

Andrew Z. Fire i Craig C. Mello
Nagroda Nobla 2006 w dziedzinie medycyny i fizjologii
„Interferencja RNA – wyciszanie genów przez podwójnoniciowy RNA”

Beata Biesaga

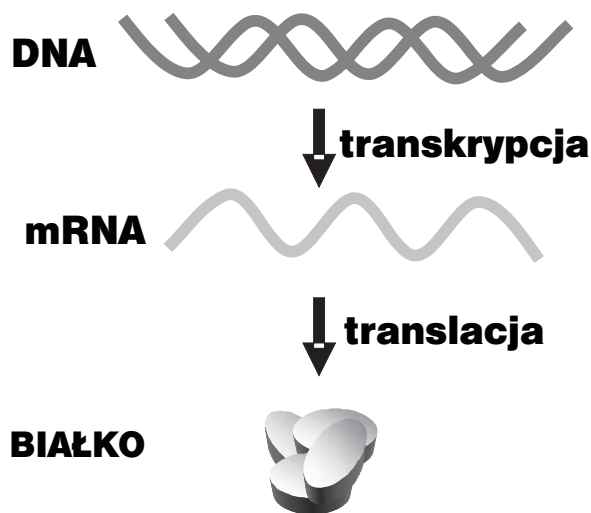
Andrew Z. Fire and Craig C. Mello
The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2006
RNA interference – gene silencing by double-stranded RNA

In the year 2006, The Nobel Assembly at Karolinska Instituted decided to award The Nobel Prize in Physiology or Medicine to Andrew Z. Fire and Craig C. Mello for their discovery concerning a mechanism of gene silencing in cells called RNA interference. In the studies published in 1998 they discovered, that some genes can be silenced by degradation of their mRNA. This degradation is activated by double stranded RNA. RNA interference occurs in plants, animals and humans. It is very important mechanism, which regulate gene expression during embryonic development and cell differentiation. RNA interference participates also in cell defense against viral infection, and mobile genetic elements such as transposone. RNA interference is now widely used in basic science to study gene functions. It is also possible to use this method in the treatment of viral infection, cardiovascular disease, and cancer.

Wprowadzenie

Nagrodę Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w 2006 roku otrzymali dwaj Amerykanie: Andrew Z. Fire i Craig C. Mello. Nagroda ta zastała przyznana za badania nad zjawiskiem interferencji RNA (iRNA) u nicienia *Caenorhabditis elegans*. Wyniki tych badań zostały opublikowane w *Nature* w 1998 roku [1]. Interferencja RNA jest jednym ze sposobów regulacji ekspresji genów w komórce.

Każda żywa komórka eukariotyczna produkuje białka, które są niezbędne do utrzymania struktury i funkcji komórki: enzymy, które kontrolują procesy życiowe komórki, białka strukturalne, receptory i inne. Informacja o budowie tych białek jest zapisana w DNA komórki. Odcinek DNA zawierający informację wystarczającą do wytworzenia określonego rodzaju białka nazywamy genem. Synteza białek w komórce przebiega w trakcie dwóch procesów: transkrypcji i translacji (Ryc. 1). Podczas transkrypcji następuje przepisanie informacji zakodowanej w genie na jednoniciowy odcinek mRNA. Następnie w procesie translacji, w oparciu o kod genetyczny mRNA, syntetyzowane są odpowiednie aminokwasy i białka.



Ryc. 1. Schemat syntezy białek

Prawie każda komórka złożonego organizmu eukariotycznego zawiera ten sam zestaw genów. Niektóre geny ulegają ekspresji we wszystkich komórkach – są to geny konstytutywne (*housekeeping genes*), zaangażowane w utrzymanie podstawowych funkcji żywych komórek (Ryc. 2). Wiele genów jest aktywnych tylko w specyficznych komórkach danej tkanki. Dzięki wybiórczej ekspresji genów różne typy komórek przybierają różne kształty i pełnią określone funkcje. Także na różnych etapach rozwoju i różnicowania niektóre geny są w komórce aktywne, a inne wyciszane.

Geny konstytutywne housekeeping genes



Ryc. 2. Wybiórcza ekspresja genów w komórce

Regulacja ekspresji komórkowo czy też tkankowo specyficznych genów odbywa się w czasie procesu transkrypcji i translacji (Ryc. 3). Interferencja RNA to jeden ze sposobów regulacji aktywności genów na poziomie potranskrypcyjnym. Zjawisko to zostało wykryte na początku lat 90 u roślin. Wtedy to okazało się, że po wprowadzeniu dodatkowych kopii genu warunkujących barwę kwiatów do komórek petunii, zmodyfikowane rośliny miały na płatkach białe plamy. Przypuszczano wówczas, że dodatkowe kopie genu, w nieznanym do tej pory sposób, zahamowały ekspresję genów warunkujących barwę kwiatów. Dzięki pracom Craiga i Mello poznany został mechanizm tego zjawiska. W serii doświadczeń przeprowadzonych na komórkach nicienia *Caenorhabditis elegans* wykazali oni, że kluczową rolę w wyciszaniu pewnych genów odgrywają dwuniciowe fragmenty RNA. W opublikowanej w 1998 roku publikacji, podsumowującej ich doświadczenia, obserwowany mechanizm wyciszania genów nazwali interferencją RNA (iRNA) [1]. Przeprowadzone badania okazały się przełomowe dla zrozumienia obserwacji tego zjawiska

Regulacja ekspresji genów:

Poziom transkrypcyjny

- Struktura chromatyny
- Metylacja DNA
- Czynniki transkrypcyjne

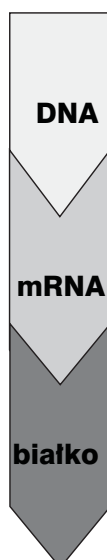
Poziom potranskrypcyjny

- Chemiczne zmiany mRNA
- Interferencja RNA

Poziom potranslacyjny

Zmiany chemiczne powstających białek związane z:

- Transportem białek
- Ochroną białek przed rozkładem

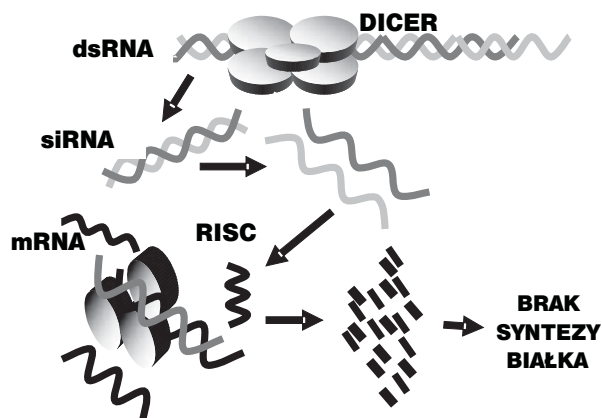


Ryc. 3. Różne etapy hamowania ekspresji genów w komórce

u roślin. Zainspirowały także wielu naukowców do dalszych badań, co doprowadziło w niedługim czasie do potwierdzenia występowania iRNA u glonów, płazińców, muszki owocowej, a także u ssaków.

Mechanizm molekularny interferencji RNA

Interferencja RNA polega na hamowaniu aktywności genów poprzez degradację mRNA. Degradacja ta jest indukowana przez wprowadzenie do komórki lub syntezę w komórce dwuniciowych fragmentów RNA [2]. Podwójnicowy RNA (dsRNA) może być wytwarzany przez samą komórkę. Jest to tak zwany mikro RNA – jednoniciowy odcinek RNA, który związując się tworzy strukturę podobną do wsuwki do włosów. Swoisty enzym wycina środkową część wsuwki, tworząc dsRNA. Źródłem dsRNA w komórce mogą być także rozmnażające się w niej wirusy. W cytoplazmie dsRNA łączy się z kompleksem enzymatycznym o nazwie DICER (Ryc. 4). DICER tnie dsRNA na krótkie dwuniciowe odcinki określone jako siRNA (siRNA – *small interfering RNA*). Następnie nici siRNA odłączają się od siebie i jedna z nich przyłącza się do kompleksu białkowego



Ryc. 4. Mechanizm wyciszania genów przez interferencję RNA

RISC (*RNA induced silencing complex*). Taki kompleks napotyka tysiące mRNA krążących w cytoplazmie, powstających na potrzeby syntezy określonych białek i „wylapuje” to mRNA, który na zasadzie komplementarności nukleotydów idealnie pasuje do pojedynczej nici RNA prezentowanej przez RISC. Jeśli pojedyncza nić siRNA w kompleksie RISC pasuje idealnie do „złapanego” mRNA, wówczas następuje połączenie obu nici i uaktywnienie enzymów wchodzących w skład RISC. Enzymy te tną powstały dwuniciowy fragment RNA na krótkie, bezużyteczne fragmenty, uwalniane z kompleksu RISC. W konsekwencji zniszczony zostaje mRNA kodujący informacje o budowie określonego białka i białko to nie zostaje wytworzone.

Biologiczna rola interferencji RNA

Zjawisko interferencji RNA odgrywa bardzo ważną rolę w hamowaniu ekspresji genów w trakcie rozwoju embrionalnego, podczas różnicowania się odrębnych typów komórek, a także w obronie komórek przed wirusami. Wiele wirusów posiada materiał genetyczny w postaci podwójnoniciowego RNA. Jeśli taki wirus zainfekuje komórkę, to uwalnia do niej swój materiał genetyczny, który może być wychwycony przez DICER. Interferencja RNA chroni także komórkę przed transpozonomi tj. ruchomymi elementami genomu, które mogą przesuwać się wzdłuż nici DNA. Z przemieszczaniem się transpozono- nów mogą być związane bardzo poważne zmiany w DNA: delecje, inwersje i duplikacje obejmujące nieraz bardzo obszerne rejony i powodujące utratę funkcji niektórych genów, a także wzmożoną ekspresję innych. Niektóre transpozony, aby się powielić i wbudować w nowe miejsce w genomie, muszą zostać przekodowane na mRNA, a później przepisane z powrotem na DNA. Dzięki interferencji RNA komórka może doprowadzić do degradacji mRNA pochodzącego od transpozono- nów, a tym samym uniknąć niebezpieczeństwa rearanżacji swojego genu- mu.

Zastosowanie interferencji RNA w biologii i medycynie

Zjawisko interferencji RNA stało się dla biologów doskonałym narzędziem do badania funkcji określonych genów w komórce. Dzięki wprowadzeniu do komórki sztucznie wytworzonego siRNA o sekwencji nukleotydów homologicznej do sekwencji określonego genu można w prosty i szybki sposób zahamować ekspresję określonego genu [3]. Taka metoda postępowania jest szczególnie użyteczna obecnie, kiedy poznano sekwencję genomów wielu organizmów.

Poznanie procesu wyciszania genów przez siRNA stworzyło możliwość opracowania nowych metod leczenia wielu chorób [4]. Obecnie najbardziej zaawansowane prace dotyczą leczenia związanego z wiekiem zwyrodnienia plamki ocznej [5, 6]. W badaniach klinicznych fazy pierwszej (lek Cand 5) i drugiej (lek Sirna-027) testowana jest przydatność tych leków do zahamowania tej choroby poprzez wyciszenie mRNA dla receptora VEGF (*vascular endothelial growth factor*, naczyniowos- ródłonkowy czynnika wzrostu). Natomiast w fazie przedklinicznej znajdują się badania nad zastosowaniem siRNA do walki z niektórymi chorobami wirusowymi. W doświadczeniach *in vitro*, poprzez wprowadzenie siRNA o sekwencji homologicznej do sekwencji genu wirusów HIV [7, 8], polio [9, 10] i wirusa zapalenia wątroby typu A [11], udało się na pewien czas powstrzymać rozwój tych wirusów w komórkach ludzkich. Z kolei, w badaniach na myszach, dzięki odpowiednio przygotowa- nemu siRNA, wyciszono gen kodujący apolipoproteinę B – enzym, którego nadmiar prowadzi do powstania zbyt dużej ilości HDL (*high density lipoprotein* – lipoproteiny o dużej gęstości) [12].

Także w onkologii, naukowcy starają się opracować nowe strategie terapii genowej, polegające na wprowadzeniu do komórek za pomocą wektorów wirusowych określonego rodzaju siRNA, hamującego wzrost i rozwój nowotworów [13]. W badaniach fazy przedklinicznej sprawdzana jest przydatność iRNA do zahamowania ekspresji genów kodujących białka antyapoptotyczne, takie jak: Bcl-2 [14, 15], K-ras [16], C-myc, Stat [17, 18] i surwiwiny [19-21]. Prowadzone są także prace nad zwiększeniem wrażliwości komórek nowotworowych na działanie cytostatyków i promieniowania jonizującego. Dotyczą one wygaszania aktywności genów kodujących białka oporności wielolekowej z rodziny MDR (*multi- drug resistance protein*) [22, 23], a także białek biorących udział w naprawie DNA, takich jak P53, DNA-PK (kina- za fosforanowa DNA) oraz białek z rodziny ATM (*ataxia teleangiectasia* (AT) *mutated*, biorących udział w naprawie DNA, których mutacje wykryto u chorych z zespołem AT) [24, 25]. Wykazano także zahamowanie wzrostu komórek raka stercza przez degradację mRNA odpowiedzialnego za syntezę receptorów androgenowych [26, 27].

Podsumowanie

Badania tegorocznych laureatów Nagrody Nobla w dziedzinie medycyny i fizjologii w znaczący sposób przyczyniły się do poznania zjawiska interferencji RNA. Jest to proces, w którym podwójnoniciowe fragmenty RNA hamują produkcję określonych białek. Główną rolą iRNA jest regulacja aktywności genów w czasie wzrostu i rozwoju komórki oraz jej obrona przed „wrogimi” genami (np. wirusowymi). Zjawisko to może znaleźć zastosowanie przy opracowaniu nowych sposobów leczenia wielu róż- nych chorób, m. in. pochodzenia wirusowego oraz nowo- tworów.

Dr Beata Biesaga
Zakład Radiobiologii Klinicznej
Centrum Onkologii – Instytut
im. Marii Skłodowskiej-Curie
Oddział w Krakowie
ul. Garncarska 11
31-115 Kraków

Piśmiennictwo

1. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 19: 391: 806-11.
2. Stevenson DS, Jarvis P. Chromatin silencing: RNA in the driving seat. *Curr Biol* 2003; 13: R13-5.
3. Timmons L. Construction of plasmids for RNA interference and in vitro transcription of double-stranded RNA. *Methods Mol Biol* 2006; 351: 109-17.
4. Putral LN, Gu W, McMillan NA. RNA interference for the treatment of cancer. *Drug News Perspect* 2006; 19: 317-24.
5. Campochiaro PA. Potential applications for RNAi to probe pathogenesis and develop new treatments for ocular disorders. *Gene Ther* 2006; 13: 559-62

6. Michels S, Schmidt-Erfurth U, Rosenfeld PJ. Promising new treatments for neovascular age-related macular degeneration. *Expert Opin Investig Drugs* 2006; 15: 779-93.
7. Pauls E, Senserrich J, Clotet B i wsp. Inhibition of HIV-1 replication by RNA interference of p53 expression. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 659-67.
8. Ter Brake O, Konstantinova P, Ceylan M i wsp. Silencing of HIV-1 with RNA Interference: a Multiple shRNA Approach. *Mol Ther* 2006; Sep 5.
9. Gitlin L, Stone JK, Andino R. Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J Virol* 2005; 79: 1027-35.
10. Saleh MC, Van Rij RP, Andino R. RNA silencing in viral infections: insights from poliovirus. *Virus Res* 2004; 1;102: 11-7.
11. Kusov Y, Kanda T, Palmenberg A i wsp. Silencing of hepatitis A virus infection by small interfering RNAs. *J Virol* 2006; 80: 5599-610.
12. Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111-4.
13. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M i wsp. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 2002; 419: 624-9.
14. Cioca DP, Aoki Y, Kiyosawa K. RNA interference is a functional pathway with therapeutic potential in human myeloid leukemia cell lines. *Cancer Gene Ther* 2003; 10: 125-33.
15. Futami T, Miyagishi M, Seki M i wsp. Induction of apoptosis in HeLa cells with siRNA expression vector targeted against bcl-2. *Nucleic Acids Res Suppl* 2002; (2): 251-2.
16. Baines AT, Lim KH, Shields JM i wsp. Use of retrovirus expression of interfering RNA to determine the contribution of activated k-ras and ras effector expression to human tumor cell growth. *Methods Enzymol* 2005; 407: 556-74
17. Hong J, Zhao Y, Huang W. Blocking c-myc and stat3 by E. coli expressed and enzyme digested siRNA in mouse melanoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 348: 600-5.
18. Zhang MS, Zhou YF, Zhang WJ i wsp. Apoptosis induced by short hairpin RNA-mediated STAT6 gene silencing in human colon cancer cells. *Chin Med J* 2006; 119: 801-8.
19. De Schrijver E, Brusselmans K, Heyns W i wsp. RNA interference-mediated silencing of the fatty acid synthase gene attenuates growth and induces morphological changes and apoptosis of LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res* 2003; 63: 3799-804.
20. Wang Y, Zhu H, Quan L i wsp. Downregulation of survivin by RNAi inhibits the growth of esophageal carcinoma cells. *Cancer Biol Ther* 2005; 4: 974-8.
21. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med* 2005; 9: 360-72.
22. Chen XP, Wang Q, Guan J i wsp. Reversing multidrug resistance by RNA interference through the suppression of MDR1 gene in human hepatoma cells. *World J Gastroenterol* 2006; 7; 12: 3332-7
23. Lage H. MDR1/P-glycoprotein (ABC1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance. *Curr Drug Targets* 2006; 7: 813-21.
24. Collis SJ, Swartz MJ, Nelson WG i wsp. Enhanced radiation and chemotherapy-mediated cell killing of human cancer cells by small inhibitory RNA silencing of DNA repair factors. *Cancer Res* 2003; 63: 1550-4.
25. Duxbury MS, Ito H, Zinner MJ i wsp. RNA interference targeting the M2 subunit of ribonucleotide reductase enhances pancreatic adenocarcinoma chemosensitivity to gemcitabine. *Oncogene* 2004; 23: 1539-48.
26. Rahman MM, Miyamoto H, Takatera H i wsp. Reducing the agonist activity of antiandrogens by a dominant-negative androgen receptor coregulator ARA70 in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 19619-26
27. Rahman MM, Miyamoto H, Lardy H i wsp. Inactivation of androgen receptor coregulator ARA55 inhibits androgen receptor activity and agonist effect of antiandrogens in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003; 100: 5124-9.

Otrzymano i przyjęto do druku: 17 listopada 2006 r.