

# Velký svět malých RNA

V posledních čtyřech člancích věnovaných RNA (Živa 2007, 3: 98–100, 5: 195–198, 6: 244–247 a 2008, 2: 53–56) se autoři zaměřili na přehled studií, které vedly k závěrům, že RNA není jen zprostředkovatelem přenosu genetické informace od DNA k proteinům, ale že může svými strukturálními a konformačními schopnostmi zasahovat jako regulátor do mnoha buněčných procesů. Kromě původní strukturální funkce (ribonukleoproteinové částice buňky) může tedy RNA „snadno“ plnit i funkce katalytické (ribozomy) a regulační (na úrovni transkripce, posttranskripční úpravy a translace), dříve připisované pouze proteinům. Právě regulační úloha zůstala v dřívějších textech poněkud v pozadí, i když žádáný z jejich autorů neopomněl zmínku o „malých nekódujících RNA“. Věnujme se proto podrobněji této důležité oblasti studia RNA, abychom získali ucelený současný pohled na strukturu a funkci RNA.

## RNA represory u prokaryotických organismů

V r. 2004 byla publikována práce W. C. Winklera a kol. (Nature, 428: 281–286) popisující regulaci genové exprese přirozenou ribozymovou aktivitou, indukovanou v mRNA vazbou nízkomolekulárního metabolitu. Práci komentoval ediční poznámkou nositel Nobelovy ceny T. Cech slovy: „RNA zná jednodušší cestu (rozuměj než proteiny).“ Autoři tu zúročili dřívější vlastní poznatky, že mRNA může přímo vázat různé metabolity a regulovat tak bakteriální genovou expresi. Tato aptamerová funkce – schopnost oligonukleotidů sekvencně specificky vázat téměř libovolné nízkomolekulární látky (obr. 1) za současné konformační změny vazebného místa a jeho okolí – se stala základem represorového mechanismu, závislého na RNA. Ve Winklerově práci o regulaci exprese genu *glmS* v buňkách rodu *Bacillus* vyvolala taková vazba aktivaci latentní sekvence ribozymu, štěpícího uvnitř vlastní mRNA, a tím i zastavení translace (obr. 3). Tak byl objeven RNA represor (vypínač), který zablokuje tvorbu enzymu GlmS katalyzujícího syntézu glukozamin-6-fosfátu

(GlcN6P), jenž je konečným metabolickým produktem vyvolávajícím RNA represi (podobně jako tryptofan – Trp – v případě proteinové represe jeho operonu u bakterie *Escherichia coli*, obr. 2). V této reakci je rozhodující i přítomnost  $Mg^{2+}$  iontů, které usnadňují restrukturuaci ribozymu.

Aptamerová vlastnost 5' nepřekládané oblasti mRNA (5'UTR) se uplatnila i u přímé regulace genové exprese (bez ribozymového zprostředkovatele) na základě konformačních změn v mRNA. U genu *thiM* v *E. coli*, účastníciho se syntézy thiaminpyrofosfátu – TPP (Nature 2006, 441: 1167–1171) jde o skutečný RNA spínač, tj. sekvenci mRNA, která v nepřekládané oblasti připravuje stabilizovanou konformaci pro vazbu metabolitu (sekundární a terciární struktura řetězce RNA tvoří přesnou vazebnou kapsu, připomínající obdobnou strukturu regulačních proteinů) umožňující konečnou modulaci syntézy kódovaného proteinu (obr. 4). Mechanismus represe při dostatečné koncentraci TPP spočívá v restrukturuaci iniciačního místa translace, resp. terminačního místa transkripce, která blokuje uplatnění důležité regulační sekvence mRNA (přístup-

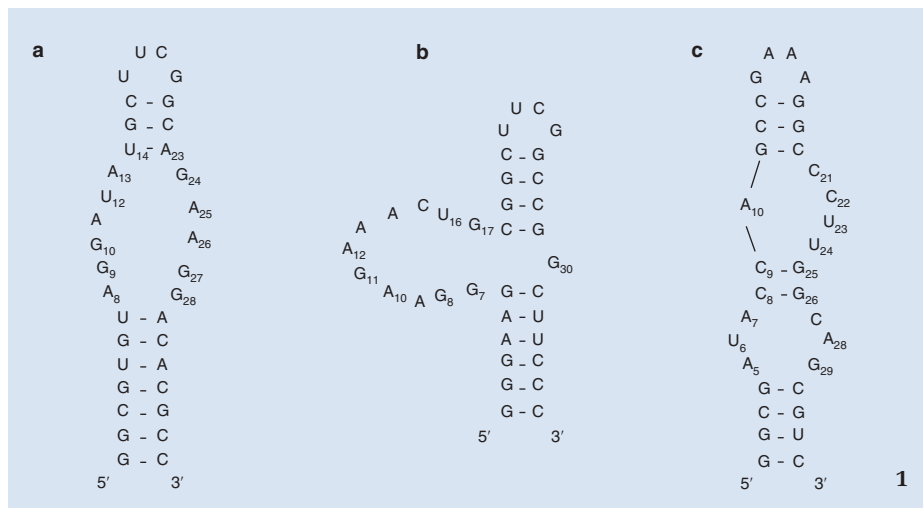
nost Shinovy a Dalgarnovy sekvence, resp. vytvoření předčasné terminační vlásenky, obr. 5). Obdobný případ RNA spínače ovládaného S-adenozylmethioninem byl nalezen v bakterii *Thermoanaerobacter tengcongensis* u několika genů účastnících se metabolismu síry a methioninu (Nature 2006, 441: 1172–1175).

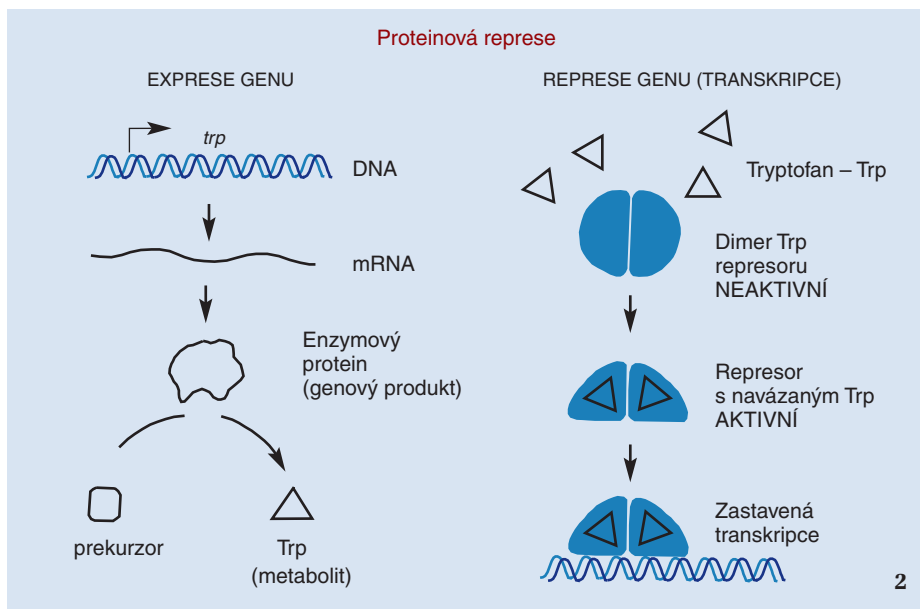
Praktická využitelnost TPP ribospínače spočívá v možnosti uplatnění antibakteriálního agens pyriithiaminpyrofosfátu (PTPP) v terapii bakteriálních infekcí. PTPP se od metabolitu TPP liší jen pyridinovým spojovacím článkem nahrazujícím thiazol, kteréžto části molekul se zřejmě neúčastní vazby s mRNA (obr. 6). Vazbou PTPP na ribospínač se vypne exprese důležitého bakteriálního genu, jenž se u infikovaného živočišného hostitele nevyskytuje. Nevýhodou celého mechanismu je však snadná mutační inaktivace vazebného místa. Interakce je velmi citlivá na bodové mutace, které vyvolávají rezistenci bakterie k PTPP.

Objev většího množství dalších ribospínačů (např. pro adenin, guanin, lysin, vitamin B12), které mohou regulovat 2–3 % genů bakterií (jsou však přítomny i u archeí, hub a rostlin) a podrobné studium aptamerů (experimentálně selektovaných na základě afinity RNA k malým molekulám) jednoznačně potvrdily schopnost RNA rozlišovat velmi podobné struktury organických látek (nukleotidy, aminokyseliny, vitaminy, koenzymy atd.), téměř srovnatelnou s úrovní protilátek, a tím možnost postupného vývoje RNA s ohromnou „substrátovou“ specifitou přírodním výběrem.

K těmto bakteriálním RNA s *cis*-regulačním elementem (přítomným na regulované molekule – např. intramolekulární restrukturační mRNA) patří i dříve objevené malé RNA (sRNA), které se velikostně shodují, ale působí v buňce jako *trans* faktory (samostatné regulační molekuly – např. intermolekulární interakce sRNA–mRNA). Jde o přímo kódované genové produkty, které většinou regulují procesy replikace a genové exprese plazmidů a transkripce v podmínkách stresu, modulace metabolismu železa apod. (v *E. coli* asi 100 genů). Stresová regulace často probíhá na úrovni minoritních sigma faktorů (podjednotek) RNA polymerázy, ale i přímou interakcí s odpovídajícími mRNA (při translokaci), přičemž vyžadují asistenci proteinů působících jako RNA chaperony (molekuly usnadňující prostorové konformační uspořádání RNA), které stabilizují slabé párování komplementárních sekvencí (např. Hfq protein). U jiných organismů (archea, kvasinky a rostliny) jsou *trans* faktory využity v mechanismech alternativního

**1** Sekundární struktury RNA aptamerů (vazebných sekvencí RNA) selektivně zachycujících flavinmononukleotid (a), ATP (b) a theofylin (c). Ve všech molekulách je zachován obecný strukturální motiv (dvoušroubovice–vnitřní smyčka–dvoušroubovice) a různé uspořádání smyčky – téměř symetrické (a), výrazně nesymetrické (b) a dvojité smyčka (c), která po vazbě metabolitu zaujímá specifickou konformaci. J. D. Puglisi a J. R. Williamson (1999), upraveno



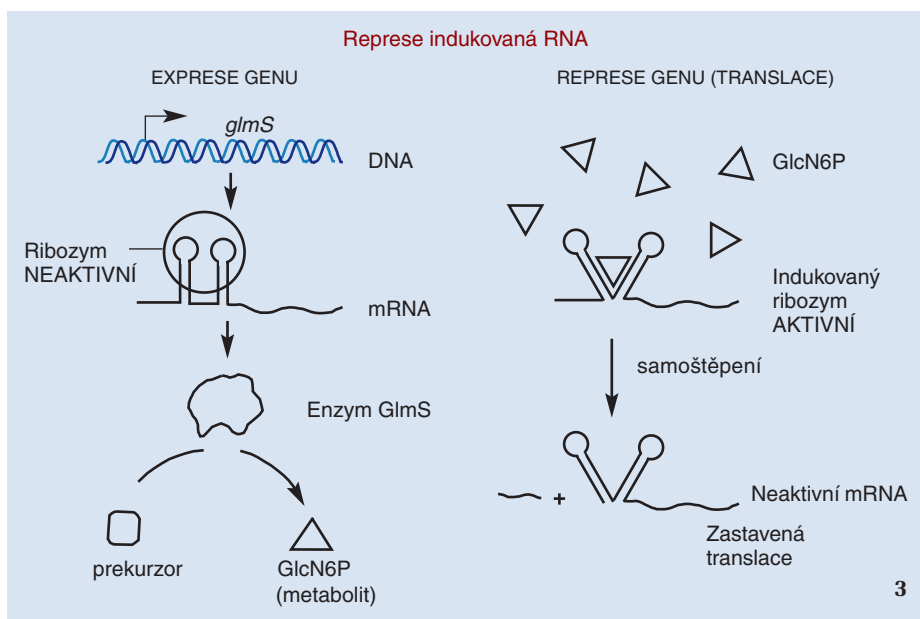


**2, 3** Schéma proteinové represe (Trp represorem) a RNA-indukované represe (zprostředkované ribozymem aktivovaným glukozamin-6-fosfátem). Latentní ribozymová struktura se vazbou aktivuje a dochází k samoštěpení mRNA. Upraveno podle T. Cech (Nature 2004, 428: 263–264). Blíže v textu

vláken DNA), z níž pochází i konečná aktivní siRNA. Funkce této často „externí“ siRNA (transgenóze, infekce RNA viry, ale i repetitivní sekvence vlastního genomu) připomněla i výskyt jiné malé, zřetelně „interní“ RNA v *C. elegans* (miRNA), která byla produktem genu *lin4* a inhibovala (umličovala) translaci mRNA jiných *lin* genů, uplatňujících se v ontogenezi organismu. Obě tyto skutečnosti nasvědčovaly tomu, že považujeme-li mechanismy působení siRNA a miRNA za společnou součást RNAi, pak je RNAi „odvěkým“ procesem, který se vyskytoval již před evolučním oddělením rostlin a živočichů a přirozeně fungoval jako ochrana před specifickou virovou infekcí a genetickými elementy uplatňujícími se prostřednictvím intermediárních dsRNA, které nejsou zcela běžnou součástí buňky.

Přestože oba tyto typy malých RNA v eukaryotické buňce mají značné podobné mechanismy působení (obr. 7), na nichž se podílí mnoho stejných či velmi podobných asociovaných proteinů a enzymů, je miRNA téměř výhradně spojena s regulací běžné genové výbavy buňky (asi 20 % genů je regulováno tímto způsobem) a je kódována vlastními geny transkribovanými RNA polymerázou II (za vzniku vlásenkových struktur posttranskripčně upravovaných na konečnou aktivní miRNA). siRNA je naopak převážně spojena s obranným procesem skutečné RNAi (připomínajícím imunitní systém), namířené proti „cizorodým“ dsRNA vznikajícím v buňce následkem virové infekce, transpozice, transgenóze, aberantní transkripce apod. Z toho plyne, že ne všechny organismy mají současně RNAi a miRNA. Zatímco RNAi je zřejmě evolučně starší (přítomna již ve společném předkovi všech eukaryot) a je přítomna ve většině organismů (nenajdeme ji u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kde spíše došlo k vývojové ztrátě), některé organismy nemají žádnou miRNA (např. kvasinka *Schizosaccharomyces pombe*). Mechanismus miRNA se asi vyvinul u mnohobuněčných organismů v důsledku již existující RNAi a možnosti jejího „snadného regulačního využití“.

**Přirozený „interní“ regulátor – miRNA**  
Protože jde o genový produkt, jehož finální forma je výsledkem posttranskripční úpravy primárního transkriptu RNázami III (jaderným enzymem Drosha a cytoplazmatickým Dicer), zachovávají si miRNA určitou organismální a tkáňovou specifitu, což předznamenává jejich rozhodující úlohu v evoluci a v regulaci diferenciaci (Živa 2004, 3: 98–101). U člověka bylo identifikováno mnoho set různých miRNA, které mohou regulovat alespoň třetinu všech genů kódujících proteiny. Základním mechanismem regulace je komplementární párování sekvencí miRNA s mRNA, které vede k ovlivnění stability a translatovatelnosti mRNA – miRNA), posttranskripční úrovni (štěpení a destrukce cílové mRNA – siRNA) a na transkripční úrovni (umličování promotoru odpovídajícího genu restrukturací chromatinu – siRNA a miRNA). První dva mechanismy se uplatňují v cytoplazmě, zatímco zbývající samozřejmě v jádře, kde transkripce probíhá (Živa 2004, 3: 98–101).



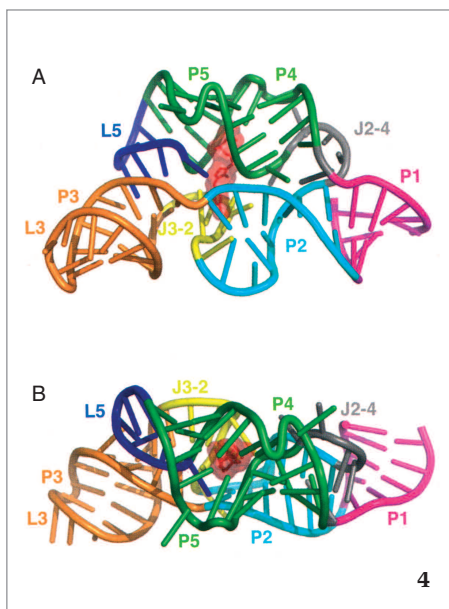
sestřihu v posttranskripční úpravě genů (např. u plísně *Neurospora crassa*).

Objev malých RNA a ribospínačů představujících výkonné regulátory genové exprese poskytl rovněž další experimentální předmět i prostředek pro genové manipulace a genové inženýrství s možností zásahu do genové exprese *in vitro*. Tak se po 50 letech naplnila nesmělá úvaha F. Jacoba a J. Monoda o možné úloze RNA jako represoru při objasňování operonové teorie u bakterií, i když tehdy zůstali u proteinové povahy represoru, která představuje rozhodující podíl při regulaci genové exprese.

### Genová exprese u eukaryot regulovaná prostřednictvím RNA

U eukaryot, v procesech souhrnně často označovaných jako RNA interference (RNAi), zabezpečuje regulaci genové exprese skupina dvouvláknových (double stranded) velmi krátkých nekódujících dsRNA (21–30 nukleotidů). Patří sem však nejen dsRNA různého původu (především malé interferující RNA – siRNA a mikroRNA – miRNA), ale i rozdílné mechanismy zabezpečující represí (umličování) genů na translační úrovni (inhibice translatovatelnosti mRNA – miRNA), posttranskripční úrovni (štěpení a destrukce cílové mRNA – siRNA) a na transkripční úrovni (umličování promotoru odpovídajícího genu restrukturací chromatinu – siRNA a miRNA). První dva mechanismy se uplatňují v cytoplazmě, zatímco zbývající samozřejmě v jádře, kde transkripce probíhá (Živa 2004, 3: 98–101).

Na přelomu 80. a 90. let se s tzv. posttranskripčním umličováním genů poprvé setkali rostlinní genetici, kteří při transgenním šlechtění okrasných rostlin (petunií) byli překvapeni výsledkem, že zvýšení počtu kopií genů podporujících fialovou barvu květů vedlo u transgenních rostlin velmi často ke květům s bílými skvrnami nebo dokonce zcela bílým. Došlo k umličování nejen vnesených transgenů, ale i vlastních genů šlechtěných rostlin. Vysvětlení přišlo záhy po experimentech A. Fireho a C. Melloa (Nature 1998, 391: 806–811, Živa 2007, 3: XLIII), kteří po injekci dsRNA do buněk hádátka *Caenorhabditis elegans* našli „umličené“ geny zahrnující sekvence komplementární k dsRNA. Transgeny tedy mohou být v cílovém organismu zdrojem určitého množství dsRNA (v důsledku jejich možné transkripce obou



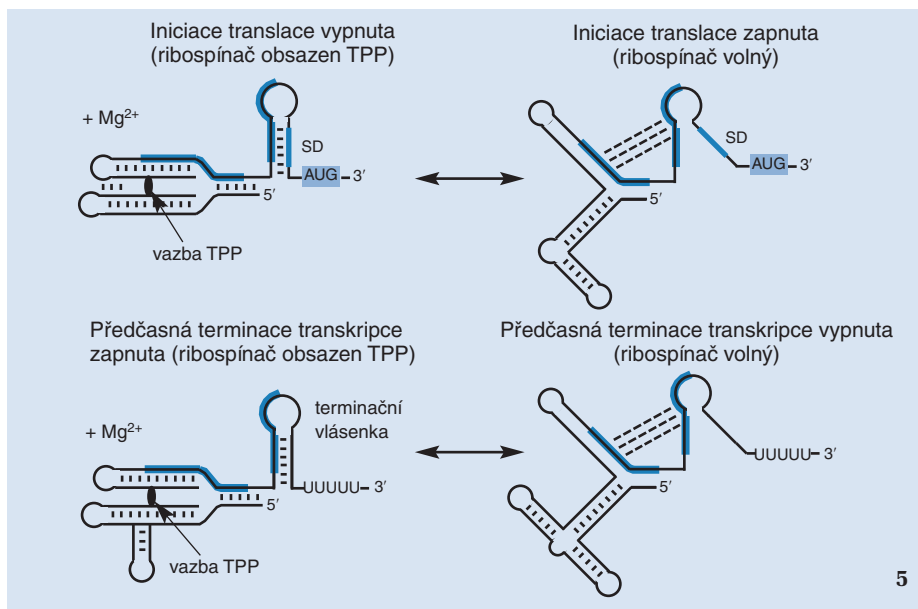
4 Schéma umístění thiaminpyrofosfátu v terciární struktuře ribospínačové „kapsy“ mRNA genu *thiM* z bakterie *Escherichia coli*. A – pohled z boku, B – pohled shora. Písmena a čísla označují části sekundární struktury, podílející se na konformačním uspořádání ribospínače. A. Serganov a kol. (Nature 2006, 441: 1167–1171), upraveno

nosti odpovídající mRNA. Rozhodující je v tomto směru vyhledávání sekvence cílové mRNA, k čemuž slouží komplex RISC (RNA-Induced Silencing Complex, někdy také označovaný miRNP – mikroribonukleoproteinový komplex) tvořený asociací mnoha proteinů (s prominentní úlohou skupiny organismálně a tkáňově specifických Argonautů) s antisense řetězcem příslušné miRNA nebo siRNA, v němž je jeho 5' konec optimálně strukturován pro iniciační interakci s 3'UTR mRNA (vytvoření 7 hlavních nukleotidových párů). Při úplné komplementaritě celé sekvence miRNA (nebo siRNA) s mRNA rozštěpí Argonaut specificky sekvenci mRNA a umožní její další exonukleázovou degradaci. Translace odpovídajícího genu je tak zcela „umlčena“. Při mnohem častější neúplné komplementaritě miRNA–mRNA (např. již zmiňovaný případ genů *lin*) dochází k úpravě translatability mRNA, která je směřována do cytoplazmatických částic P (processing bodies), kde je destabilizována polyA sekvence a čepička mRNA a translace je reprimována (asi reverzibilně).

Popsaná regulace genové exprese molekulami miRNA je zvláště výhodná, protože jedna miRNA může ovlivnit celou skupinu různých mRNA (časté podobné nebo shodné sekvence v 3'UTR), ale i několik miRNA může působit synergisticky na tutéž mRNA, kde je pak účinek násobně zesílen.

#### Indukovaný „externí“ regulátor siRNA (RNA interference)

Zdrojem siRNA (většinou s 21 nukleotidy a přesahem dvou nukleotidů na 3' konci) je dlouhá molekula dsRNA různého původu (replikace RNA viru, symetrická transkripce genu, ale i repetitivních sekvencí apod.), která je v cytoplazmě štěpena spe-



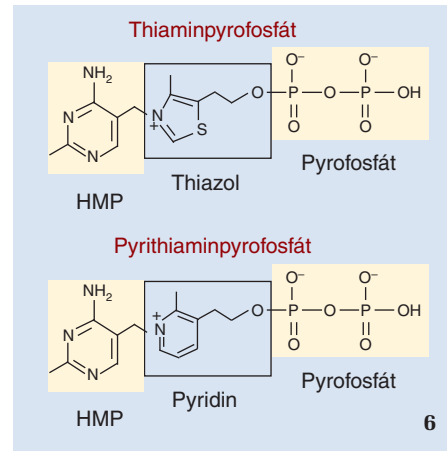
cifickou RNázou Dicer. Antisense řetězec siRNA je po 5' fosforylaci začleněn rovněž do komplexu RISC a protože je vždy zcela komplementární se sekvencí cílové RNA, dochází k jednoznačnému štěpení a inaktivaci RNA (RNAi v obr. 7). V obou případech zmíněné úplné komplementarity sekvencí miRNA nebo siRNA s mRNA působí tentýž komplex RISC v procesu RNAi katalyticky a opakovaně na dalších molekulách cílové RNA.

U některých organismů (zvláště rostlin a háďátka *C. elegans*) dochází k zesílení odpovědi RNAi v důsledku přítomnosti RNA závislé RNA polymerázy v buňkách (enzymu syntetizujícího RNA podle matrice RNA). Enzym „pomnožuje“ původní dlouhé dsRNA s použitím siRNA nebo miRNA jako iniciačních oček (primerů) na matici a tím zajišťuje pokračování procesu i po vyčerpání iniciační siRNA nebo miRNA.

I v tomto směru, včetně vertikálního přenosu siRNA i miRNA do potomstva, se nabízí určitá příbuznost s živočišným imunitním systémem. RNAi se syntetickými siRNA se dnes globálně využívá ke studiu funkce genů.

#### Restrukturace chromatinu a transkripční umlčení genů v RNAi

Zcela zvláštním typem působení siRNA a miRNA v procesu RNAi je heterochromatinizace genomu (přeměna aktivního euchromatinu na neaktivní heterochromatin), která vyvolává specifickou (podle sekvence siRNA) transkripční represí genů (obr. 7). V takovém případě se siRNA jako produkt štěpení Dicer spojuje s Argonauty a dalšími proteiny do komplexu RITS (RNA-Induced Transcriptional Silencing, obdoba komplexu RISC nebo miRNP), který v procesu RNAi vyhledává komplementární sekvence nascentních – neseřihovaných řetězců RNA syntetizovaných RNA polymerázou II na genomu a tím se dostává do blízkosti promotoru právě transkribované RNA. Komplex RITS se schopností přitahovat proteiny modifikující histony a DNA chromatin (převážně metylace obou složek) tak iniciuje ve své blízkosti restrukturační chromatinu na kompaktní (inaktivní) heterochromatin s transkripčně

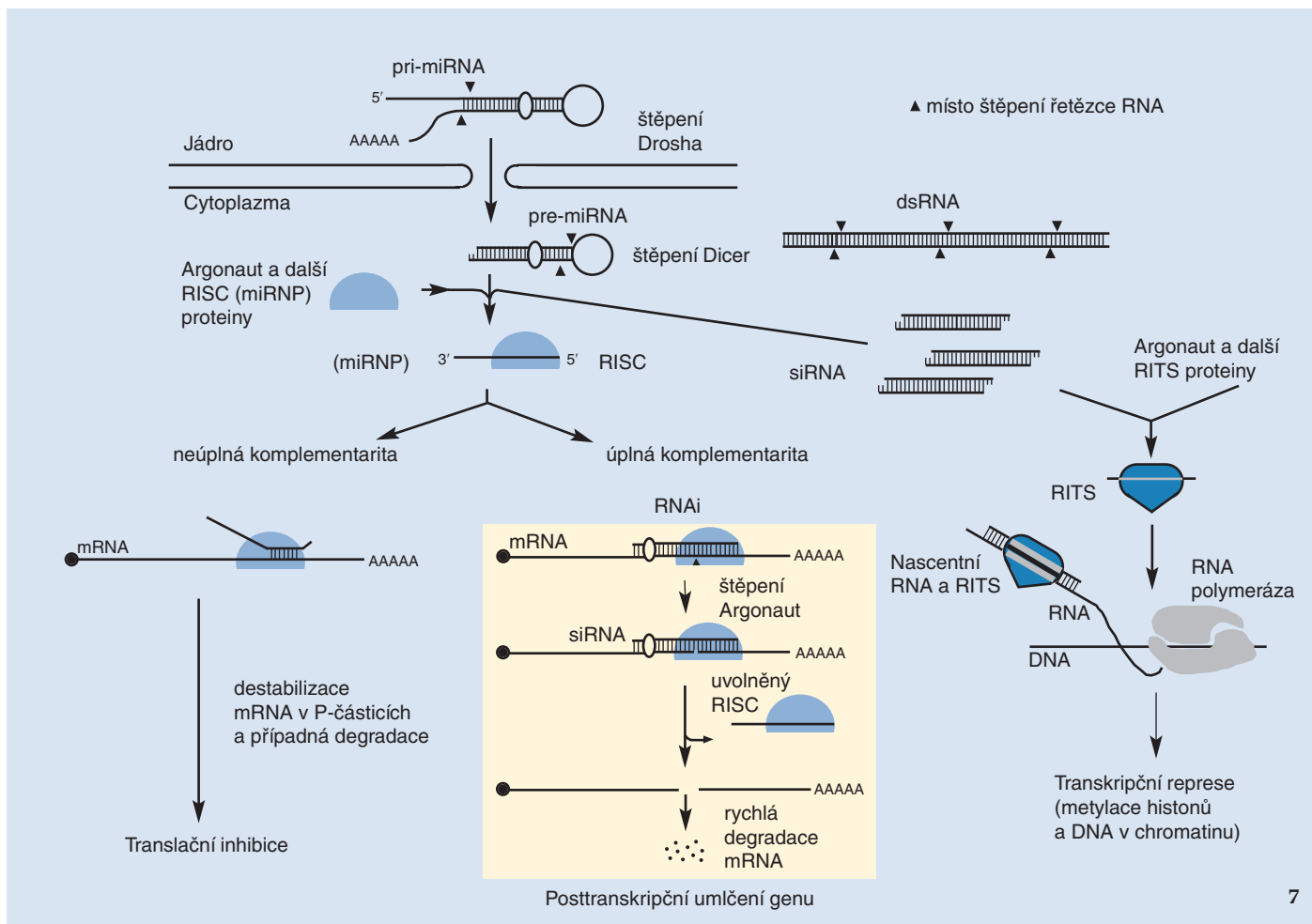


5 Schémata pravděpodobného mechanismu působení ribospínače po vazbě thiaminpyrofosfátu na iniciaci translace a na předčasnou terminaci transkripce u genu z obr. 4. SD – Shinova a Dalgarno sekvence, AUG – translační iniciační kodón. Modré čáry vyznačují sekvence, které rozhodují o restrukturační ribospínače, tj. uvolnění nebo vazbě aktivních sekvencí (SD a terminační vlásenka) při „zapnutí“ nebo „vypnutí“ procesu. Prerušované čáry naznačují komplementární interakce regulačních sekvencí. A. Serganov a kol. (Nature 2006, 441: 1167–1171), upraveno

6 Porovnání strukturálních vzorců metabolitu thiaminpyrofosfátu a antimetabolitu pyrithiaminpyrofosfátu s antimikrobiálním účinkem. Shodné části struktur HMP a pyrofosfát se podílejí na vazbě s ribospínačem mRNA, střední části se interakce neúčastní

inaktivovanou DNA. Protože heterochromatinové uspořádání a metylace DNA jsou samoregulovatelné, stačí iniciační vliv specifické siRNA a oba procesy mohou pokračovat bez přítomnosti další siRNA.

Kromě již zmiňované inaktivace (umlčování) transpozonů, což jsou genetické elementy „pohybující“ se po genomu – „skákáčící“ geny, se tento způsob působení RNAi uplatňuje při heterochromatinizaci oblastí centromery (po iniciační procesy vlastními vzájemně komplementárními



7 Schéma jednotlivých mechanismů působení RNA interference a místo a úloha siRNA a miRNA v nich. Drosha a Dicer – ribonukleázy III, pri-miRNA – primární transkript miRNA, pre-miRNA – prekurzor miRNA, RISC – RNA-Induced Silencing Complex, miRNP – mikro-ribonukleoproteinový komplex, RITS – RNA-Induced Transcriptional Silencing. Blíže v textu. B. Alberts a kol. (2007), upraveno. Všechny obr. z archivu autora

transkripty lokusu, připravenými přirozenou symetrickou transkripcí přítomných repetitivních sekvencí). Mnoho dalších případů dnes již potvrzuje skutečnost, že sám transkript, je-li cílem RNAi, může jednoduše šířit umlčování genů právě na transkripční úrovni, přičemž se často uplatňuje zmiňované zesílení účinnosti RNAi působením RNA závislé RNA polymerázy. Proto se zdá zvláště významné nedávné zjištění, že buněčná RNA polymeráza II má rovněž určitou (zbytkovou?) polymerázovou aktivitu závislou na RNA matici (Nature 2007, 450: 445–449), což může zásadně ovlivnit naše další úvahy o RNA regulacích v buňce.

### Závěr

RNA interference a úloha malých RNA byly objeveny celkem nedávno a přes dosud omezené znalosti o mechanismech jejich působení vyvolaly ohromný ohlas a odpovídající rozvoj celé oblasti molekulární biologie. Jejich poznání se vyvíjelo od původního obranného procesu, přes regulační zásahy do exprese jednotlivých genů a jejich skupin (nejčastěji v diferen-

ciaci a ontogenezi) až do ovlivňování procesů rozhodujících o struktuře a uspořádání chromozomů. Staly se tak součástí běžné buněčné biologie a základem významné experimentální techniky pro rychlé testování funkce libovolného genu. Ve spojení s různými způsoby vpravování dsRNA do buňky a organismu (nejčastěji specializované procesy technologie rekombinantní DNA), lze dnes při použití komerčních knihoven syntetických siRNA (obsahujících až desítky tisíc položek) analyzovat funkce kompletní sady genů mnoha organismů (háďátka, octomilka, myš) se známým genomem (tedy i člověka). Specifické expresní vektory s regulovatelnými promotory, označené „čárovým kódem DNA“, umožňují podrobnou analýzu genové exprese v jednotlivých tkáních v různém čase. A protože mnoho onemocnění je vázáno na odchylnou expresi genů, je RNAi vhodnou metodou pro jejich hledání, a to i v případě nádorových nemocí. Přes nadějně výsledky je však praktické použití takové inaktivace genů pro terapeutickou aplikaci ještě daleko.

Naším úkolem však bylo především ukázat, že současná úroveň studia RNA se plně vyrovná dnešní genomice a proteomice, k jejichž výsledkům navíc nemalou měrou přispívá. Práce s RNA potvrzují oprávněnost předpokladů, že tato dříve spíše opomíjená informační makromolekula je sama schopna za určitých podmínek plnit většinu funkcí DNA a proteinů a že teorie postupné molekulární evoluce a existence světů v řadě RNA – RNA s proteiny – DNA je stále pravděpodobnější, i když nebude asi nikdy jednoznačně potvrzena.

### Poznámka autora:

Krátce po odevzdání rukopisu publikovali A. Grimson a kol. (Nature 2008, 455: 1193–1197) práci o výskytu a evoluci malých regulačních RNA u živočichů, která opravuje naše dosavadní představy.

Předpokládalo se, že miRNA se účastní regulace transkriptomu až u bilaterií (organismy s dvoustrannou symetrií), mezi něž patří např. octomilka, háďátka, myš i člověk (se známou sekvencí genomu). Složitosti těchto organismů podle počtu genů kódujících proteiny (14, 19, 22 tisíc, resp. 21 tisíc) a neuronů (100 tisíc, 302, 70 milionů, resp. 700 miliard) odpovídá i vztupný počet jejich miRNA (147, 154, 491, resp. 677). Grimson a kol. sekvencí komplementu malých nekódujících RNA ukázali, že miRNA se vyskytují i u jednoduchých nesouměrných organismů jako mořská houba (*Amfimedon queenslandica*) – 8 miRNA a žahavec (*Nematostella vectensis*) – 40 miRNA. Srovnávací analýzy potvrdily, že evoluce miRNA byla velmi dynamická (rozdíly ve velikostech prekurzorů a v sekvencích finálních molekul) a že je doprovázena i důležitými proteiny specifickými pro jejich metabolismus a funkci. To vše posunuje výskyt miRNA až na úroveň evoluce mnohobuněčnosti, s možností ztráty miRNA v některých dalších stupních fylogeneze. Tato zjištění mohou hrát úlohu i při objasňování nerosrovnalostí mezi počtem genů a evoluční úrovní daného organismu. Počty genů mořské sasanky a člověka nejsou příliš rozdílné, a proto asi i ne zcela rozhodující, což lze považovat za obecný princip při hodnocení analýzy genomů.