



Zastosowanie cząsteczek RNA w modelowaniu ekspresji wybranych genów

Marcin Pieczyński, Dawid Bielewicz, Jakub Dolata,
Zofia Szwejkowska-Kulińska

Zakład Ekspresji Genów, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii,
Wydział Biologii, Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

The use of RNA molecules in modeling of gene expression

Summary

Gene silencing and modeling of gene expression are classical approaches in studying gene functions. There are many methods available which use RNA molecules as gene silencing inducers or gene expression modulators. RNA molecules act at different levels of gene expression: chromatin structure, gene transcription and pre-mRNA maturation. In the last decade, new methods for silencing and modeling of gene expression emerged, utilizing RNAi phenomenon, trans-splicing, RNA directed DNA methylation, ribozymes, artificial microRNAs, riboswitches, and UI interference. In this paper, we review some of the methods which were successfully used for gene function studies and as therapeutic tools against different plant and human diseases.

Key words:

gene expression, trans-splicing ribozymes, RNAi, PTGS, VIGS, TGS, amiRNA, riboswitch.

1. Wstęp

Ostatnia dekada przyniosła w biologii molekularnej poznanie pełnej sekwencji genomu człowieka, niedługo potem genomów szeregu innych kręgowców, bezkręgowców, wielu roślin takich jak rzodkiewnik, kukurydza, ryż, nie mówiąc już o sekwencjach genomów organizmów prokariotycznych, których obecnie znamy ponad tysiąc. Z kolei badania bioinformatyczne pozwoliły

Adres do korespondencji

Zofia
Szwejkowska-Kulińska,
Zakład Ekspresji Genów,
Instytut Biologii
Molekularnej
i Biotechnologii,
Wydział Biologii,
Uniwersytet
im. Adama Mickiewicza,
ul. Umultowska 89,
61-614 Poznań.

zlokalizować i zidentyfikować geny, sekwencje promotorowe, porównać je między różnymi grupami organizmów. Gwałtownie rozwijającej się genomice strukturalnej towarzyszył i nadal towarzyszy równoległy rozwój genomiki funkcjonalnej, co pozwoliło na identyfikację genów ulegających ekspresji w wielu tkankach, na różnych etapach rozwoju i w odpowiedzi na zmiany warunków środowiskowych. Zidentyfikowano geny ulegające ekspresji w odpowiedzi na atak patogenów, chłód, suszę, zasolenie, skażenie środowiska, a także poznano zaburzenia ekspresji genów w przypadku różnych chorób o podłożu genetycznym. Obecnie intensywnie rozwijają się techniki, które umożliwiają modelowanie ekspresji wybranych genów. Celem badań z użyciem takich technik jest poznanie funkcji genów, a także zastosowanie takiego modelowania w terapii genowej, czy w ulepszaniu odmian roślin użytkowych. W przedstawionej pracy omówiono wybrane metody wyciszania i modelowania ekspresji genów przy użyciu cząsteczek RNA.

2. Wyciszanie genów poprzez RNAi u zwierząt

W celu wyciszenia ekspresji badanych genów u zwierząt często stosuje się konstrukty ekspresyjne, kodujące RNA tworzące struktury typu spinki do włosów (shRNA, ang. *short hairpin RNA*). Długość ramion trzonu spinki wynosi najczęściej około 100 nt. Z dwuniciowego trzonu powstają siRNA, które analizuje się przede wszystkim pod kątem ich przydatności w potencjalnej terapii przeciwnowotworowej. Obecnie najbardziej obiecującym systemem uzyskania transkryptów typu spinka do włosów w zwierzęcej komórce jest system wykorzystujący wirusa AAV (ang. *Adeno-Associated Virus*), choć stosuje się również systemy oparte na wektorach adeno- lub lentiwirusowych. AAV należy do rodziny parwirusów. Jego kapsyd charakteryzuje się symetrią ikozaedralną, a genom reprezentuje jednoniciowy DNA (ssDNA). W organizmie ludzkim nie dochodzi do reakcji immunologicznej po infekcji tym wirusem. Infekuje on nie tylko komórki dzielące się co oznacza, że można go wykorzystać w przypadku terapii komórek wyspecjalizowanych np. neuronowych. W zależności od serotypu wirus wykazuje zróżnicowane powinowactwo do różnego rodzaju komórek. Najczęściej wykorzystywanym serotypem jest AAV2 (1). W konstrukcjach ekspresyjnych wprowadzonych do DNA wirusa i upakowanych do kapsydów AAV2 wykorzystuje się różne promotory polimerazy RNA II lub III. Najczęściej wykorzystywany jest promotor U6 snRNA lub H1 RNazy P (2). Ubocznym efektem wykorzystywania wymienionych promotorów jest jednak aktywacja odpowiedzi immunologicznej poprzez interferon, najprawdopodobniej poprzez rozpoznawanie trójfosforanu na końcu 5' shRNA przez białko RIG-I (ang. *Retinoic Acid-Inducible Protein*) (3). Oczywiście w przypadku terapii przeciwnowotworowej stymulacja systemu immunologicznego niekoniecznie jest niepożądanym efektem. Wykorzystanie konstruktów składających się z jednostki transkrypcyjnej tRNA (transkrypt polimerazy RNA III posiadający trójfosforan na końcu 5') za którą znajduje się sekwencja shRNA pozwala uniknąć aktywacji systemu immunologicznego, gdyż RIG-I

jest białkiem cytoplazmatycznym, a dojrzewanie tRNA (również uwolnienie shRNA z monofosforanem na końcu 5') następuje w jądrze (4).

Zastosowanie shRNA wyciszających ekspresję genu *HEC1* (ang. *Highly Expressed in Cancer1*) przyniosło bardzo obiecujące wyniki jeśli chodzi o skuteczne niszczenie komórek nowotworowych (5). Wykazano również, że ekspresja shRNA skierowanego na gen *LMP-1* (ang. *Latent Membrane Protein 1*) wirusa EBV (ang. *Epstein-Barr Virus*) może zahamować przerzuty nowotworu (6).

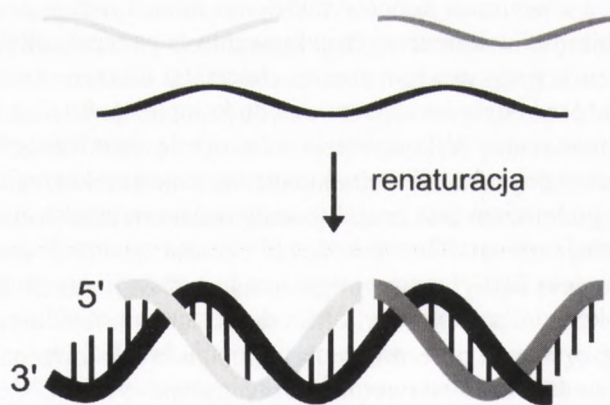
Bardzo interesujące wyniki stosowania shRNA uzyskano w badaniach związanych z jednostką chorobową zwaną retinopatią barwnikową (łac. *retinitis pigmentosa*). Choroba związana jest z występowaniem ponad stu różnych mutacji w genie *RHO*, co stwarza techniczną barierę wynalezienia skutecznej metody leczenia. W przypadku retinopatii barwnikowej zaprojektowano konstrukt generujący jednocześnie shRNA oraz prawidłową wersję białka RHO. Gen kodujący shRNA oraz gen *RHO* były pod różnymi promotorami i nie nachodziły na siebie. Powstające siRNA nakierowane były na zakonserwowany region endogennego genu *RHO*. Natomiast w egzogennym genie *RHO*, w rejonie zakonserwowanym, zostały wprowadzone inne kodony, które nie zmieniały sekwencji aminokwasowej białka RHO i jednocześnie powodowały, że sekwencja ta nie była rozpoznawana przez siRNA (ang. *small interfering RNA*) (7).

Modelowanie ekspresji genów poprzez syntetyczne siRNA wykorzystuje się prawie wyłącznie u zwierząt, gdyż u roślin występują duże utrudnienia związane z dostarczaniem takich cząsteczek do komórek. Jednak nawet u zwierząt wydajność inkorporowania syntetycznych siRNA do kompleksu RISC jest dziesięciokrotnie niższa w porównaniu do cząsteczek siRNA generowanych z shRNA, a po 48 godzinach w komórce pozostaje zaledwie 1% dostarczonych cząsteczek. Syntetyczne siRNA są szeroko wykorzystywane jako narzędzie do wyciszania genów u zwierząt z uwagi na stosunkowo niski koszt syntezy chemicznej krótkich RNA oraz fakt, że w niektórych podejściach zależy właśnie na przejściowym obniżeniu ekspresji danego genu (8). Zaobserwowano, że wykorzystanie 29 nt cząsteczek siRNA zamiast 19-21 nt znacząco zwiększa wydajność inkorporowania takich siRNA w kompleks RISC, natomiast modyfikacja chemiczna końców takich cząsteczek może prowadzić do ich zwiększonej stabilności w komórce. Projektowanie cząsteczek siRNA na podstawie docelowej sekwencji genu nie jest proste, chociażby dlatego, że kryteria wyboru nici z dupleksu, która będzie inkorporowana do kompleksu RISC są trudne do przewidzenia i kontrolowania. Wykorzystanie w procesie interferencji RNA nieodpowiedniej nici może spowodować niepożądane wyciszenie ekspresji innych genów. Bardzo częstym podejściem jest projektowanie asymetrycznych nici siRNA, z których nić o mniejszej termostabilności końca 5' (wyższa zawartość par AU) jest inkorporowana w kompleks RISC. Innym podejściem jest zastąpienie grupy fosforanowej na metylową na końcu 5' tylko jednej nici z dupleksu co powoduje, że nić komplementarna będzie preferencyjnie włączana w kompleks RISC (9).

Hosbach na podstawie obserwacji, że w natywnych pre-miRNA między miRNA/miRNA* występuje kilka niesparowań (miRNA* jest cząsteczką RNA hybrydującą

z miRNA w dupleksie; dupleks zostaje wycięty ze struktury RNA typu spinka do włosów, występującej w pre-miRNA, a reakcję katalizuje endonukleaza typu Dicer), postanowił wykorzystać tę cechę w konstruowaniu dgRNA (ang. *double-guide RNA*) (10). dgRNA są to krótkie dupleksy RNA (długości 21 nt, z wystającymi dwoma nukleotydami na końcach 3'), których każda nić może być włączona w kompleks RISC i zapoczątkować specyficzne potranskrypcyjne wyciszenie ekspresji dwóch różnych genów. W pierwszym eksperymentalnym podejściu dgRNA został zaprojektowany w ten sposób by każda nić z dupleksu posiadała miejsce docelowego działania w różnych regionach mRNA laminy A/C. Wydajność wyciszenia ekspresji genu z zastosowaniem takiego konstruktu była porównywalna z wydajnością wyciszenia z zastosowaniem konwencjonalnych siRNA. Kolejnym krokiem było stworzenie dgRNA, który powodował wyciszenie ekspresji dwóch różnych genów. Uzyskano jeden rodzaj dgRNA, który powodował wyciszenie ekspresji genu laminy A/C oraz emeryny. Wydajność wyciszenia była porównywalna z wydajnością stosowania dwóch różnych konwencjonalnych siRNA. Niestety, poziom zaawansowania obecnych algorytmów jest niewystarczający aby dokładnie przewidywać i tworzyć wydajnie działające dgRNA na dwa różne geny. Bramsen (11) zaproponował strategię pozwalającą uniknąć niespecyficznego działania nici komplementarnej poprzez tworzenie tzw. sisiRNA (ang. *Small Internally Segmented Interfering RNA*). Podczas gdy nić inkorporowana do kompleksu RISC składa się z pojedynczego fragmentu RNA, nić komplementarna składa się z dwóch osobnych fragmentów, nie połączonych wiązaniem fosfodiestrowym, co ostatecznie prowadzi do otrzymania sisiRNA, składającego się z trzech nici (rys. 1). Skuteczne działanie sisiRNA potwierdzono wyciszając, z bardzo dobrą wydajnością, ekspresję trzech różnych genów (11).

W terapii przeciwnowotworowej bardzo interesującą metodą leczenia mogłoby być zastosowanie dwufunkcyjnych siRNA. Uzyskany siRNA reprezentować będzie fragment wyciszający ekspresję genu *Bcl-2*, a obecność trójfosforanu na obu koń-



Rys. 1. Schemat budowy sisi RNA.

cach 5' siRNA będzie aktywować białko RIG-1. Białko Bcl-2 jest białkiem antyapoptycznym, którego nadekspresja może być przyczyną odporności niektórych nowotworów na chemioterapie. Aktywacja białka RIG-1 następuje poprzez rozpoznanie trójfosforanu na końcu 5' siRNA i prowadzi do uruchomienia interferonowej odpowiedzi immunologicznej. Poeck (12) do uzyskania dwufunkcyjnych siRNA przeprowadził transkrypcję *in vitro* siRNA skierowanych przeciwko *Bcl-2* używając polimerazy RNA T7, uzyskując w ten sposób siRNA z trójfosforanem na końcu 5'.

3. Wyciszanie genów u roślin w oparciu o PTGS

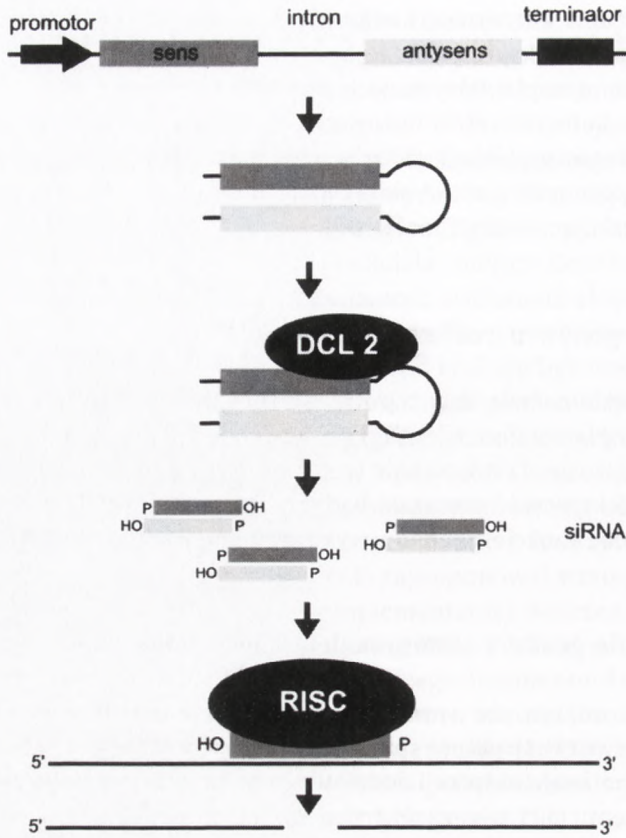
Pierwsze badania związane z potranskrypcyjnym wyciszaniem genów (PTGS, ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*) prowadzone były w oparciu o strategię antysensu oraz kosupresję. Zastosowanie tych metod przyniosło pozytywne wyniki, jednak ich niska efektywność zmuszała badaczy do poszukiwania nowych metod, pozwalających badać funkcje genów z wykorzystaniem zjawiska PTGS (13).

3.1. Wyciszanie genów z zastosowaniem konstruktów kodujących hpRNA

W roku 2001 odkryto, że wprowadzenie do genomu roślinnego sekwencji, która po transkrypcji tworzy strukturę spinki do włosów (hpRNA, ang. *hairpin RNA*), powoduje znaczne obniżenie ekspresji docelowego genu, którego mRNA był komplementarny do fragmentu nici tworzącej trzon spinki do włosów (13).

Wykorzystywane w badaniach roślin kasety ekspresyjne generujące hpRNA zbudowane są z promotora, fragmentu sekwencji docelowego mRNA w orientacji sens oraz antysens i terminatora (rys. 2). Pomiędzy dwiema sekwencjami o przeciwnej orientacji znajduje się rejon intronowy, tworzący pętlę apikalną w strukturze transkryptu. RNA transkrybowany na bazie takiego transgeny samoczynnie hybryduje sam ze sobą tworząc dwuniciową strukturę w postaci spinki. Po splicingu i eksporcie do cytoplazmy ramiona spinki do włosów nadal zawierają krótką pętlę. Trzon powstałej spinki do włosów stanowi następnie substrat w procesie generowania siRNA. Warto nadmienić, że obecność intronu w kasecie pozwala na zwiększenie wydajności eksportu dojrzałego transkryptu z jądra do cytoplazmy (13).

Większość spośród konstruktów kodujących hpRNA bazuje na silnym, konstytutywnym promotorze 35S wirusa mozaiki tytoniu (CaMV, ang. *Cauliflower Mosaic Virus*). Znane są również przykłady zastosowań tkankowo-specyficznych promotorów. Do wyciszania ekspresji genów w nasionach stosuje się promotory, np. lektyny lub napiny (14,15). U *Arabidopsis thaliana* i *Brasica napus* do wyciszenia ekspresji genów w kwiecie zastosowano promotor genu homeotycznego *APETALA1*, zawierającego kasetę MADS (16).



Rys. 2. Schemat powstawania siRNA u roślin z transkryptów typu hpRNA.

Ramiona trzonu omawianych RNA tworzących struktury typu spinka do włosów są zazwyczaj długości 300-800 nt. Zastosowanie jednak fragmentów około 100 nt jest również skuteczne (13).

Stosując system oparty na hpRNA udało się uzyskać efektywne wyciszenie różnych genów, począwszy od czynników transkrypcyjnych, przez enzymy biorące udział w podstawowym metabolizmie u roślin, skończywszy na genomach wirusów RNA (17). Nasza grupa z powodzeniem wykorzystwała metodę wyciszania genów z zastosowaniem konstruktorów hpRNA do wyciszenia genów *CBP20* i *CBP80* w tetraploidalnej roślinie ziemniaka (dane nie publikowane). W tabeli 1 prezentujemy przykłady genów skutecznie wyciszonych za pomocą hpRNA.

W celu wyciszenia ekspresji genu za pomocą hpRNA konieczne jest zastosowanie odpowiedniego systemu wektorów. Służą one do stworzenia konstruktów wyciszającego, a następnie do wprowadzenia go do rośliny. Aktualnie dostępnych jest wiele różnych wektorów, które mogą być użyte do tego celu. Przykładem mogą być

powszechnie stosowane plazmidy pHANNIBAL i pKANNIBAL (rośliny dwuliścienne) lub pSTARLING (rośliny jednoliścienne) oraz wektor binarny pART27 (13,17).

Tabela 1

Przykłady genów, których ekspresja została wyciszona za pomocą hpRNA (17)

Gen	Gatunek	Fenotyp	Literatura
<i>FAD2-1</i>	<i>G. birsutum</i>	poprawa właściwości oleju	(18)
<i>BPI</i>	<i>B. napus</i>	zwiększenie aktywności fotosyntetycznej	(16)
<i>Mald1</i>	<i>M. pumila</i>	obniżony poziom alergenów	(19)
<i>LeExp1</i>	<i>S. lycopersicum</i>	ulepszone walory smakowe	(20)
<i>COR</i>	<i>P. somniferum</i>	obniżenie właściwości narkotycznych	(21)
<i>DFR</i>	<i>R. hybrida</i>	niebieskie kwiaty	(22)
<i>iaaM, ipt</i>	<i>J. regia</i>	odporność na guzowatość korzeni	(23)
<i>Lolp1, Lolp2</i>	<i>L. perenne</i>	obniżony poziom alergenów	(24)

Warty uwagi jest również system *Gateway*. Zastosowane w nim rozwiązania bardzo ułatwiają i przyspieszają prace, co pozwala uzyskiwać konstrukty hpRNA na dużą skalę, działające na wiele różnych genów (17).

3.2. Wyciszanie genów indukowanych przez infekcję wirusową

Pozyskanie informacji na temat wzajemnych interakcji wirus-gospodarz i mechanizmów wyciszania ekspresji roślinnych genów pozwoliło na opracowanie systemu VIGS (ang. *Virus Induced Gene Silencing* – wyciszanie genów indukowane wirusem).

Pierwszym wirusem wykorzystanym jako wektor do wyciszania ekspresji genów był wirus mozaiki tytoniu (TMV, ang. *Tobacco Mosaic Virus*). Stworzone *in vitro* transkrypty zrekombinowanego TMV zawierające fragment sekwencji kodującej genu desaturazy fitoelonowej (*PDS*, ang. *Phytoene Desaturase*) zostały wprowadzone do genomu *Nicotiana benthamiana* i otrzymano rośliny z wyciszoną ekspresją *PDS* (25).

W ostatnich kilku latach technikę VIGS zastosowano z powodzeniem również w przypadku gatunków roślin z rodziny motylkowatych (26), psiankowatych (27) oraz dla szeregu gatunków zbóż (28), a także w przypadku gatunków roślin modelowych, rzodkiewnika zwyczajnego (*Arabidopsis thaliana*) oraz topoli kalifornijskiej (*Populus trichocarpa*), których genomy zostały już całkowicie zsekwencjonowane (29,30) [<http://www.genomenetwork.org/>].

Największą zaletą stosowania VIGS, jako narzędzia do wyciszania ekspresji genów, jest relatywnie krótki czas przeprowadzenia eksperymentu i łatwość w zaobserwowaniu fenotypu rośliny z wyciszonym genem.

Przykładowe wektory służące do wyciszania ekspresji genów u roślin w procesie VIGS oparte są na RNA wirusa, BMV (ang. *Brome Mosaic Virus*) (31), wirusa BSMV (ang. *Barley Stripe Mosaic Virus*) (28) oraz wirusa nekrotycznej kędzierzawki tytoniu (TRV, ang. *Tobacco Rattle Virus*). Wektor na bazie TRV wywołuje jedynie łagodne objawy infekując przy tym dużą liczbę komórek. W przeciwieństwie do innych wirusów, z jego udziałem można wyciszyć geny ulegające ekspresji w tkankach merystematycznych (32).

W zainfekowanych komórkach roślinnych powstają kompletne cząstki wirusowe, które rozprzestrzeniając się uaktywniają mechanizm obronny gospodarza. Skutkuje to zarówno blokowaniem wirusowej replikacji jak i ekspresji docelowej, endogennej cząsteczki mRNA poprzez VIGS. Po około 3-4 tygodniach możliwe jest obserwowanie fenotypu powiązanego z inaktywacją wybranego genu (33).

Poza wirusami posiadającymi materiał genetyczny w postaci RNA, w modelowaniu ekspresji genów wykorzystuje się również wirusy DNA. Przykładem są dwa geminowirusy: TGMV (ang. *Tomato Golden Mosaic Virus* – wirus złotej mozaiki pomidora) oraz CaLCuV (ang. *Cabbage Leaf Curl Virus* – wirus kędzierzawych liści kapusty) (34).

Innym systemem wektorów działającym w oparciu na VIGS jest SVISS (ang. *Satellite Virus – Induced Silencing System*). Wirus satelitarny jest niezdolny do samodzielnego wywołania infekcji. Jego rozwój w pełni uzależniony jest od obecności wirusa wspomagającego (ang. *helper virus*). System ten został rozwinięty na bazie satelitarnego wirusa STMV (STMV, ang. *Satellite Tobacco Mosaic Virus*), jako wektora niosącego fragment sekwencji wyciszanego genu oraz RNA TMV jako wirusa pomocniczego (34).

Wirusy takie jak PVX (ang. *Potato Virus X*), TMV czy STMV nie kodują inhibitorów roślinnych mechanizmów wyciszających. Są jednak takie wirusy jak CMV (ang. *Cucumber Mosaic Virus* – wirus mozaiki ogórka), TEV (ang. *Tobacco Etch Virus* – wirus wżerkowej plamistości tytoniu) oraz CRV (ang. *Cymbidium Ringspot Virus* – wirus plamistości pierścieniowej storczyka), których białka blokują mechanizmy wyciszania. Z tej właśnie przyczyny nie są one dobrymi wektorami dla systemu VIGS (34).

Należy pamiętać, że efektywność wyciszenia jak i objawy infekcji mogą się znacząco różnić w przypadku różnych kombinacji wektorów i gospodarzy roślinnych. W tabeli 2 pokazano przykłady wirusów, dla których stworzono wydajne wektory wyciszające.

Tabela 2

Przykłady genów, których ekspresja została wyciszona za pomocą wektorów wirusowych, wg (34) zmieniona

Gen	Gatunek	Wirus
1	2	3
desaturaza fitoenuowa (<i>PDS</i>)	<i>N. benthamiana</i>	TMV
desaturaza fitoenuowa (<i>PDS</i>)	<i>N. tabacum</i>	STMV
desaturaza fitoenuowa (<i>PDS</i>)	<i>A. thaliana</i>	CaLCuV
desaturaza fitoenuowa (<i>PDS</i>)	<i>H. vulgare</i>	BSMV

1	2	3
syntaza celulozowa (<i>CesA</i>)	<i>N. benthamiana</i>	PVX
antygen jądrowy komórek proliferujących (<i>PCNA</i>)	<i>N. benthamiana</i>	TGMV
kalretikulina 1 (<i>CTR1</i>)	<i>N. benthamiana</i>	TRV

Pomimo wielu zalet, jakie niesie ze sobą zastosowanie VIGS, istnieją pewne ograniczenia związane z tą techniką. Wyciszanie przy zastosowaniu wektorów wirusowych rzadko skutkuje całkowitym zahamowaniem aktywności docelowego genu. Istnieje zatem możliwość, że poziom transkryptyu będzie na tyle wysoki, aby w komórce powstała znacząca ilość funkcjonalnego białka, co z kolei skutkować będzie brakiem zmian fenotypowych. Częstym problemem jest również brak powtarzalności wyników w kolejnych eksperymentach i w przypadku różnych roślin. Kolejną przeszkodę stanowią interakcje pomiędzy patogenem a gospodarzem. Infekcja wirusowa może mieć wpływ na rozwój rośliny. Objawia się to najczęściej zaburzoną wzrostem i zmienioną morfologią liści. Wirusy takie jak PVX oraz TMV są eliminowane z tkanek merystematycznych, zatem ich wykorzystanie przy badaniu funkcji genów związanych z rozwojem pędów, liści, kwiatów i owoców może być mało efektywne. Pewne ograniczenia w stosowaniu VIGS nie powinny jednak przysłaniać dużego potencjału, jaki niesie za sobą ta metoda (33).

4. Wykorzystanie zjawiska transkrypcyjnego wyciszania genów w regulacji ekspresji genetycznej

Wyciszanie ekspresji genów na poziomie transkrypcyjnym – TGS (ang. *Transcriptional Gene Silencing*) – jest procesem epigenetycznym, skutkującym wyciszeniem transgenu lub genu endogenego poprzez inaktywację jego sekwencji promotorowej. Dzieje się tak za sprawą metylacji reszt cytozynowych w DNA, która jest zjawiskiem powszechnym u roślin i zwierząt. Proces ten pełni istotną rolę w regulacji ekspresji powtórzonych sekwencji, takich jak transpozony. Wykazano, że u *Arabidopsis* powtórzone sekwencje są bogatym źródłem rasiRNA (ang. *repeat associated small interfering RNA*). Cząsteczki te biorą udział w metylacji DNA, a tym samym wywołują transkrypcyjne wyciszenie sekwencji powtórzonych w genomie roślinnym (35). Transkrypcyjne wyciszanie genów jest również skutkiem specyficznej metylacji reszt lizynowych nr 9 i 27 histonu H3 (36). W roku 1994 po raz pierwszy pokazano, że homologiczne transgeny wirusowego cDNA wprowadzone do roślin mogą ulegać metylacji na skutek replikacji wprowadzonego wirusowego RNA, co sugerowało mechanizm metylacji DNA zależnej od RNA (RdDM, ang. *RNA-directed DNA Methylation*) (37). Inicjatorem RdDM, a następnie TGS, może być zarówno powstały z transgenu dsRNA jak i endogenna cząsteczka siRNA (38). W zależności od sekwen-

cji dsRNA, RdDM może zachodzić w obrębie otwartej ramki odczytu lub sekwencji promotorowej (39,40). W pierwszym przypadku metylacja DNA nie prowadzi do zjawiska TGS (41). Proces transkrypcyjnego wyciszania genów u roślin jest nadal szeroko badany. Należy oczekiwać, że w przyszłości możliwe będzie jego wykorzystanie do wyciszania genów u roślin.

Proces TGS u zwierząt został odkryty później niż u grzybów lub roślin. Wyciszenie ekspresji w komórkach zwierzęcych następuje również poprzez metylację lizyny 9 i 27 histonu H3 oraz na pewno w procesie tym uczestniczy polimeraza RNA II. Metylacja DNA w procesie TGS u zwierząt pozostaje jak do tej pory sprawą ostatecznie nie wyjaśnioną (42). Terapeutyczne działanie dupleksów RNA poprzez TGS może być skuteczne w przypadku blokowania cyklu życiowego wirusa HIV (ang. *Human Immunodeficiency Viruse*) lub SIV (ang. *Simian Immunodeficiency Viruse*) (43). Najbardziej skutecznym siRNA, działającym wobec zintegrowanego z genomem fragmentu genomu wirusa HIV-1, był dupleks posiadający sekwencję komplementarną do promotora U3 fragmentu 5'LTR. W kulturach komórkowych transfekowanych siRNA poziom ekspresji odwrotnej transkryptazy był tysiącrotnie niższy w porównaniu do kultury kontrolnej i utrzymywał się aż trzydzieści dni. W przypadku wirusa SIV najskuteczniejszym był siRNA, którego sekwencja była komplementarna w obrębie 5'LTR około 200 nukleotydów powyżej miejsca startu transkrypcji, a namnażanie wirusa zostało zredukowane ponad dziesięć tysięcy razy (43). Bardzo interesująca jest obserwacja, że u zwierząt antysensowna nić powoduje identyczne efekty co wprowadzenie siRNA (44).

Zrozumienie, a tym bardziej wykorzystanie krótkich cząsteczek RNA działających na poziomie transkrypcyjnym, stało się jeszcze bardziej skomplikowane gdy odkryto, że niektóre siRNA mogą promować transkrypcję. Najlepiej opisanym genem, którego ekspresja jest aktywowana poprzez siRNA jest gen kodujący receptor progesteronu (*PR*). W przeprowadzonych badaniach siRNA był komplementarny do sekwencji promotorowej genu *PR* (nukleotydy od -11 do +8). W komórkach MCF17 transfekowanych siRNA poziom *PR* wzrósł 18-krotnie w porównaniu do komórek kontrolnych. Zastosowanie natomiast do transfekcji krótkich dupleksów RNA komplementarnych do sekwencji kodującej genu receptora progesteronu spowodowało oczekiwane obniżenie poziomu transkryptu (45). Aktywacja transkrypcji związana jest z deacetylacją histonu H3, natomiast najprawdopodobniej dwa białka AGO1 i AGO2, uczestniczące w transkrypcyjnym wyciszeniu ekspresji genów w wyniku działania siRNA, w procesie aktywacji transkrypcji nie biorą udziału (45).

5. Wyciszanie ekspresji genów z wykorzystaniem rybozymów

Rybozomy są cząsteczkami RNA o właściwościach katalitycznych. Dotychczas zidentyfikowano następujące rybozomy: introny grupy I (46), introny grupy II, RNazę P, rybozomy typu głowa młotka, *hairpin*, *delta*, *VS* (47). W warunkach naturalnych ry-

bozymy biorą udział w dojrzewaniu niektórych transkryptów, a także w replikacji wirusowego RNA. Rybozymy można również projektować tak aby specyficznie hamować ekspresję wybranego genu poprzez rozcinanie docelowego transkryptu.

Większość rybozymów hybrydyzuje na zasadzie komplementarności zasad z docelową sekwencją RNA stanowiącą substrat. Cechę tę można wykorzystać konstruując sztuczne rybozymy: rejon hybrydujący rybozymu można wymienić i dopasować do sekwencji wyciskanego transkryptu (48). Zatem rybozymy stanowią narzędzie do specyficznej inaktywacji ekspresji genów. Rybozymy wykorzystuje się zarówno przeciwko wirusowemu RNA, endogennym transkryptom jak i wprowadzonym transgenom. Dzięki specyfice swojego działania rybozymy wykorzystywane są zarówno w badaniu funkcji poszczególnych genów jak również mogą mieć zastosowanie terapeutyczne (49).

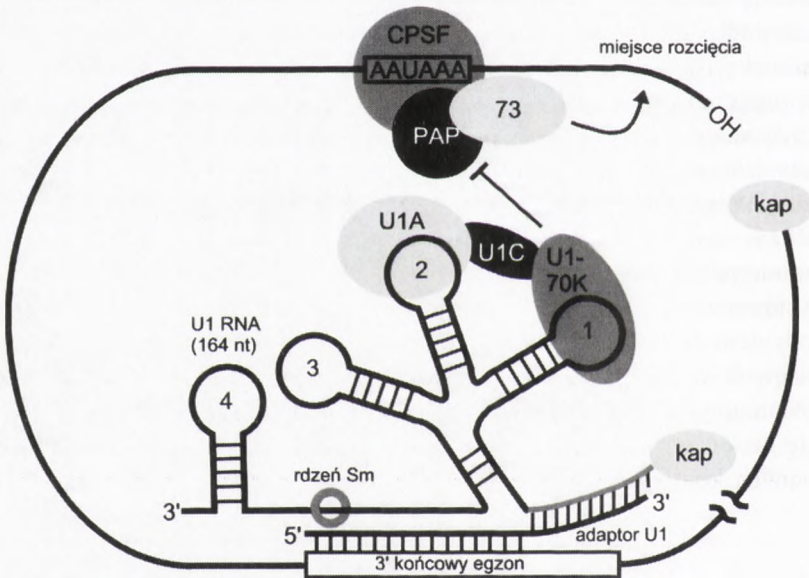
Rybozymy stosuje się raczej rzadko w przypadku wyciszania roślinnych genów. Wykazano, że rybozymy obniżają poziom wprowadzonych genów reporterowych w roślinnych protoplastach (50). Podobne rezultaty zostały osiągnięte m.in. dla fosfotransferazy neomycyny (npt II, ang. *neomycin-phosphotransferasu II*) w transgenicznym roślaku tytoniu (51) oraz dla genu kodującego pirofosforylaze UDP-glukozy w ziemniaku (52). Za pomocą leadzemu udało się zablokować infekcję powodowaną przez wirusa TMV w roślinach tytoniu (53).

Dużym wyzwaniem w stosowaniu rybozymów do modelowania ekspresji genów jest wybranie odpowiedniego promotora do ekspresji rybozymów w komórce. Ekspresja powinna zachodzić na stosunkowo wysokim poziomie w komórce, a rybozym musi mieć tę samą lokalizację subkomórkową co docelowy transkrypt.

W przypadku dostarczania do komórek zwierzęcych „nagich” RNA, modyfikuje się cząsteczkę rybozymu, wprowadzając grupy metylowe do rybozy, zwiększając w ten sposób ich odporność na nukleazy (54). Syntetyczne rybozymy typu głowa młotka były szeroko testowane w próbach terapii przeciwwirusowej np. Heptazyme w terapii przeciw HCV (ang. *Hepatitis C Virus*) lub HerBzyme przeciw HBV (ang. *Hepatitis B Virus*). W badaniach przedklinicznych redukcja replikacji wirusa wynosiła ponad 85% podczas zastosowania Heptazyme oraz interferonu (54,55). Niestety badania kliniczne nie przyniosły oczekiwanych wyników. Prowadzi się obecnie badania nad wykorzystaniem rybozymów typu RNaza P oraz typu *delta* (56). RNaza P jest w naturze rybozymbem działającym w *trans*, co może ułatwić jego modyfikacje do celów terapeutycznych. W przypadku zwierząt wykazano potencjalne zastosowanie RNazy P w hamowaniu cyklu życiowego wirusa HSV-1 (ang. *Herpes Simple Virus-1*): obniżono ekspresję genów wirusa w 90%, a 4000 razy zredukowano namnażanie wirusa w zainfekowanych komórkach.

6. Interferencja U1 jako metoda regulacji ekspresji genów u Eukaryota

Niedawno została opublikowana metoda wyciszania genów, w której wykorzystywane są zupełnie inne mechanizmy niż strategia antysens, interferencja RNA czy też rybozomy (57). Interferencja U1 (U1i – ang. *U1 snRNA-interference*) jest bardzo wydajną, nowatorską metodą wyciszania ekspresji genów u Eukaryota. Wyciszenie zachodzi na jednym z etapów dojrzewania pre-mRNA – poliadenylacji. Dojrzewanie pre-mRNA obejmuje przyłączenie do końca 5' transkryptu struktury kap (m^7G), splicing i utworzenie na końcu 3' mRNA ogona poli(A). W procesach tych uczestniczy bardzo wiele białek oraz kompleksów rybonukleoproteinowych m.in. U1 snRNP (ang. *U1 Small Nuclear Ribonucleoprotein*). U1 snRNP składa się z U1 snRNA (165 nt) oraz związanych z nim dziesięciu białek: siedmiu białek Sm oraz U1A, U1C i U1-70K. U1 snRNP bierze udział w rozpoznaniu donorowego miejsca splicingowego poprzez komplementarne oddziaływanie rejonu 5' intronu z końcem 5' U1 snRNA. Zaobserwowano, że u papillomawirusów U1 snRNP pełni funkcję inhibitora ekspresji genów późnych wirusa. W mRNA wirusa ostatni egzon na końcu 3' posiada miejsce wiązania U1 snRNA. Związanie U1 snRNA z końcem 3' ostatniego egzonu uniemożliwia poliadenylację mRNA poprzez bezpośrednie oddziaływanie białka U1-70K z poli(A) polimerazą. mRNA bez ogona poliA ulega szybkiej degradacji. Metoda U1i opiera się na wykorzystaniu dwufunkcyjnego oligonukleotydu (25 nt długości), którego koniec

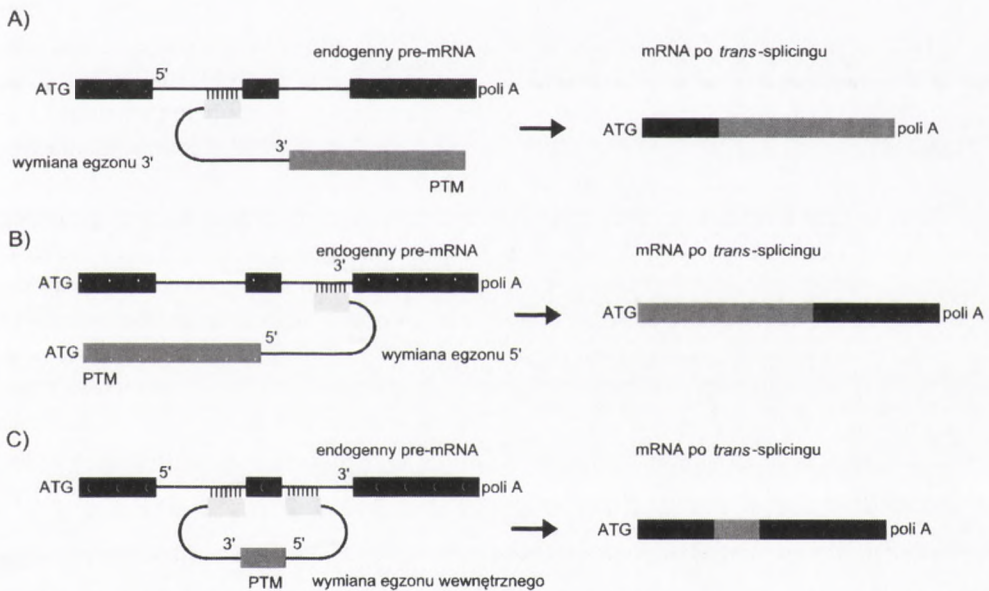


Rys. 3. Schemat przebiegu interferencji U1 (wg [58] – zmodyfikowany). Opis szczegółowy w tekście. CPSF, ang. *Cleavage Polyadenylation Specific Factor*, 73 – podjednostka CPSF o aktywności endonukleazowej.

5' (około 10 nt) jest komplementarny do ostatniego egzonu docelowego mRNA, natomiast koniec 3' jest komplementarny do końca 5' U1 snRNA (rys. 3). Białko U1-70K oddziałuje wtedy z polimerazą poli(A) blokując jej aktywność. Docelowy pre-mRNA, który nie uległ poliadenylacji zostaje zdegradowany (58). Wyciszenie ekspresji genów metodą, w której wykorzystuje się adaptory U1 jest bardziej specyficzne niż metoda RNAi. Jej ograniczeniem jest fakt, że tylko RNA ulegające poliadenylacji mogą zostać potencjalnie wyciszone. Metodę zastosowano z powodzeniem do wyciszenia genów zarówno w roślinach jak i u zwierząt (59,60).

7. Zastosowanie *trans*-splicingu jako sposobu na „naprawianie” cząsteczek mRNA o zaburzonej sekwencji nukleotydowej

W leczeniu chorób wywołanych poprzez powstający nieprawidłowy transkrypt, można zastosować metodę polegającą na wprowadzeniu do komórki cDNA, z którego powstanie prawidłowy transkrypt. Ogromnym ograniczeniem w takim podejściu jest jednak długość cDNA, która nie może przekraczać 5 tysięcy par zasad. Jednym ze sposobów pokonania tego ograniczenia mogłaby być naprawa transkryptu poprzez indukcję procesu *trans*-splicingu. Zjawisko *trans*-splicingu wymaga jednoczesnej obecności trzech komponentów – dwóch komórkowych: spliceosomu i doce-



Rys. 4. Schemat przebiegu *trans*-splicingu (wg [62] – zmodyfikowany). A – zastępowanie egzonów z końca 5', B – zastępowanie egzonów z końca 3', C – zastępowanie egzonu znajdującego się wewnątrz sekwencji kodującej.

lowego transkryptu pre-mRNA oraz zewnętrznego, *trans*-splicingowej cząsteczki pre-mRNA (ang. *PTM, pre-mRNA Trans-Splicing Molecule*) (61). Cząsteczki PTM zasadniczo składają się z trzech domen: a) domeny wiążącej – komplementarnej do sekwencji intronowej docelowego transkryptu; b) domeny splicingowej oraz c) domeny kodującej – zawierającej egzon(y), które zostaną dołączone do docelowego transkryptu. Metodę wykorzystującą *trans*-splicing do naprawy transkryptu nazwano SMA^{RT} (ang. *Spliceosome-Mediated Pre-mRNA Trans-Splicing*). Możliwe są trzy drogi zastosowania metody SMA^{RT}: zastąpienie egzonów z końca 3' lub 5' oraz zastąpienie egzonu wewnętrznego (rys. 4). Ostatnie podejście wymaga aby PTM zawierał dwie domeny wiążące transkrypt wokół egzonu, który ma zostać zastąpiony oraz dwie domeny splicingowe (62). Pierwsze potencjalne wykorzystanie techniki SMA^{RT} zademonstrowano w mutantach myszy. U zwierząt z insercją w egzonie 16 genu czynnika VIII krzepliwości krwi nie można wykryć funkcjonalnego białka. PTM został zaprojektowany w ten sposób, aby w wyniku *trans*-splicingu rejon transkryptu od egzonu 15 do 26 został zastąpiony fragmentem kodującym wymienne egzony bez nieprawidłowej insercji. Po ośmiu tygodniach terapii poziom czynnika VIII wykazywał 25% poziomu białka obserwowanego u zdrowych myszy (63).

8. Modelowanie ekspresji genów z wykorzystaniem sztucznych mikro RNA

Mikro RNA są cząsteczkami o długości od 18 do 25 nt, które obniżają ekspresję docelowych genów u Eukaryota działając na poziomie potranskrypcyjnym. Cząsteczki te regulują bardzo ważne procesy życiowe związane z rozwojem i odpowiedzią organizmów na stres. Poznano, jak dotąd, strukturę wielu roślinnych (64), zwierzęcych oraz ludzkich genów mikro RNA (65), a także w znacznym stopniu poznano biogenezę cząsteczek mikro RNA. Znamy również mechanizm obniżania poziomu docelowych mRNA przy udziale mikro RNA.

Rozpoczęto badania nad praktycznym wykorzystaniem mikro RNA w procesie wyciszania ekspresji genów. Wykorzystuje się specjalnie zaprojektowane cząsteczki, tzw. sztuczne mikro RNA (amiRNA, ang. *artificial micro RNA*) jako narzędzia do specyficznego wyciszania ekspresji wybranych genów. Poza stosowaniem amiRNA w badaniach podstawowych, sztuczne mikro RNA można potencjalnie wykorzystywać jako czynnik zwalczający wirusy roślinne (66), ludzkie (67) oraz do walki z nowotworami (68). W przypadku badań prowadzonych na roślinach, wykorzystanie amiRNA umożliwiłoby również uzyskanie roślin o wyciszonej w znacznym stopniu ekspresji genów, których całkowite unieczynnienie, np. wskutek insercji T-DNA, jest dla rośliny letalne (69).

Pionierskie badania w tej dziedzinie wykonane zostały przez Zenga w 2002 r. na komórkach ludzkich. Okazało się, że istnieje możliwość wymiany sekwencji odpowiadającej cząsteczce mikro RNA i mikro RNA*, w obrębie prekursora genu mikro RNA, bez wpływu na wydajność procesu dojrzewania tego prekursora (70). W ten

sposób można tworzyć sztuczne, specjalnie zaprojektowane prekursorzy mikro RNA, zdolne generować w komórce dojrzałe cząsteczki sztucznych mikro RNA o dowolnej sekwencji, nakierowane na dowolny mRNA w komórce.

Dwa lata później wyniki te zostały potwierdzone przez Parizotto w badaniach przeprowadzonych na modelowej roślinie *A. thaliana* (71). W celu wyciszenia ekspresji genu reporterowego wykorzystany został naturalnie występujący prekursor genu *ath-miR171*, w którym zmieniono sekwencję odpowiadającą dojrzałej cząsteczce mikro RNA.

Na podstawie wyników kolejnych badań wykazano, że amiRNA nie tylko są w stanie doprowadzić do wyciszenia endogennego genu w roślinie, ale ponadto funkcjonują ze specyficznością porównywalną do naturalnie występujących mikro RNA. Dodatkowo możliwe okazało się równoczesne wyciszenie ekspresji kilku roślinnych genów, np. należących do jednej rodziny genowej, z wykorzystaniem tylko jednego rodzaju cząsteczek sztucznych mikro RNA. Cząsteczki amiRNA można projektować z wykorzystaniem specjalnie stworzonej do tego celu, platformy internetowej *Web MicroRNA Designer* [<http://wmd3.weigelworld.org/>] (69,72). Tylko w 2008 r. opublikowano prace pokazujące wyciszenie ekspresji genów z wykorzystaniem sztucznych mikro RNA w kolejnych gatunkach roślin, w tym: *Chlamydomonas reinhardtii* (73,74), *Physcomitrella patens* (75) oraz *Oryza sativa* (76).

Obecnie amiRNA są powszechnie wykorzystywane przede wszystkim jako narzędzie do specyficznego wyciszania ekspresji wybranych genów w roślinach (77). Prowadzone są również prace mające na celu stworzenie wysokoprzepustowego systemu do wyciszania ekspresji genów z wykorzystaniem sztucznych mikro RNA (74). Dotychczas prace prowadzone w tym kierunku dotyczą tylko glonów, należy jednak spodziewać się w przyszłości adaptacji tego systemu dla innych roślin.

Cząsteczki sztucznych mikro RNA zastosowano również w walce przeciw wirusom roślinnym (66,78-80). amiRNA został z powodzeniem zastosowany przeciwko wirusowi mozaiki rzepy (TuMV, ang. *Turnip Mosaic Virus*), wirusowi żółtej mozaiki rzepy (TYMV, ang. *Turnip Yellow Mosaic Virus*) oraz wirusowi mozaiki ogórka (CMV, ang. *Cucumber Mosaic Virus*).

W przypadku ludzi i zwierząt cząsteczki sztucznych mikro RNA nazywane są również syntetycznymi miRNA (ang. *synthetic miRNA*) bądź syntetycznymi siRNA (ang. *synthetic siRNA*) (81). Wspomniany już Yan Zeng wykorzystał konstrukt niosący pierwotny transkrypt genu *mir-30* (70) do wprowadzenia sztucznych mikro RNA do komórek zwierzęcych. Konstrukty opierające się o prekursor *mir-30* oraz prekursor *mir-155* były w późniejszych pracach najczęściej wykorzystywane (81-83). Zeng udowodnił ponadto, że możliwe jest zmodyfikowanie konstrukt niosącego prekursor *mir-30* tak, by transkrypt zawierał kilka struktur typu spinka do włosów i generował kilka rodzajów cząsteczek sztucznych mikro RNA jednocześnie (73,83). Z kolei Shibata wykazał, że możliwe jest stworzenie systemu umożliwiającego generowanie cząsteczek sztucznych mikro RNA bez wykorzystania naturalnie występujących prekursorów genów mikro RNA (84). W swoich badaniach uzyskał konstrukt niosący

sztuczny prekursor mikro RNA, podobny w swojej strukturze do prekursora mir-21, nie zawierający jednak żadnych sekwencji pochodzących ze znanych prekursorów mikro RNA. Stworzony w ten sposób system do ekspresji amiRNA, dzięki zastosowaniu wielu różnych miejsc restrykcyjnych, umożliwi sprawną wymianę fragmentu DNA niosącego sekwencję odpowiadającą sekwencji dojrzałej cząsteczki mikro RNA.

W celu projektowania sztucznych mikro RNA wykorzystywanych w badaniach na materiale zwierzęcym, stworzono wiele różnych programów. Jednym z nich jest, napisany w języku Java, program siRNARules 1.0, który okazał się wydajnym narzędziem do projektowania cząsteczek siRNA (85). W tym samym celu napisano i udostępniono również wiele programów on-line (86). Możliwe jest za pomocą tych programów projektowanie sztucznych mikro RNA nakierowanych na dowolny mRNA pochodzący z: *Homo sapiens*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus* jak i innych gatunków. Wiele programów posiada również funkcje przeszukiwania baz danych sekwencji mRNA mogących stanowić przypadkowy cel działania zaprojektowanej cząsteczki.

Cząsteczki sztucznych mikro RNA wielokrotnie wykorzystano w badaniach jako potencjalny czynnik leczniczy przeciw ludzkim wirusom HIV, HBV oraz wirusowi wścieklizny (67,87-89). Ze względu na naturalnie występujące niesparowania pomiędzy cząsteczkami mikro RNA a ich docelowymi sekwencjami, działają one skutecznie nawet w przypadku wirusów wykazujących znaczną zmienność genetyczną (67, 87,89).

Sztuczne mikro RNA wykorzystywane są również w badaniach związanych z leczeniem chorób nowotworowych (90) oraz chorób neurodegeneracyjnych (91). W przypadku tych ostatnich wiadomo, że przyczyną, jak również skutkiem choroby, jest zaburzony poziom niektórych mikro RNA w komórce. W efekcie dochodzi do zaburzenia poziomu ekspresji niektórych genów. Opisane zmiany umożliwią przeprowadzenie diagnostyki molekularnej pacjentów oraz stwarzają możliwość leczenia, poprzez wprowadzenie do komórek genów przywracających właściwy poziom niektórych mikro RNA.

Xue (92) w swoich badaniach pokazuje możliwość tworzenia bibliotek sztucznych mikro RNA. System ten umożliwia generowanie wielu prekursorów, na bazie naturalnie występującego pre-mir30, zawierających różne cząsteczki sztucznych mikro RNA, a następnie ich testowanie w poszukiwaniu cząsteczek o zamierzonym działaniu. Za pomocą tego podejścia można również poszukiwać sekwencji w obrębie docelowych cząsteczek mRNA zdolnych do hybrydyzacji z cząsteczkami mikro RNA i innymi małymi RNA.

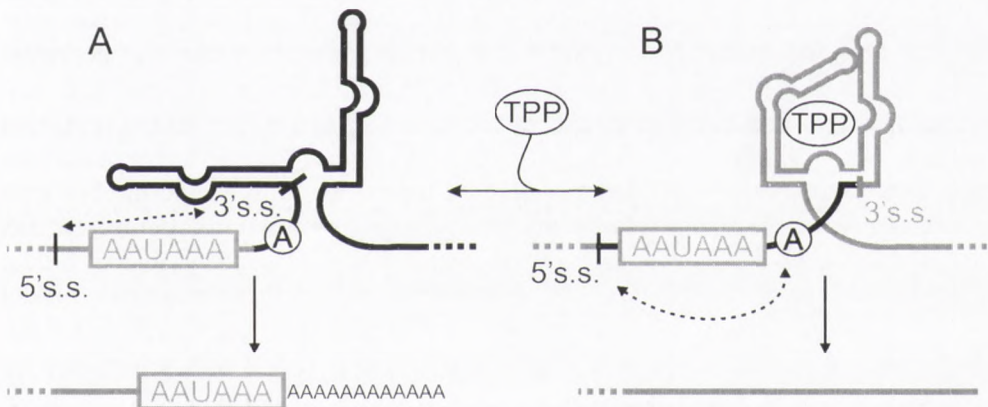
9. Ryboprzełączniki jako modulatory ekspresji genów

Ryboprzełączniki (ang. *riboswitch*) to struktury RNA regulujące ekspresję genów na poziomie transkrypcji i/lub translacji w wyniku wiązania niskocząsteczkowych

metabolitów. U bakterii zdecydowana większość z dotychczas odkrytych została zlokalizowana w regionach 5'UTR mRNA. Szacuje się, że ryboprzełączniki odpowiedzialne są za regulację ekspresji około 3% genów bakterii (93). Jako elementy odpowiedzialne za regulację ekspresji genów charakteryzują się one szczególną cechą: wysoką specyficzną rozpoznawania ligandu, którego wiązanie w niektórych przypadkach ma charakter kooperatywny. Funkcjonują one bez obecności białek oraz innych cząsteczek z wyjątkiem ligandu, który wiążą. Ryboprzełączniki mogą działać jako aktywatory lub represory ekspresji (94). Swoją funkcję spełniają one poprzez zmiany struktury przestrzennej RNA w wyniku związania ligandu. W konsekwencji zmian struktury RNA następuje udostępnienie albo zablokowanie sekwencji istotnych dla procesu transkrypcji lub translacji, np. sekwencji wiążących rybosom – RBS (ang. *Ribosome Binding Sequence*).

Dotychczas zidentyfikowano wiele różnego rodzaju ryboprzełączników mających swój udział w regulacji podstawowych szlaków metabolicznych. Ich obecność potwierdzono nie tylko u bakterii, ale również w archea oraz w organizmach eukariotycznych. U bakterii ryboprzełączniki odpowiedzialne są za regulację biosyntezy puryn, aminokwasów, witamin, S-adenozynometioniny, S-adenozynohomocysteiny, mononukleotydu flawinowego i glukozoamino-6-fosforanu (94).

Najbardziej rozpowszechnionym jest ryboprzełącznik rozpoznający pirofosforan tiaminy (TPP, ang. *Thiamine Pyrophosphate*) nazywany „THI-BOX”. Jest to jedyny ryboprzełącznik obecny u eubakterii, archea i w organizmach eukariotycznych (rys. 5) (95). W każdym przypadku wiązanie ligandu powoduje obniżenie ekspresji genów



Rys. 5. Schemat działania ryboprzełącznika rozpoznającego TPP u roślin (wg [64] – zmodyfikowany). A – w przypadku braku TPP dochodzi do zatrzymania intronu oraz utworzenia stabilnego transkryptu z ogonem poli(A), B – w przypadku obecności TPP ryboprzełącznik zmienia strukturę RNA eksponując miejsca splicingowe 5' i 3', dochodzi do wycięcia intronu oraz utworzenia długiej i niestabilnej cząsteczki mRNA, bez ogona poli(A).

A – miejsce akceptorowe, s.s. – granica egzon/intron (ang. *splice site*).

odpowiedzialnych za syntezę tiaminy. Ponadto we wszystkich badanych organizmach sekwencja domeny wiążącej TPP jest wysoce zachowawcza (94).

Na przestrzeni ewolucji pojawiły się jednak różnice pomiędzy opisywanym rybo-przełącznikiem u różnych organizmów. W przypadku bakterii gram (+) element ten oddziałuje na ekspresję operonu tiaminowego na poziomie transkrypcji (96), natomiast w bakteriach gram (-) działa on na poziomie translacji (97). Ponadto u dotąd zbadanych organizmów rybo-przełącznik tiaminowy występuje zazwyczaj w rejonie 5'UTR mRNA, z wyjątkiem roślin, w których występuje on w rejonie 3'UTR. U roślin pokazano, że związanie TPP z rybo-przełącznikiem w rejonie 3'UTR mRNA określonego genu biosyntezy tiaminy znacząco obniża stabilność transkryptu i powoduje szybką jego degradację. U *Chlamydomonas reinhardtii* (zielenica) omawiany rybo-przełącznik znajduje się w obrębie sekwencji kodującej mRNA genu *THI4*. W tym ostatnim przypadku THI-BOX hamuje ekspresję genu *THI4* na poziomie translacji (98).

U człowieka, jak dotąd, zidentyfikowano obecność przełącznika RNA biorącego udział w regulacji poziomu czynnika TNF- α . Znajduje się on w obrębie 3'UTR mRNA tego genu i wiąże 2-aminopurynę (99).

Obecnie prowadzone są w wielu ośrodkach naukowych na świecie prace mające na celu stworzenie systemu do projektowania sztucznych przełączników RNA. Zaprojektowanie takich rybo-przełączników umożliwiłoby kontrolowanie ekspresji wybranych genów nie stosowaną dotąd metodą.

Podsumowanie

Przedstawiony przegląd technik wyciszania i modelowania ekspresji genów za pomocą RNA wskazuje na ich ogromną różnorodność. Publikacje z ostatnich miesięcy pozwalają przypuszczać, że repertuar możliwości wykorzystania RNA do celów kształtowania profilu ekspresji genetycznej nie został jeszcze wykorzystany. Najnowsze badania przyniosły odkrycie cząsteczki RNA, która jest w roślinie sensorem chłodu. Jest to antysensowy transkrypt, którego ekspresja prowadzi w ostatecznym rozrachunku do wyciszenia transkrypcji właściwego genu pod wpływem obniżenia temperatury. Wprowadzenie do rośliny konstruktu niosącego pod promotorem 35S mRNA GFP, a z końca 3' promotor antysensowego RNA będącego sensorem chłodu, wywoływało wyciszenie ekspresji mRNA GFP w warunkach utrzymującej się niskiej temperatury (100). Dane mikromacierzowe (analizujące obecność transkryptów pochodzących z obu nici DNA) wskazują, że w przypadku wielu genów obserwuje się obecność antysensowych transkryptów. Być może jesteśmy u progu odkrycia nowego fenomenu związanego z syntezą antysensowych RNA i powszechną regulacją ekspresji genów. Wspomniane doświadczenie pokazuje, że być może będzie możliwe opracowanie kolejnej metody modelowania ekspresji genów: syntezy antysensowych RNA do mRNA wybranych arbitralnie genów w celu uzyskania specyficznego wyciszenia ekspresji pod wpływem zmiany warunków środowiskowych.

Stosowanie i implementacja nowych, różnorodnych technik, pozwalających na manipulację ekspresją genów w celu poznania ich funkcji, z pewnością będą się nadal intensywnie rozwijać. Czy i która z technik wykorzystujących cząsteczki RNA stanie się narzędziem powszechnie używanym w uzyskiwaniu ulepszonych odmian roślin użytkowych lub znajdzie zastosowanie w terapii genowej chorób człowieka i zwierząt – pozostaje otwartym pytaniem.

Praca wykonana w ramach projektu zamawianego PBZ-MNiSW-2/3/2006/5 finansowanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego.

Literatura

1. Choi V. W., McCarty D. M., Samulski R. J., (2005), *Curr Gene Ther.*, 5(3), 299-310.
2. Hannon G. J., Rossi J. J., (2004), *Nature*, 16(431), 371-378.
3. Bridge A. J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A. L., Iggo R., (2003), *Nat. Genet.*, 34(3), 263-264.
4. Scherer L. J., Frank R., Rossi J. J., (2007), *Nucleic Acid Res*, 35(8), 2620-2628.
5. Li L., Yang L., Scudiero D. A., Miller S. A., Yu Z. X., Stukenberg P. T., Shoemaker R. H., Kotin R. M., (2007), *Gene Ther.*, 14(10), 814-827.
6. Li X., Liu X., Li C. Y., Ding Y., Chau D., Li G., Kung H. F., Lin M. C., Peng Y., (2006), *Int. J. Oncol.*, 29(3), 595-603.
7. O'Reilly M., Palfi A., Chadderton N., Milington-Ward S., Cronin T., Tuohy T., Auricchio A., Hildinger M., Tivnan A., McNally N., Humphries M. M., Kiang A. S., Humphries P., Kenna P. F., Farrar G. J., (2007), *Am. J. Hum. Genet.*, 81(1), 127-135.
8. Rao D. D., Vorhies J. S., Senzer N., Nemunaitis J., (2009), *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 25, 61(9), 746-759.
9. Chen P. Y., Weinmann L., Gaidatzis D., Pei Y., Zavolan M., Tuschl T., Meister G., (2008), *RNA*, 14(2), 263-274.
10. Hossbach M., Gruber J., Osborn M., Weber K., Tuschl T., (2006), *RNA Biology*, 3(2), 82-89.
11. Bramsen J. B., Laursen M. B., Damgaard C. K., Lena S. W., Babu B. R., Wengel J., Kjems J., (2007), *Nucleic Acid Res.*, 35(17), 5886-5897.
12. Poeck H., Besch R., Maihoefer C., Renn M., Tormo D., Morskaya S.S., Kischnek S., Gaffal E., Landsberg J., Hellmuth J., Schmidt A., Anz D., Bscheider M., Schwerd T., Berking C., Bourquin C., Kalinke U., Kremmer E., Kato H., Akira S., Meyers R., Hacker G., Neuenhahn M., Busch D., Ruland J., Rothernfusser S., Prinz M., Hornung V., Endres S., Tutung T., Hartmann G., (2008), *Nat. Med.*, 14(11), 1256-1263.
13. Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M-B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M., (2001), *Plant J.*, (27), 581-590.
14. Smith N. A., Singht S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M., (2000), *Nature*, (407), 319-320.
15. Stoutjesdijk P. A., Singh S. P., Liu Q., Hurlstone C. J., Waterhouse P. M., Green A. G., (2002), *Plant Physiol.*, (129), 1723-1731.
16. Bryzova M., Verduyn C., de Brouwer D., de Block M., (2004), *Planta*, (218), 379-387.
17. www.pi.csiro.au
18. Liu Q., Singh S. P., Green A. G., (2002), *Plant Physiol.*, (129), 1732-1743.
19. Gilissen L. J., Bolhaar S. T., Matos C. I., Rouwendal G. J., Boone M. J., Krens F. A., Zuidmeer L., van Leeuwen A., Akkerdaas J., Hoffmann-Sommergruber K., Knulst A. C., Bosch D., van de Weg W.E., van Ree R., (2005), *J. Allergy Clin. Immun.*, 115(2), 364-369.
20. Kalamaki M. S., Harpster M. H., Palys J. M., Labavitch J. M., Reid D. S., Brummell D. A., (2003), *J. Agr. Food Chem.*, 51(25), 7456-7464.

21. Allen R. S., Millgate A. G., Chitty J. A., Thistleton J., Miller J. A. C., Fist A. J., Gerlach W. L., Larkin P. J., (2004), *Nat. Biotechnol.*, (22), 1559-1566.
22. Katsumoto Y., Fukuchi-Mizutani M., Fukui Y., Brugliera F., Holton T. A., Karan M., Nakamura N., Yonekura-Sakakibara K., Togami J., Pigeaire A., Tao G. Q., Nehra N. S., Lu C. Y., Dyson B. K., Tsuda S., Ashikari T., Kusumi T., Mason J. G., Tanaka Y., (2007), *Plant Cell Physiol.*, 48(11), 1589-1600
23. Escobar M. A., Leslie C. A., McGranahan G. H., Dandekar A. M., (2002), *Plant Sci.*, 163(3), 591-597.
24. Petrovska N., Wu X., Donato R., Wang Z., Ong E., Jones E., Forster J., Emmerling M., Sidoli A., O'Hehir R., Spangenberg G., (2004), *Mol. Breeding.*, (14), 489-501.
25. Kumagai M. H., Donson J., Della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K., Grill L. K., (1995), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (92), 1679-1683.
26. Constantin G. D., Krath B. N., McFarlane S. A., Nicolaisen M., Johansen I. E., Lund O. S., (2004), *Plant J.*, (40), 622-631.
27. Ryu C. M., Anand A., Kang L., Mysore K. S., (2004), *Plant J.*, (40), 322-331.
28. Hein I., Barciszewska-Pacak M., Hrubikova K., Williamson S., Dinesen M., Soenderby I. E., Sundar S., Jarmolowski A., Shirasu K., Lacomme C., (2005), *Plant Physiol.*, (138), 2155-2164.
29. Naylor M., Reeves J., Cooper J. I., Edwards M. L., Wang H., (2005), *J. Virol. Methods*, (124), 27-36.
30. Turnage M. A., Muangsan N., Peele C. G., Robertson D., (2002), *Plant J.*, (30), 107-114.
31. Pacak A., Strozycycki P. M., Barciszewska-Pacak M., Alejska M., Lacomme C., Jarmolowski A., Szwejkowska-Kulińska Z., Figlerowicz M., (2009), *Arch. Virol.*, on-line.
32. Ratcliff F., Martin-Hernandez A. M., Baulcombe D. C., (2001), *Plant J.*, (25), 237-245.
33. Godge M. R., Purkayastha A., Dasgupta I., Kumar P. P., (2008), *Plant Cell Rep.*, (27), 209-219.
34. Robertson D., (2004), *Annu. Rev. Plant Biol.*, (55), 495-519.
35. Chan S. W., Henderson I. N., Jacobsen S. E., (2005), *Nat. Rev. Genet.*, (6), 351-360.
36. Matzke M., Aufsatz W., Kanno T., Daxinger L., Papp I., Mette M. F., Matzke A. J., (2004), *BBA*, (1676), 129-141.
37. Wassenegger M., Hiemes S., Riedel L., Sanger H. L., (1994), *Cell*, (76), 567-576.
38. Jones L., Hamilton A. J., Voinnet O., Thomas C. L., Maule A. J., Baulcombe D. C., (1999), *Plant Cell*, (11), 2291-2302.
39. Aufsatz W., Mette M. F., van der Winden J., Matzke A. J., Matzke M., (2002), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, (99), 16499-16506.
40. Matzke M., Matzke A. J., Kooter J. M., (2001), *Science*, (293), 1080-1083.
41. Hannon G. J., (2002), *Nature*, (418), 244-251.
42. Grimm D., (2009), *Adv. Drug Deliver. Rev.*, 25, 61(9), 672-703.
43. Suzuki K., Kelleher A. D., (2009), *Curr. Top. Med. Chem.*, 9(12), 1079-1087.
44. Weinberg M. S., Villeneuve L. M., Ehsani A., Amarzguioui M., Aagaard L., Chen Z. X., Riggs A. D., Rossi J. J., Morris K. V., (2006), *RNA*, 12(2), 256-262.
45. Janowski B. A., Younger S. T., Hardy D. B., Ram R., Huffman K. E., Corey D. R., (2007), *Nat. Chem. Biol.*, 3(3), 166-173.
46. Kruger K., Grabowski P. J., Zang A. J., Sands J., Gottschling D. E., Cech T. R., (1982), *Cell*, (31), 147-157.
47. Symons R. H., (1994), *Curr. Opin. Struc. Biol.*, (4), 322-330.
48. Merlo A. O., Cowen N., Delate T., Edington B., Folkerts O., Hopkins N., Lemeix C., Skokut T., Smith K., Woosley A., Yang Y., Young S., Zwick M., (1998), *Plant Cell*, (10), 1603-1621.
49. Shiota M., Sano M., Miyagishi M., Taira K., (2004), *J. Biochem.*, (136), 133-147.
50. Steinecke P., Hergel T., Schreiber P. H., (1992), *EMBO J.*, (11), 1525-1530.
51. Wegener D., Steinecke P., Herget T., Petereit I., Philipp C., Schreiber P. H., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, (245), 465-470.
52. Borovkov A. Y., McClean P. E., Sowokinos J., Rund S. H., Secor G. A., (1996), *J. Plant Physiol.*, (147), 644-652.
53. Wyszko E., Nowak M., Pospieszny H., Szymanski M., Pas J., Barciszewska M. Z., Barciszewski J., (2006), *FEBS J.*, (273), 5022-5031.
54. Bagheri S., Kashani-Sabet M., (2004), *Curr. Mol. Med.*, (4), 489-506.

55. Macejak D. G., Jensen K. L., Pavco P. A., Phipps K. M., Heinz B. A., Colacino J. M., Blatt L. M., (2001), *J. Viral Hepatitis.*, 8(6), 400-405.
56. Asfif-Ullah M., Levesque M., Robichaud G., Perreault J. P., (2007), *Curr. Gene Ther.*, (7), 205-216.
57. Goroczniak R., Behlke M. A., Gunderson S. I., (2009), *Nat. Biotechnol.*, 27(3), 257-263.
58. Grünweller A., Hartmann R. K., (2009), *Chembiochem.*, 10(10), 1599-1601.
59. Wypijewski K., Hornyk C., Shaw J. A., Stephens J., Goraczniak R., Gunderson S. I., Lacomme C., (2009), *Plant Physiol.*, 151(2), 955-965.
60. Jankowska A., Gunderson S. I., Andrusiewicz M., Burczynska B., Szczerba A., Jarmolowski A., Nowak-Markwitz E., Warchol J. B., (2008), *Mol. Cancer*, (7), 26, 1-269.
61. Yang Y., Walsh C. E., (2005), *Mol. Ther.*, 12(6), 1006-1012.
62. Mansfield S. G., Chao H., Walsh C. E., (2004), *Trends Mol. Med.*, 10(6), 263-268.
63. Chao H., Mansfield S. G., Bartel R. C., Hiriyanna S., Mitchell L. G., Garcia-Blanco M. A., Walsh C. E., (2003), *Nat. Med.*, 9(8), 1015-1019.
64. Szarzyńska B., Sobkowiak L., Pant B. D., Balazadeh S., Scheible W. R., Mueller-Roeber B., Jarmolowski A., Szweykowska-Kulinska Z., (2009), *Nucleic Acid Res.*, 37(9), 3083-3093.
65. Kim V. N., Nam J.-W., (2006), *Trends in Genet.*, 22, 3, 165-173.
66. Lin S. S., Wu H. W., Elena S. F., Chen K. C., Niu Q. W., Yeh S. D., Chen C. C., Chua N. H., (2009), *PLoS Pathog.*, 5(2):e1000312.
67. Liu Y. P., Gruber J., Haasnoot J., Konstantinova P., Berkhout B., (2009), *Nucleic Acid Res.*, 37(18), 6194-6204.
68. Idogawa M., Sasaki Y., Suzuki H., Mita H., Imai K., Shinomura Y., Tokino T., (2009), *Clin. Cancer Res.*, 15(11), 3725-3732.
69. Schwab R., Ossowski S., Warthmann N., Weigel D., (2010), *Methods Mol. Biol.*, (592), 71-88.
70. Zeng Y., Wagner E. J., Cullen B. R., (2002), *Mol. Cell.*, 9(6), 1327-1333.
71. Parizotto E. A., Dunoyer P., Rahm N., Himber C., Voinnet O., (2004), *Gene Dev.*, 18, 2237-2242.
72. Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D., (2006), *Plant Cell*, 18(5), 1121-1133.
73. Zhao T., Wang W., Bai X., Qi Y., (2008), *Plant J.*, [Epub ahead of print].
74. Molnar A., Bassett A., Thuenemann E., Schwach F., Karkare S., Ossowski S., Weigel D., Baulcombe D., (2009), *Plant J.*, (58), 165-174.
75. Khraiweh B., Ossowski S., Weigel D., Reski R., Frank W., (2008), *Plant Physiol.*, 148(2), 684-693.
76. Warthmann N., Chen H., Ossowski S., Weigel D., Hervé P., (2008), *PLoS One*, 19, 3(3), 1829.
77. Ossowski S., Schwab R., Weigel D., (2008), *Plant J.*, 53, 674-690.
78. Qu J., Ye J., Fang R., (2007), *J. Virol.*, 81(12), 6690-6699.
79. Duan C. G., Wang C. H., Fang R. X., Guo H. S., (2008), *J. Virol.*, 82(22), 11084-11095.
80. Niu Q. W., Lin S. S., Reyes J. L., Chen K. C., Wu H. W., Yeh S. D., Chua N. H., (2006), *Nat. Biotechnol.*, 24(11), 1420-1428.
81. Du G., Yonekubo J., Zeng Y., Osisami M., Frohman M. A., (2006), *FEBS J.*, 273(23), 5421-5427.
82. Wu J., Bonsra A. N., Du G., (2009), *Methods Mol. Biol.*, 487, 205-219.
83. Sun D., Melegari M., Sridhar S., Rogler C. E., Zhu L., (2006), *Biotechniques*, 41(1), 59-63.
84. Shibata A., Iwaki A., Fukumaki Y., (2007), *J. RNAi Gene Silencing*, 3(1), 237-247.
85. Holen T., (2006), *RNA*, 12, 1620-1625.
86. Pushparaj P. N., Aarthi J. J., Manikandan J., Kumar S. D., (2008), *J. Dent. Res.*, 87, 992.
87. Israsena N., Supavonwong P., Ratanasetyuth N., Khawplod P., Hemachudha T., (2009), *Antivir. Res.*, 84(1), 76-83.
88. Gao Y. F., Yu L., Wei W., Li J. B., Luo Q. L., Shen J. L., (2008), *World J Gastroenterol*, 14 (29), 4684-4689.
89. Son J., Uchil P. D., Kim Y. B., Shankar P., Kumar P., Lee S. K., (2008), *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 374(2), 214-218.
90. Cai S. R., Wang Z., Chen C. Q., Wu W. H., He Y. L., Zhan W. H., Zhang C. H., Cui J., Wu H., (2008), *Chin. Med. J. (Engl)*, 121(24), 2534-2538.
91. Hutchison E. R., Okun E., Mattson M. P., (2009), *Neuromol. Med.*, 11(3), 153-161.
92. Xue L., Yuan Q., Yang Y., Wu J., (2009), *Biochem. Bioph. Res. Co.*, 390(3), 791-796.

93. Nudler E., (2006), *Cell*, (126), 19-22.
94. Bocobza S. E., Aharoni A., (2008), *Trends Plant Sci.*, 13(10), 526-533.
95. Miranda-Rios J., (2007), *Structure*, (15), 259-265.
96. Mironov A. S., Gusarov I., Rafikov R., Lopez L. E., Shatalin K., Kreneva R. A., Perumov D. A., Nudler E., (2002), *Cell*, (111), 747-756.
97. Winkler W., Nahvi A., Breaker R. R., (2002), *Nature*, (419), 952-956.
98. Sudarsan N., Barrick J. E., Breaker R. R., (2003), *RNA*, (9), 644-647.
99. Maret D., Boffa M. B., Brien D. F., Nesheim M. E., Koschinsky M. L., (2004), *J. Thromb. Haemost.*, (11), 1969-1979.
100. Swieżewski S., Liu F., Magusin A., Dean C., (2009), *Nature*, 462, 799-802.