

Nowości ze świata RNA

Mikro-informacja



WITOLD FILIPOWICZ

Friedrich Miescher Institute
for Biomedical Research,
University of Basel,
Bazylea, Szwajcaria
Członek zagraniczny
Polskiej Akademii Nauk
Witold.Filipowicz@fmi.ch

Prof. dr hab. Witold Filipowicz otrzymał w tym roku prestiżową nagrodę Lifetime Achievement in Science Award przyznaną przez międzynarodową RNA Society za wybitne osiągnięcia w dziedzinie badań nad RNA

Długo sądzono, że RNA to cząsteczka wyspecjalizowana w przenoszeniu informacji z DNA na białko. Stosunkowo niedawno naukowcy odkryli, jak bardzo złożony jest świat RNA

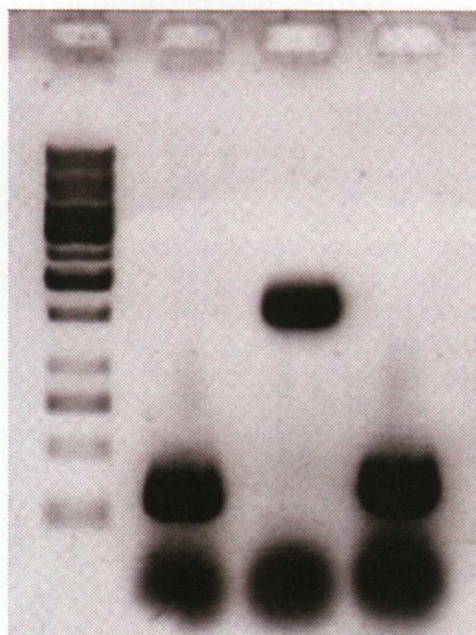
Profesor Witold Filipowicz, z którym *Academia* rozmawiała na temat jego wieloletnich badań nad RNA, mówi, że są dwa typy naukowców: jedni „mielą” (całe życie zgłębiają jeden temat), drudzy „zbierają kwiaty” (przeskakują z dziedziny na dziedzinę, często posądzeni o oportunizm). On sam jednak pasuje do obu tych typów.

Całe swoje naukowe życie zajmuję się RNA, ale w międzyczasie wiedza o RNA stała się bardzo szeroką dziedziną. Gdy zaczynałem, wiadomo było o transferowym tRNA, rybosomalnym rRNA i informacyjnym (messenger) – mRNA. Wielka przygoda zaczęła się mniej więcej 30 lat temu, kiedy odkryto pierwsze RNA, niepasujące do żadnej z tych trzech kategorii – rozmaite regulacyjne RNA. Okazało się również, że RNA może mieć aktywność rybozemu, czyli aktywność enzymatyczną. Wtedy zatarta się wielka różnica między RNA, DNA i białkami. Wcześniej sądzono, że RNA jedynie przenosi informację z DNA na białko lub funkcjonuje jako materiał genetyczny pewnych wirusów. Tymczasem okazało się, że może on być cząsteczką zawierającą zarówno informację, jak i enzymem. Popularność zyskały wtedy istniejące już wcześniej hipotezy, że pierwszy nasz świat to nie był świat DNA, tylko właśnie RNA. Ta czą-

steczka mogła się samoreplikować – mogła na własnej matrycy stwarzać nowe cząsteczki, wśród nich także nowe rybozemy. Te odkrycia szalenie poszerzyły dziedzinę badań nad RNA i oczywiście ściągnęły tysiące ludzi chcących analizować RNA i zgłębiać jego ewolucję.

Badania nad RNA dały możliwość rozwiązania paradoksu „niekodujących” regionów genomu. Wcześniej funkcjonowały różne hipotezy próbujące wyjaśnić, dlaczego jedynie około 1% genomu człowieka i innych ssaków koduje białka. Uważano, że reszta to junkDNA, selfishDNA, niepotrzebny balast, pozostałość ewolucji. Dziś wiadomo już, że ta cała reszta, lub przynajmniej jej znaczna część, niesie informację dla RNA niekodującego białka, że te sekwencje DNA są transkrybowane do RNA i pełnią różne, niesłychanie istotne regulatorowe funkcje. Oczywiście na początku podchodzono do tego (jak do każdego przelomowego odkrycia) bardzo sceptycznie. Nazywano to noise – szum (informacyjny). Sądzono, że polimeraza RNA przelatuje przez to DNA, a powstające niepotrzebne produkty ulegają degradacji.

Dziś wiadomo, że są dziesiątki tysięcy niekodujących RNA.



Paola Dolowy

Żele akrylamidowe prowadzi się kiedyś zwykle do długości odpowiadającej wielkości rozmiaru tRNA. O reszcie, która pojawiała się niżej na żelu, myślało się, że to produkty degradacji. Teraz wiele osób wróciło do swoich starych żeli

Im bardziej
złożony organizm
eukariotyczny tym
więcej alternatywnego
składania prekursorów
mRNA. Na fotografii
modelowy organizm
dla badań biologów
molekularnych
– muszka owocowa
(*Drosophila
melanogaster*)



Mr. Checker/Thomas Wydra, Wikipedia Commons

Jedne z nich są bardzo długie – mają tysiące nukleotydów, inne od 100 do 300 nukleotydów, a jeszcze inne to cały świat małych RNA: microRNA, interferencyjnych RNA (iRNA, siRNA), piRNA. Odkrycie tego było wielką niespodzianką. To umykało uwadze naukowców przez tyle lat. Małe RNA łatwo zrozumieć – po prostu uciekały z naszych żeli. Te średnie widzieliśmy, ale omijaliśmy. Żele akrylamidowe prowadziło się kiedyś zwykle do długości odpowiadającej wielkości rozmiaru tRNA. O reszcie, która pojawiała się niżej na żelu, myślało się, że to produkty degradacji. Teraz wiele osób wróciło do swoich starych żeli: „Ja to widziałem, to było tam”, ale nikt nie wpadł na to, że to jest takie ważne.

Bardzo dużo wiemy o białkach i o genach kodujących białka dzięki programowi sekwencjonowania genomów. Ale mamy w tej chwili jakby drugi genom, który trzeba prawie od zera zanalizować – co on robi, jak on pracuje. Ponad 10 lat temu zdecydowałem się rzucić stare badania nad też niekodującymi RNA – tymi średniej wielkości, i się zająć małymi RNA, które są rzeczywiście fascynujące. Małe RNA działają jako regulatory genów kodujących białka, jako regulatory struktury chromaty, rozwoju, dyferencjacji. Praktycznie każdy proces biologiczny jest regulowany przez microRNA. Do tej pory nie wiadomo dokładnie, jaki jest mechanizm ich działania, ale wszystko wskazuje na to, że regulują translację – proces biosyntezy białka – na dwóch poziomach: jako regulatory translacji jako takiej, głównie inicjacji, ale również stymulują deadenylację mRNA i jego stabilność. To wielopoziomowa regulacja: utrzymywanie translacji, potem wzmocnienie efektu przez pozbycie się już zbędnego mRNA przez degradację.

Badania nad RNA są szalenie fascynującą, ale również kompetywną dziedziną. Przetomem było, gdy okazało się, że geny są nieciągłe, przerywane intronami. Proces składania prekursorów mRNA był przez ostatnie 20 lat jednym z najciekawszych

zagadnień w biologii. Próbowano zrozumieć, dlaczego genom ludzki, mimo że ma niewiele więcej genów niż genom muszki owocowej czy robaka obłego, koduje o wiele bardziej złożony organizm. Okazało się, że w wypadku genów ludzkich jest tyle tego alternatywnego składania, że właściwie każdy gen to 10 różnych form mRNA, które kodują różne białka. To najprawdopodobniej jest podstawą rozwoju organizmów wielokomórkowych. Drugie niezwykle zagadnienie to właśnie niekodujące RNA regulatorowe, których wciąż jeszcze nie rozumiemy. Szczególnie tych dużych, których większość została odkryta zaledwie dwa, trzy lata temu. Jest ich obecnie skatalogowanych jakieś 8-10 tysięcy. Działają na zasadzie modułów, substruktur, tak jak białka. Białka o właściwościach enzymatycznych często mają dodatkowe domeny, które na przykład dotaczają je do RNA. Tak samo długie RNA wydają się mieć właściwości zależne od struktury. Często fałdują się w modularne struktury podobne do białek i też mogą mieć wiele domen – jedna domena jest odpowiedzialna np. za doprowadzenie niekodującego RNA do określonego miejsca w chromatinie, a druga będzie oddziaływała z białkiem o własnościach enzymatycznych. To drugi świat cząsteczek. Świat genów do rozplątania...

Białka zdetronizowane?

Większość RNA pośrednio lub bezpośrednio reguluje ekspresję DNA kodujących białka. Bez białka nic się dziś ważnego nie wydarzy. U samych początków prawdopodobnie RNA robiło wszystko, ale teraz białka są podstawą większości funkcji komórkowych. Są jednak pograniczne struktury – rybonukleoproteidy, kompleksy RNA i białek. To są pozostałości z wczesnych czasów RNA. Są ich setki. Działają na różnych etapach, np. składanie mRNA jest całkowicie kontrolowane przez małe cząstki rybonukleoproteinowe. Białka przejęły w większości enzymatyczne funkcje RNA, ale RNA

Nowości ze świata RNA

jest niesłychanie pożyteczne. Ma możliwość dołączania się do sekwencji innego RNA przez parowanie zasad. To czyni z RNA uniwersalny regulator. Często mały RNA może mieć w sobie krótki odcinek nukleotydowy, który nadaje mu specyficzność miejscową. To małe RNA może dołączyć się do mRNA albo DNA, do sekwencji, która jest na granicy między intronem a egzonom. Z tymi różnymi RNA będzie związany ten sam enzym białkowy. Dzięki RNA będzie doprowadzony do różnych miejsc – to jest szalenie ekonomiczne. Nie „trzeba” budować całej kolekcji enzymów białkowych, które muszą przejść przez transkrypcję, genom, translację, fałdowanie, tylko to samo białko doczepić do różnych RNA, które będą miały tylko 100 nukleotydów i które nadadzą białkom specyficzność. Rybosomalny RNA, którym zajmowałem się dawniej, jest w wielu miejscach modyfikowany albo przez metylację, albo przez wymianę urydyny na pseudourydynę. Wszystkie te modyfikacje (jest ich mniej więcej sto – i metylacji, i pseudourydylacji) są kierowane przez małe RNA, które doczepiają ten sam enzym do rozmaitych miejsc w rRNA i ten sam enzym prowadzi do modyfikacji rRNA w różnych miejscach. Zamiast 100 różnych enzymów białkowych – energetycznie ogromny koszt – komórka produkuje 100 krótkich RNA, które decydują o specyficzności, gdzie ten sam enzym może podobną reakcję katalizować. Natura jest bardzo sprytna!

Porozmawiajmy o epigenetyce.

Na regulację chromatyny (choć pojedyncze prace na to wskazują) wpływają raczej nie microRNA, które uznawane są za regulatory posttranskrypcyjne, ale inne małe RNA, zwłaszcza siRNA (small interfering RNA), których mechanizm powstawania jest bardzo podobny do microRNA. To procesy bardzo słabo na razie poznane u ssaków, ale bardzo dobrze rozpracowane dla roślin i niektórych grzybów. To się odbywa w dosyć skomplikowany sposób. Struktura chromatyny jest bardzo dynamiczna, a regulacja tej dynamiki wiąże się ze skomplikowanymi reakcjami. Do niedawna się wydawało, że histony jedynie organizują DNA w strukturę, którą można upakować. Teraz wiadomo, że histony są przedmiotem dziesiątek modyfikacji, takich jak metylacja, acetylacja lub ubikwitynacja. To te modyfikacje decydują o dostępności chromatyny dla polimerazy, czyli o możliwości transkrypcji – o możliwości powstawania konkretnych białek. Małe RNA – siRNA – odgrywają w tym ogromną rolę, lokalnie zmieniając euchromatynę w heterochromatynę. To jest bardzo dobrze pozna-

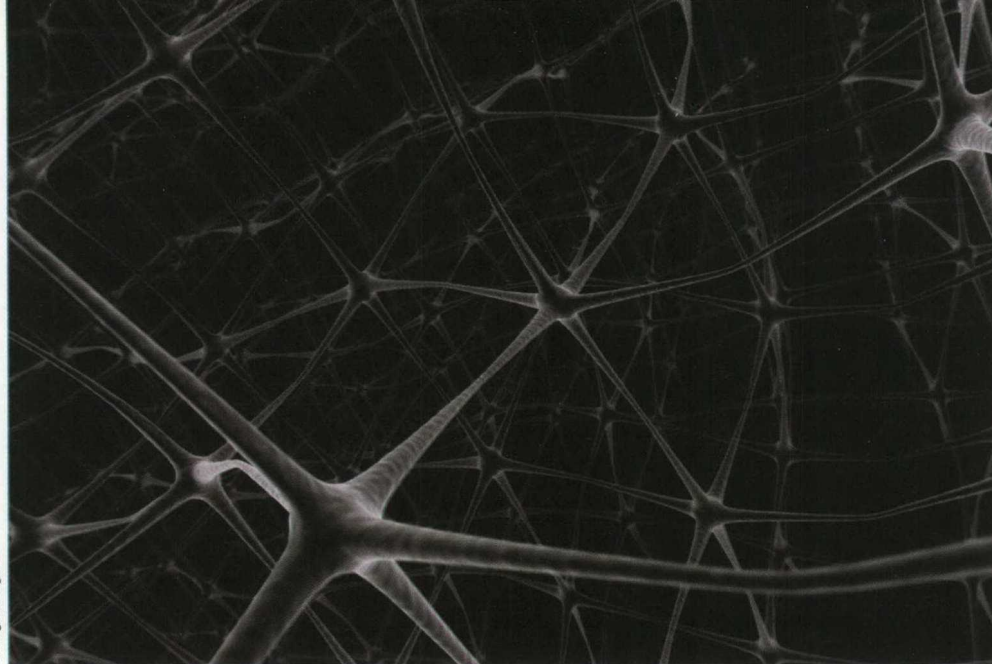
ne, szczególnie u drożdży *Schizosaccharomyces pombe*, dla heterochromatyny znajdującej się blisko centromerów. Ta centralna część jest bardzo mocno upakowana. W czasie mitozy, kiedy rozchodzą się chromosomy, musi ona być heterochromatyczna. Te regiony są transkrybowane w dwóch różnych kierunkach. Z niekodujących transkryptów tworzy się dwuniciowa struktura. Następnie jest ona cięta enzymem, nukleazą Dicer, na małe siRNA. To one doprowadzają w konkretne miejsca cały kompleks innych białek, stymulujących heterochromatyzację i prowadzących do metylacji histonów na resztach, które są odpowiedzialne za wyciszenie genów. U *Schizosaccharomyces pombe*, które ewolucyjnie są na innym poziomie niż drożdże piekarskie, występuje ciekawy cykl komórkowy. Podział przebiega wzdłuż krótkiej osi (jak u większości bakterii), co owocuje dwiema komórkami o jednakowej wielkości. W czasie cyklu komórkowego u *S. pombe*, siRNA są zaangażowane nie tylko w regulację centromerów, lecz także wielu genów kodujących białka. Transkrypcja wielu genów zachodzi w dwóch kierunkach: sens i antisens, powstają dwuniciowe struktury, które są natychmiast rozpoznawane przez białko Dicer. To działa na zasadzie regulacji zwrotnej – wyciszenie genów jest tylko chwilowe, zachodzące tylko w określonej fazie cyklu komórkowego. Wyszukane mechanizmy rozmaitych typów regulacji, o których nam się nie śniło.

Ale wróćmy do microRNA. Ich rola w posttranskrypcyjnej regulacji genów jest badana od około dziesięciu lat. U człowieka funkcjonuje około

© 2005 Public Library of Science



Proces składania prekursorów mRNA był przez ostatnich 20 lat jednym z najciekawszych zagadnień w biologii. Próbowano zrozumieć, dlaczego, mimo że genom ludzki ma niewiele więcej genów niż genom robaka obłego, kduje o wiele bardziej złożony organizm. Na zdjęciu robak obły (*Caenorhabditis elegans*)



W mózgu jest największa różnorodność microRNA. Wielu naukowców zajmuje się w tej chwili neuronami. Lokalna stymulacja neuronów jest istotna dla trwałego zapisu pamięciowego (long-term memory)

tysiąca różnych microRNA i ocenia się, że ponad połowa wszystkich genów kodujących białka jest przez nie regulowana, choć udowodniono to dla jedynie kilku procent regulowanych mRNA. MicroRNA funkcjonują jako rybonukleoproteidy i rola microRNA polega na doprowadzeniu odpowiednich białek do mRNA. MicroRNA działają więc jako przewodnicy (guide), nakierowujący rybonukleoproteidowy kompleks do mRNA poprzez parowanie zasad (base-pairing), oddziaływanie komplementarnych sekwencji pomiędzy microRNA i mRNA. Prosta i bardzo ekonomiczna zasada. Znow można, poprzez microRNA, całą tę maszynę, która prowadzi do wyciszenia czy degradacji mRNA, doprowadzić specyficznie do wybranych celów. RNA ma tę zdolność dołączania się do innych RNA czy DNA poprzez base-pairing, czego białko nie potrafi. Dlatego też microRNA ewoluują tak szybko. To znow badania prowadzone głównie na roślinach. Są klasy microRNA, które są jeszcze niedojrzałe. Wystarczy mieć tzw. szpilkę (hairpin; o długości około 100 nukleotydów) – to jest podstawa struktury, z której microRNA jest wycinane. Takich struktur, gdy fałduje się RNA komórkowe, są dziesiątki tysięcy. Mutacja może spowodować, że jedna ze szpilek zaczyna przypominać substrat dla enzymów wytwarzających microRNA i zaczyna się ewolucja w tym kierunku. U *Chlamydomonas* czy *Caenorhabditis elegans* tych szpilek produkujących miRNA jest tylko około stu. Ze wzrostem złożoności organizmów wyewoluowały ich nowe formy. Może dlatego aż tyle z około tysiąca microRNA aktywnych u ssaków funkcjonuje w neuronach. Złożoność procesów w mózgu może wymagać bardzo wyszukanej regulacji. Na przykład aksony muszą znaleźć swoją drogę w czasie rozwoju, żeby się dotrzeć do innych neuronów.

Wiele procesów w mózgu jest pod regulacją RNA.

W mózgu jest największa różnorodność microRNA. To dlatego bardzo wielu naukowców zajmuje

się w tej chwili neuronami. Komórki nerwowe mają rozmaite przedziały komórkowe – kompartmenty. Lokalna stymulacja neuronów jest istotna dla trwałego zapisu pamięciowego (long-term memory). MicroRNA często działają jako odwracalne inhibitory. MicroRNA dołącza się do mRNA, blokując go, gdy się odłącza mRNA, znow jest aktywny. To jest w tej chwili najlepszy kandydat na regulowanie procesów translacji w dendrytach. Jest wiele danych wskazujących na to, że właśnie w neuronach przy synapsach microRNA blokują translację, a stymulacja synapsy powoduje chwilowe odłączenie microRNA lub jego degradację i aktywację procesu translacji. Ostatnie nasze badania prowadzone przez bardzo zdolnego doktoranta Jacka Króla (rodem z Poznania) pokazały, że microRNA w neuronach mają szalenie szybki katabolizm. Bez przerwy są degradowane, a nowe syntetyzowane. Przymuszczałam więc się to z aktywacją translacji w neuronach. Być może microRNA jest degradowany lokalnie po aktywacji synapsy. Nowy musi być wytworzony, by przyjść z nowym mRNA. W innych tkankach microRNA są wyjątkowo stabilne, a w neuronach coś się aż gotuje. Ale nie wiemy, czemu dokładnie to służy. W neurobiologii jest wiele ciekawych rzeczy do poznania. Nie tylko małe, ale i duże RNA wydają się bardzo zaangażowane w regulację genów w neuronach. Podobnie epigenetyka i szczególnie neuroepigenetyka to – dziedzina, która będzie rozwijała się przez najbliższe dziesiątki lat. Ciągle też jest pytanie, jak z tej jednej zapłodnionej komórki jajowej poprzez regulację chromatyny ze stadium totipotentnych komórek można wytworzyć każdą tkankę. W tym wszystkim RNA odgrywają kluczową rolę.

Rozmawiała Patrycja Dołowy
Warszawa, listopad 2011.

Chcesz wiedzieć więcej?

Krol J., Loedige I., Filipowicz W. (2010). Regulation of miRNA Biogenesis, Function and Decay. *Nature Reviews Genetics* 11, 597-615.