybrána jako místo konání této největší mezinárodní konference o RNA v roce 2017 – jde o významné ocenění české vědy.

Jakýkoliv pokus o výčet všech vědeckých skupin zkoumajících RNA je téměř nemožný, řada vědců byla za svůj výzkum RNA oceněna Nobelovou cenou. Toto ocenění získávají bezesporu ti, kteří se výrazně zasloužili o výzkum ve svém oboru. Avšak je třeba mít na paměti, že na spoustu dalších skvělých vědců, jejichž zásluhy jsou stejné jako laureátů Nobelovy ceny, se nedostane...

1957	Alexander R. Todd (Velká Británie) – za výzkum struktury a syntézy nukleosidů a nukleotidů, které jsou základními stavebními kameny RNA
1959	Severo Ochoa (Španělsko, USA) – za objev RNA polymerázy, která přepisuje DNA do RNA
1968	Robert W. Holley (USA), Har G. Khorana (Indie, USA) a Marshall W. Nirenberg (USA) – za rozluštění genetického kódu (jakým způsobem je přeložena informace v mRNA do pořadí aminokyselin v bílkovině)
1975	David Baltimore (USA) a Howard M. Temin (USA) – za objev reverzní transkriptázy, která přepisuje RNA zpátky do DNA, což je nezbytný krok při replikaci retrovirů
1980	Walter Gilbert (USA) – za objev sekvenační metody DNA. Tento vědec také navrhl koncept „RNA světa" jako možného počátku živých organizmů na Zemi
1989	Sidney Altman (USA, Kanada) a Thomas Czech (USA) – za objev katalyticky aktivních RNA molekul
1993	Richard J. Roberts (Velká Británie) a Philip A. Sharp (USA) – za objev intronů a fragmentace genů (pre-mRNA sestřih)
2006	Roger D. Kornberg (USA) – za rozluštění struktury RNA polymerázy II, která přepisuje informaci uloženou v DNA do pre-mRNA (Nobelova cena za chemii)
2006	Andrew Z. Fire (USA) a Craig C. Mello (USA) – za objev RNA interference pomocí krátkých RNA: miRNA a siRNA (Nobelova cena za fyziologii a medicínu)
2009	Ada E. Yonath (Izrael), Thomas A. Steitz (USA) a Venkatraman Ramakrishnan (Indie, USA) – za rozluštění vnitřní struktury ribozómu (Nobelova cena za chemii)
2009	Elizabeth Blackburn (Austrálie, USA), Carol W. Greider (USA) a Jack W. Szostak (USA) – za objev telomerázy, která udržuje konce našich chromozomů ve správné délce; podstatnou součástí telomerázového komplexu je RNA (Nobelova cena za fyziologii a medicínu)



Obr. 7 Model, jak navázání malé molekuly (např. glycinu) změní strukturu RNA elementu nazývaného „riboswitch", který následně zastaví výrobu bílkoviny. Zeleně je naznačen ribozóm

dopamin, biotin), ale i velké komplexy (např. viry). Využívá se k tomu proces zvaný *in vitro* selekce připomínající velmi zrychlenou evoluci ve zkumavce. Řekněme, že si přejeme připravit aptamer, který by vázal cukr glukózu. Na začátku je směs, která obsahuje miliony různých, víceméně náhodných RNA řetězců. Tato směs se nalije na glukózu, která je připevněna na nosič, aby neuplavala. Molekuly RNA, které se na glukózu nenavázaly, se odmyjí a ty, které zůstaly navázány, se naopak izolují a zmnoží. Tento krok se opakuje mnohokrát, až na konci zbyde jen pár molekul RNA, které váží glukózu nejsilněji. Tento proces byl ještě vylepšen dalším cíleným mutováním takto vybraných RNA, které vede k doladění schopností aptameru vázat cílovou molekulu. V průběhu posledních 10 let se technologie pro vývoj aptamerů vylepšily natolik, že ve specializovaných laboratořích jsou výzkumníci schopni připravit téměř jakýkoliv aptamer během několika dní. Aptamery nacházejí své uplatnění v lékařské diagnostice, detekci toxinů v potravě a v poslední době i jako léky.

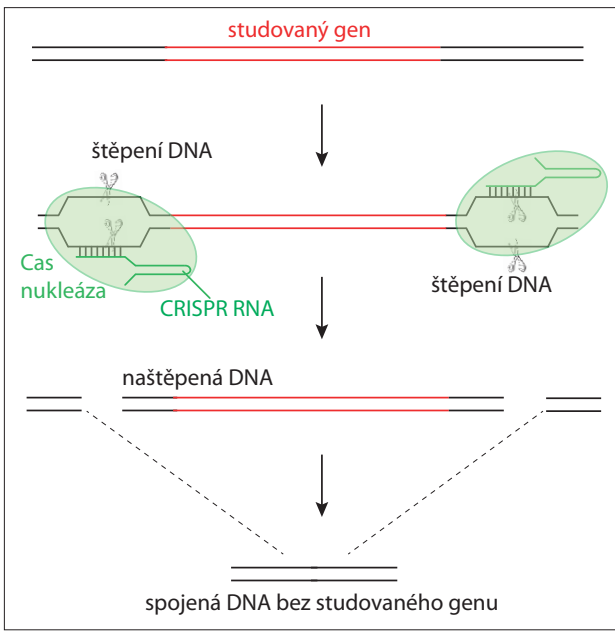
Asi největší boom zažívají v současnosti RNA nazývané **CRISPR**, které se používají pro cílenou manipulaci genů v různých organizmech. CRISPR RNA byly objeveny v bakteriích a archeích, kde jsou společně s enzymem Cas štěpícím DNA součástí imunitní obrany proti fágům. CRISPR RNA a její komplementarita k DNA slouží k navádění Cas nukleázy na DNA, která je následně Cas enzymem rozštěpena. Toho se chopili genetičtí inženýři, kteří hledali nástroj na cílené štěpení DNA v mnohobuněčných organizmech, a adaptovali CRISPR systém na štěpení DNA v eukaryotických buňkách. CRISPR RNA navede nukleázu tak, že naštěpí DNA v okolí studovaného genu. Buňky se snaží naštěpenou DNA opravit a velmi často vynechají studovaný gen (obr. 8). Pokud zjistíte, jaké má organizmus bez tohoto genu problémy, tak můžete začít usuzovat, k čemu tento gen slouží. A to se pomocí CRISPR technologie skutečně daří, což výrazně zrychlilo a zlevnilo přípravu zvířecích modelů umožňujících zkoumat dědičné nemoci, které trápí člověka. Velkou roli

při vývoji této technologie sehrál mladý český vědec Dr. Martin Jínek, který v současnosti pracuje na Curyšské univerzitě. Toto je jeden z mnoha příkladů, kdy zkoumání relativně okrajové záležitosti, jako je obrana bakterií proti DNA fágům, přivedlo vědce k technologii, která jim umožňuje lépe bojovat proti lidským chorobám.

Regulační RNA – žhavé téma současné vědy

Ale vraťme se zpátky do buněk. Největší potenciál RNA se skrývá v jejich regulačních schopnostech, kdy komplexní síť RNA molekul ovlivňuje každý krok při přenosu informace z DNA do proteinu. Hlavní úlohu zde hrají **nekódující RNA**, které se z formálního hlediska rozdělují na dlouhé nekódující RNA (lncRNA z angl. *long non-coding RNA*), které jsou delší než 200 nukleotidů, a krátké nekódující RNA, které se dále rozdělují na krátké jaderné a jadérkové RNA (snRNA z angl. *short nuclear* a snoRNA z angl. *short nucleolar RNA*), mikro RNA (miRNA) a krátké interferující RNA (siRNA z angl. *short interfering RNA*).

Nejdříve bych se chtěl věnovat krátkým nekódujícím RNA (obr. 9, 11): **snRNA** jsou krátké RNA molekuly, které jsou nezbytné pro pre-mRNA sestřih. Jak již bylo napsáno výše, introny jsou nekódující sekvence, které je třeba z pre-mRNA odstranit, a snRNA jsou molekuly, které hrají klíčovou roli v rozpoznání a vyštěpení nekódujících sekvencí a následném spojení kódujících úseků. Jelikož se každou minutu v lidské buňce nasyntetizuje několik tisíc intronů, snRNA se v buňkách nachází ve vysokých koncentracích (10^5–10^6 molekul/buňku). Spekuluje se, že podobně jako u ribozómu je aktivní místo sestřihového komplexu, ve kterém dochází k vyštěpení



Obr. 8 Ukázka, jak je CRISPR systém využíván pro odstranění studovaného genu z DNA. Cas nukleáza a CRSIPR RNA jsou vpraveny do buněk, kde naštěpí DNA v okolí studovaného genu. CRISPR RNA navádí nukleázu na DNA a párování bází mezi CRISPR RNA a DNA určuje, kde bude DNA naštěpena. Buňky DNA opraví a spojí tak, že často vynechají studovaný gen

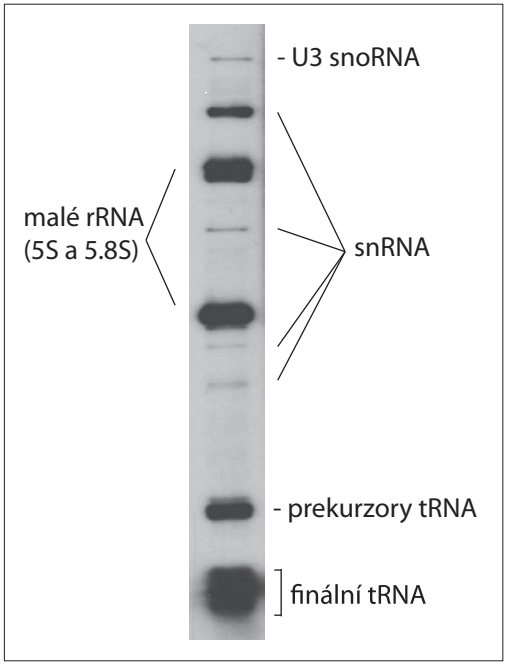
Obr. 9 Ukázka rozložení malých jaderných snRNA v jádře savčích buněk pěstovaných v tkáňových kulturách. DNA je obarvena modře a snRNA červeně, cytoplazma není na tomto obrázku vidět (Mgr. Eva Stejskalová, Oddělení biologie RNA, ÚMG AV ČR)

Obr. 10 Fluorescenční fotka dospělého jedince háďátka *C. elegans* obarveného propidium jodidem, který barví nukleové kyseliny (Dr. Christian Lanctôt, UBBP, 1. LF UK).

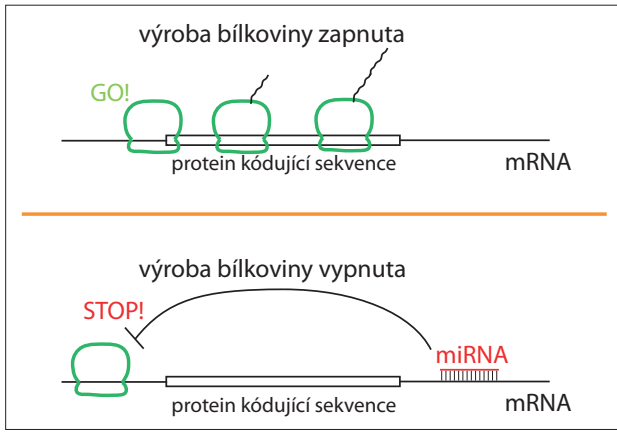
intronů a spojení exonů, tvořeno převážně snRNA. Nicméně na rozdíl od ribozómu, jehož struktura byla vyřešena a role RNA v syntéze bílkovin definitivně prokázána, sestřihový komplex pokusům o určení jeho vnitřní struktury stále odolává. Také snoRNA mají podobnou funkci jako snRNA, ale jejich cílovou molekulou je ribozomální RNA a snoRNA jsou klíčové pro správné vyzrávání rRNA a tvorbu ribozómů. Nejnovější výzkumy naznačují, že snoRNA jsou také nezbytné pro integritu některých organel v buněčném jádře.

Další početnou rodinu krátkých RNA tvoří **miRNA** a **siRNA**, které mají téměř identické funkce a liší se hlavně způsobem, jakým vznikají. Molekuly miRNA a jejich funkce byly objeveny v devadesátých letech 20. století při studiu genové regulace během vývoje háďátka *Caenorhabditis elegans* (obr. 10). Záhy se ukázalo, že miRNA se nacházejí ve většině mnohobuněčných organizmů včetně člověka, a odhaduje se, že v lidském těle je více než tisíc různých miRNA.

Nukleové kyseliny miRNA i siRNA jsou krátké, jen 21–24 nukleotidů dlouhé molekuly RNA, které nasedají na cílovou molekulu mRNA a umlčují její přepis do bílkoviny (obr. 12). V extrémních případech může jejich nasednutí představovat „polibek smrti" a „políbená" mRNA je zničena. Tyto krátké RNA představují mocný nástroj, kterého organizmy využívají pro regulaci výroby bílkovin během zárodečného vývoje a buněčné diferenciace. Špatná funkce miRNA byla nalezena v pozadí některých nádorů. Objev siRNA znamenal též převrat při studiu funkce lidských genů. Díky uměle připravené siRNA jsou vědci schopni rychle a efektivně snížit přímo v buňkách množství bílkoviny, kterou zkoumají, a tak studovat její funkci.



Obr. 11 Ukázka malých RNA z lidských buněk. RNA byla izolována z lidských tkáňových kultur a malé RNA rozděleny pomocí gelové elektroforézy. RNA o stejné velikosti se koncentrují do jednoho proužku, který je po obarvení viditelný. Nejmenší RNA jsou dole (tRNA jsou kratší než 80 nukleotidů) a největší nahoře (U3 snoRNA má 217 nukleotidů). Z gelu je též možné odhadnout množství jednotlivých RNA v buňce – čím je proužek intenzivnější, tím více dané RNA se v něm nachází



Obr. 12 Model ukazující, jak navázání krátké miRNA molekuly na mRNA zastaví syntézu bílkoviny. Zeleně je naznačen ribozóm

Tato revoluce, která se odehrála v posledních deseti letech, výrazně urychlila výzkum molekulární podstaty mnoha dědičných nemocí. Na Ústavu molekulární genetiky studuje miRNA skupina doc. Petra Svobody. V roce 2013 objevili novou, aktivní formu enzymu, který miRNA produkuje. Tato forma je aktivní pouze ve vajíčku hlodavců a je důležitá pro jeho správný vývoj.

Zatím nejmladší skupina krátkých nekódujících RNA jsou **piRNA**, které byly objeveny a popsány čtyřmi nezávislými vědeckými skupinami v roce 2006, tedy relativně nedávno. Jejich řetězec je o něco delší než miRNA (až 33 nukleotidů); piRNA jsou specificky vytvářeny v pohlavních buňkách a mají důležitou funkci při tvorbě mužských pohlavních buněk, kde můžeme nalézt až milión piRNA v jedné spermii. Společně s PIWI proteiny (odtud jejich název piRNA–*PIWI interacting RNA*) hlídají mobilní DNA elementy, které jsou v naší DNA trvale přítomny, a udržují je neaktivní, aby nezaplavily náš genom.

Dlouhých nekódujích **lncRNA** bylo v lidském genomu nalezeno více než deset tisíc a jejich funkce se od sebe liší tak, jako se od sebe liší funkce jednotlivých proteinů. Odvážné teorie tvrdí, že expanze lncRNA stojí za evolucí komplexních mnohobuněčných organizmů včetně člověka. Na jejich ověření či vyvrácení si budeme muset ještě nějakou dobu počkat, ale čím více o lncRNA víme, tím více zjišťujeme, jak zásadní úlohu v buňkách hrají.

Klasickým příkladem dlouhé nekódující RNA je **XIST**, což je zkratka z anglického *X-inactive specific transcript*. Tato RNA je specificky syntetizována v samičích buňkách savců. Zatímco samčí buňky mají rozdílné pohlavní chromozomy X a Y, samičí mají dva pohlavní X chromozomy, a tak musí jeden „umlčet“, aby zůstal aktivní jen jeden, tak jako v samčích buňkách. A právě v procesu umlčení hraje XIST klíčovou roli. Zatím ještě ne úplně známým způsobem se X chromozomy během raného embryonálního vývoje v ženských buňkách „rozpočítají“ a jeden z nich začne vyrábět XIST RNA. Ta ho během krátké chvíle celý pokryje a zabalí tak, že už se nikdy během života nerozbalí a zůstane neaktivní. Protože výběr X chromozomu určeného k inaktivaci je náhodný, v polovině buněk je umlčen jeden a v druhé polovině buněk druhý X chromozom. Ženský organizmus je tak rozpolcen mezi dvě buněčné populace, z nichž každá používá jiný X chromozom.

S rozvojem technologií schopných zachytit i RNA, které se v buňce vyskytují jen v několika exemplářích, se ukázalo, že velká část našeho genomu je přepisována do RNA, které nemají žádný nebo jen minimální potenciál kódovat protein, tedy *bona fide* lncRNA. Funkce většiny těchto lncRNA zůstává neodhalena, ale z těch několika prozkoumaných exemplářů víme, že lncRNA ovlivňují rozdílné procesy, např. diferenciaci buněk během zárodečného vývoje, vyzrávání neuronů nebo strukturu buněčného jádra. Zatímco některé lncRNA se nacházejí v 10^3–10^4 kopiích na buňku, jiných je v buňce přítomno jen 5–10. Dá se říct, že lncRNA regulují snad všechny kroky genové exprese. Například lncRNA HOTAIR ovlivňuje transkripci genů nezbytných pro správný vývoj organizmu, Air lncRNA reguluje rozdílně expresi genů, které jsme zdědili po matce a otci (tak zvaný *imprinting*). V myších a lidech byly nalezeny nekódující RNA, které se specificky začnou syntetizovat v okamžiku tepelného šoku a zastavují přepis většiny genů, aby se zabránilo chybám, které by tepelný šok mohl způsobit. Další lncRNA kontrolují pre-mRNA sestřih a specificky alternativní sestřih a v podstatě tak rozhodují, která forma bílkoviny bude vyrobena.

Velice důležitou nekódující RNA je **7SK RNA**, která bývá někdy řazena mezi krátké jaderné snRNA, ale velikostí přesahující 300 nukleotidů spadá do kategorie dlouhých nekódujících RNA. Právě 7SK je významným negativním regulátorem enzymu RNA polymerázy II, který je zodpovědný za syntézu všech mRNA v našem těle a jeho přílišná aktivita může přispět k nekontrolovanému buněčnému dělení. Společně s několika proteiny funguje 7SK RNA jako brzda, která zabraňuje moc rychlé jízdě. A právě 7SK RNA je terčem aktivity proteinu Tat, který je produktem viru HIV a je klíčový pro přepis virových genů. Tat má dvě funkce. Nejdříve se naváže na 7SK RNA a inaktivuje ji, čímž „odbrzdí" RNA polymerázu II. V druhém kroku přitáhne odbrzděnou RNA polymerázu II ke svojí virové DNA, kde tento enzym nekontrolovaně syntetizuje velké množství virové mRNA.

V nedávné době bylo též ukázáno, že většina genových enhancerů, což jsou DNA elementy kontrolující transkripci genů kódujících protein, je přepisována do RNA nazývané eRNA. V tomto případě ještě není jasné, jestli sekvence eRNA je důležitá pro správnou funkci enhanceru. Existují teorie, které navrhují, že samotný akt transkripce eRNA stačí, aby enhancer správně fungoval. Teprve další výzkum ukáže, jak je to doopravdy.

Všechny lncRNA, které jsem zmínil v předchozích odstavcích, fungují v buněčném jádře. Je však spousta lncRNA, které se nacházejí v cytoplazmě, kde ovlivňují stabilitu mRNA či její přepis do proteinu. Některé lncRNA se váží na mRNA a tím urychlují její degradaci. Jiné fungují jako houby: stahují na sebe miRNA a snižují tak jejich efektivní koncentraci v cytoplazmě. To v důsledku vede ke zvýšené translaci mRNA, která by normálně byla pomocí miRNA utlumena.

Také bakterie využívají nekódující RNA k regulaci exprese proteinů. Jedná se o krátké (*short*) **sRNA**, které fungují podobně jako miRNA a siRNA ve zvířecích buňkách. Krátké sRNA se společně s Hfq proteinem váží na cílové mRNA a tím buď zabraňují jejich translaci do proteinu, nebo tato vazba vede rovnou k degradaci označené mRNA (Hfq proteiny a jejich funkci intenzivně studuje Dr. Bronislav Večerek z Mikrobiologického ústavu AV ČR). Bakterie, např. *Escherichia coli*, pokud se sníží koncentrace živin v jejich okolí, jsou schopny zastavit další dělení a omezí syntézu nových mRNA. K tomu pomáhá regulační **6S RNA**, která se začne syntetizovat, pokud vnější podmínky nejsou příznivé. Váže se na bakteriální RNA polymerázu

a inhibuje ji, čímž snižuje metabolickou aktivitu bakterie v podmínkách omezených potravinových zdrojů. Regulační RNA s podobnou funkcí nazvanou **Ms1**, objevil v roce 2014 tým vedený Dr. Liborem Krásným v mykobakteriích, mezi které patří patogeny způsobující choleru či tuberkulózu.

Na těchto několika příkladech je patrné, jak různé organizmy využívají regulační RNA, které spřádají tvárnou pavučinu obalující genom a společně s proteiny rozhodují, která část DNA bude zapnuta a kdy k tomu dojde.

Závěrem

Dodnes si pamatuji, jak nám před pětadvaceti lety na vysoké škole na přednáškách o genech a DNA říkali, že drtivá část našeho genomu nemá žádnou funkci a představuje jen harampádí, které se tam nahromadilo během evoluce. Jak hluboce jsme se mýlili! Výzkumy v posledních letech ukázaly, že toto harampádí produkuje různé RNA vytvářející jako neviditelná temná hmota síť, která reguluje produkci bílkovin. A stejně jako mezihvězdná temná hmota je zahalena tajemstvím, tak i RNA svět ukrývající se v našich buňkách a ovlivňující naše životy je z velké části neobjeven. Jak vzrušující doba pro molekulární biologii!

Těchto výzkumů jsem se mohl účastnit díky podpoře Grantové agentury České republiky financující náš výzkum RNA a Fulbrightovy nadace financující můj pracovní pobyt na Yale University, během kterého byl tento text napsán. Dík patří také Ireně Staňkové za kritické čtení a komentáře.

Jako nejvýznamnější výsledky z posledních dvaceti let lze uvést např. identifikaci prvního savčího genu zodpovědného za speciaci, etablování myšího modelu lidského Downova syndromu (J. Forejt), identifikaci řady nových signalizačních proteinů buněk imunitního systému (skupiny V. Hořejšího, T. Brdičky a P. Drábera), identifikaci nových komponent signalizačního systému Wnt-Frizzled (V. Kořínek, O. Machoň), sekvenování genomů několika organizmů (V. Pačes, Č. Vlček), identifikaci genů zodpovědných za vývoj oka (Z. Kozmik), objasnění některých základních mechanismů vzniku nádorů (J. Bártek, M. Dvořák, J. Hejnar, L. Macůrek) či sestřihu mRNA (D. Staněk), a nejnověji objev nového mechanismu regulace genové exprese v oplozeném savčím vajíčku (P. Svoboda).

Od roku 2007 sídlí celý ÚMG v nové moderní budově v krčském areálu biomedicínských ústavů AV.

V současné době v ústavu pracuje 23 výzkumných skupin, které řeší desítky projektů z oblastí molekulární a buněčné biologie, molekulární imunologie, funkční genomiky a bioinformatiky, onkogenů, vývojové molekulární biologie, strukturní biologie a receptorové signalizace.

Naši pracovníci např. objevují nové signalizační molekuly zodpovědné za normální fungování imunitního systému, geny, jejichž poruchy vedou k přeměně normálních buněk v nádorové, vyvíjejí světově unikátní myší modely lidských onemocnění, objasňují molekulární mechanismy vývoje oka u různých typů organizmů, hledají způsoby, jak ovlivnit aktivitu receptorových molekul v mozku, objasňují mechanismy přirozeného odumírání buněk a jejich využití k boji proti nádorům, mapují neobyčejně složité struktury a procesy odehrávající se v buněčném jádře, atd.

Naše servisní útvary zahrnují např. laboratoře mikroskopie a cytofluorometrie, genomiky a bioinformatiky, přípravy monoklonálních protilátek a kryosklad, přípravnu médií a konstrukce transgenních myší.

ÚMG má v současné době celkem kolem 400 pracovníků, včetně 120 studentů. Celá řada našich pracovníků působí aktivně pedagogicky na vysokých školách (mezi našimi pracovníky je m. j. 5 profesorů a 6 docentů), zajišťujeme 27 semestrálních přednášek na vysokých školách.

I když za prioritní oblast činnosti ústavu považujeme základní výzkum a za hlavní výstupy naší práce publikace v prestižních mezinárodních časopisech, na našem ústavu se velmi dobře daří rozvíjet i hodnotný aplikovaný výzkum směřující ke konkrétním praktickým realizacím. Také v této oblasti dosáhl ústav významných úspěchů, o čemž svědčí i to, že z něj vzešlo několik dobře prosperujících spin-off firem, které nadále úzce spolupracují s výzkumnými skupinami ústavu.

O vysoké úrovni pracovníků ÚMG svědčí řada cen a vyznamenání: několik státních cen, národních cen, cen ministra zdravotnictví, cen ministra školství, cen ČSAV, cen AV ČR, medailí G. Mendela a J. E. Purkyně a mnoha dalších. V roce 2010 získal Národní cenu vlády ČR „Česká hlava“ Jan Svoboda; Jiří Forejt byl nositelem prestižní pětileté Akademické prémie AV ČR, Radislav Sedláček a Petr Svoboda nositeli pětiletého Fellowshipu J. E. Purkyně AV ČR, několik mladých pracovníků získalo Prémii Otto Wichterleho.

Tři pracovníci ústavu (J. Svoboda, V. Pačes a J. Forejt) jsou členy Učené společnosti ČR. Ústav zastupuje Českou republiku v několika prestižních vědeckých organizacích a institucích včetně Evropské molekulárně biologické konference (EMBC), programu genomiky Evropské nadace pro vědu (ESF) a programu Věda pro mír NATO. Čtyři pracovníci ústavu (J. Bártek, J. Svoboda, V. Pačes a J. Forejt) jsou volenými členy elitní evropské organizace molekulární biologie EMBO. Pracovníci ÚMG působí v 35 redakčních radách vědeckých časopisů.

Pro budoucnost ústavu, ale i české molekulární a buněčné biologie, je zásadně důležité, že v roce 2011 Evropská komise přijala rozhodnutí o zahájení projektu BIOCEV v rámci programu Výzkum a vývoj pro inovace (www.biocev.eu); příjemcem podpory a garantem tohoto významného projektu, na kterém se podílí 6 ústavů AV ČR a 2 fakulty Univerzity Karlovy, je ÚMG. Výsledkem tohoto projektu za téměř 3 miliardy Kč bude vybudování nového moderního, špičkově vybaveného výzkumného komplexu ve Vestci (zhruba 8 km od krčského areálu AV) do roku 2015.

V EDICI VĚDA KOLEM NÁS PŘIPRAVUJEME:

Radomír Vlček: **Josef Macůrek**
Markéta Pravdová: **Jak se mluví mezi živly**
Karel Balík, Tomáš Suchý: **Biokompozitní náhrady kostní tkáně**
Hana Müllerová: **Právní ochrana zvířat**

DOSUD VYŠLO:

Pavel Peterka a kol.: **Vláknové lasery**
Václav Hořejší: **Jak (ne)funguje imunitní systém**
Magdalena Bendová: **Eduard Hála**
Václav Cílek: **Nové počasí**

Edice Věda kolem nás | Co to je…
RNA – temná hmota v našich buňkách | *David Staněk*

Vydal Ústav molekulární genetiky Akademie věd ČR, v. v. i.,
Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4, v Nakladatelství Academia,
Středisko společných činností AV ČR, v. v. i., Vodičkova 40, 110 00 Praha 1.
Grafická úprava dle osnovy Jakuba Krče a sazba Serifa. Technická redaktorka
Monika Chomiaková. Odpovědná redaktorka Petra Královcová. Vydání 1., 2015.
Ediční číslo 11790. Tisk SERIFA®, s. r. o., Jinonická 80, 158 00 Praha 5.

Další svazky získáte na:
www.vedakolemnas.cz | www.academiaknihy.cz | www.eknihy.academia.cz