

BIOLOGICZNA ROLA mikroRNA (miRNA) NOWE DANE

BIOLOGICAL ROLE OF microRNA (miRNA) – NEW DATA

Beata HUKOWSKA-SZEMATOWICZ, Wiesław DEPTUŁA

Katedra Mikrobiologii i Immunologii Uniwersytetu Szczecińskiego

Streszczenie: MikroRNA (miRNA) to grupa małych, 21–23-nukleotydowych, niekodujących cząstek RNA, które w postaci dojrzałej regulują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym. Obecnie znane jest ponad 3000 miRNA, które opisano u kręgowców i owadów, ale także u roślin, grzybów, organizmów jednokomórkowych oraz wirusów. W ludzkim genomie odkryto dotychczas ponad 470 miRNA, choć prawdopodobnie jest ich około 1000. Przyjmuje się, że odgrywają one rolę w wielu procesach m.in., takich jak: różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, embriogenezie, apoptozie, regulacji metabolizmu ksenobiotyków, odporności, stanach zapalnych, infekcjach wirusowych i bakteryjnych oraz chorobach neurologicznych.

Słowa kluczowe: mikroRNA, układ odpornościowy, różnicowanie komórek, infekcje wirusowe i bakteryjne, choroby neurologiczne.

Summary: MicroRNA (miRNA) is a group of small, 21–23-nucleotide-long, non-encoding RNA particles, which in the mature form regulate gene expression at the post-transcription level. Presently, over 3000 miRNAs are known, described in vertebrates and insects, but also in plants, fungi, unicellular organism and viruses. In the human genome, so far over 470 miRNAs have been discovered, although it is assumed that there are about 1000. Assumed that they play a role in many processes, such as differentiation of stem cells of the hematopoietic system, embryogenesis, apoptosis, regulation of the xenobiotics' metabolism, immunity, inflammations, viral and bacterial infections, as well as neurological diseases.

Key words: microRNA, immune system, cell differentiation, viral and bacterial infections, neurological diseases.

WSTĘP

RNA uważany jest za jeden z głównych czynników kontrolujących proces ekspresji informacji genetycznej. Badania w ostatnich latach doprowadziły do opisanego kilku typów krótkich regulatorowych RNA – srRNA (ang. *small regulatory RNA*) biorących udział w wyciszaniu genów na etapie potranskrypcyjnym w przypadku miRNA

lub transkrypcyjnym i potranskrypcyjnym w przypadku siRNA. Obecnie srRNA dzieli się na dwie zasadnicze grupy: miRNA (ang. *microRNA*) (kręgowce, owady, rośliny, grzyby, organizmy jednokomórkowe, wirusy) oraz krótkie interferujące RNA – siRNA (ang. *small interfering RNA*) (zwierzęta, rośliny, grzyby, orzęski). W obrębie cząsteczek siRNA wyróżniono wyspecjalizowane podgrupy, takie jak: rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*) (rośliny), tasiRNA (ang. *trans-acting small interfering RNA*) (rośliny), egzogenne siRNA (zwierzęta, rośliny, grzyby), ha-siRNA (ang. *heterochromatin-associated small interfering RNA*) (rośliny, grzyby), nat-siRNA (ang. *natural antisense small interfering RNA*) (rośliny) oraz scn-siRNA (ang. *siRNA-like scan (scn) RNA*) (orzęski), casiRNA (ang. *cis-acting-siRNA*) (rośliny) [2, 9, 22, 35, 42]. Badania przeprowadzone w ostatnich latach doprowadziły do opisanego kolejnego typu małych cząsteczek RNA, które nazwano piRNA (ang. *piwi-interacting RNA*) (*Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans*, *Mus musculus*). Cząsteczki te o długości 26–31 nukleotydów tworzą kompleksy z białkami PIWI i stąd ich nazwa piRNA. Funkcja piRNA polega na represji translacji i tworzeniu par przez chromosomy homologiczne [12].

MiRNA stanowią najliczniejszą grupę krótkich regulatorowych RNA. Po raz pierwszy cząsteczki te opisano w latach dziewięćdziesiątych podczas prowadzenia badań nad etapami rozwoju nicienia *Caenorhabditis elegans*. Wówczas odkryto, że u *Caenorhabditis elegans* za prawidłowe przechodzenie z pierwszego stadium larwalnego w drugie i czwartego stadium w postać dojrzałą, odpowiadają krótkie cząsteczki RNA lin-4 i let-7 nazwane nieco później miRNA [35]. Następnie miRNA poznano u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*), ryb (*Danio rerio*) oraz myszy (*Mus musculus*) [1]. Zasugerowany we wczesnych latach dziewięćdziesiątych mechanizm atenuacji translacji w wyniku oddziaływania antysensownego RNA i mRNA, został potwierdzony w 1998 roku, kiedy to Andrew Z. Fire i Craig C. Mello odkryli zjawisko interferencji RNA–RNAi (ang. *RNA interference*) [10], za co uhonorowano ich w 2006 r. Nagrodą Nobla w zakresie biologii i medycyny. W tym samym czasie trzy zespoły niezależnych badaczy stwierdziły wszechobecność cząsteczek miRNA, które różniły się sekwencją nukleotydową, profilem ekspresji i brały udział w potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów [29].

Obecnie znanych jest ponad 3000 miRNA, które opisano u kręgowców i owadów, ale także u roślin, grzybów, organizmów jednokomórkowych oraz wirusów [22]. Przyjmuje się, że w ludzkim genomie jest ich około 1000, a dotychczas scharakteryzowano ich tylko ponad 470 [22]. Regulują one 30% genów ludzkiego genomu, biorąc udział w prawidłowym rozwoju komórek [29]. Wykazano, że około 2% znanych genów u ludzi koduje miRNA z tym, że jeden rodzaj miRNA może być odpowiedzialny za regulację około 200 genów [20]. MiRNA to cząsteczki wielofunkcyjne, które u ssaków odgrywają ogromną rolę w bardzo wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Do tych procesów zaliczamy różnicowanie komórek macierzystych układu krwiotwórczego, w hematopoizie, w tym erytropoizie, megakariocytopoizie, różnicowaniu komórek mięśni szkieletowych, embriogenezie, neurogenezie, angiogenezie, egzocytozie, apoptozie, regulacji metabolizmu ksenobiotyków, regulacji sekrecji insuliny, różnicowaniu adypocytów i komórek mono-

nuklearnych, odporności, stanach zapalnych, nowotworach, chorobach sercowo-naczyniowych, infekcjach wirusowych i bakteryjnych oraz chorobach neurologicznych [1, 3, 5, 6, 7, 8, 11, 13, 14, 15, 16, 19, 20, 21, 23, 24, 25, 17, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 43, 45, 46, 47, 48]. U muszki owocowej podwyższona ekspresja miRNA prowadzi do przerostu skrzydeł i oczu, natomiast brak ekspresji tej cząsteczki, powoduje powstanie osobników o zredukowanej liczbie komórek [1]. U roślin mikroRNA bierze udział między innymi w rozwoju kwiatów i nadawanie liściom odpowiedniego kształtu [44].

Nomenklatura poszczególnych miRNA składa się z przedrostka „miR” oraz numeru identyfikacyjnego, np. miR-7, miR-20. Jeżeli dwa różne prekursorzy wytwarzają takie samo miRNA, to wtedy określa je się miR-218-1 i miR-218-2. Dodatkowymi, małymi literami alfabetu oznacza się te miRNA, które nieznacznie różnią się sekwencją nukleotydową: miR-99a, miR-99b. Zdarza się, że cząsteczka prekursorowa może być podstawą do wytworzenia dwóch miRNA, każde z innego ramienia: miR-7d i miR-7d*. Cząsteczka częściej powstająca jest pozbawiona gwiazdki. W nazwie cząsteczki może też zawierać się informacja dotycząca ramienia, z którego ona powstaje: miR-324-3p i miR-324-5p. W przypadku pierwszych odkrytych cząsteczek mikroRNA (lin-4, let-7) przedrostek „miR” zastępuje odpowiednio „lin” lub „let” i nazwy te nie zostały zmienione po wprowadzeniu zasad jednolitej nomenklatury miRNA, ze względu na tradycję [34].

BIOGENEZA I MECHANIZM DZIAŁANIA mikroRNA

Geny dla miRNA mają różną lokalizację, mieszczą się w intronach i/lub w egzonach genów strukturalnych lub w obszarach międzygenowych [22]. Geny kodujące mikroRNA mogą występować pojedynczo lub tworzą policistronowe skupiska, mające wspólne sekwencje regulatorowe [22]. Większość genów dla mikroRNA jest transkrybowana przez polimerazę II, a powstający produkt transkrypcji jest nazwany pri-miRNA [29]. Początkowo pri-miRNA przyjmuje strukturę nieregularnej spinki do włosów, składającej się z pętli i dwuniciowego trzonu [4, 43]. U zwierząt spinki do włosów mają długość ok. 80 nukleotydów [43]. W dojrzewanie pri-miRNA zaangażowane są dwa enzymy z rodziny rybonukleaz III: Drosha i Dicer. Bezpośrednio na terenie jądra komórkowego pri-miRNA podlega wstępnej obróbce, zależnej od enzymu Drosha. Białko to ma dwie domeny RNazy III (RIIID) i domenę wiążącą dwuniciowe RNA. Enzym Drosha oddziałuje z białkiem DGCR8 (ang. *DiGeorge syndrome Critical Region 8*), które ma dwie domeny wiążące dwuniciowe RNA [9, 29]. Przypuszcza się, że białko DGCR8 uczestniczy w rozpoznawaniu pri-miRNA, przed jego wiązaniem z enzymem Drosha. Enzym Drosha i białko DGCR8 tworzą razem funkcjonalny jądrowy kompleks enzymatyczny nazwany Microprocesorem [29]. Następnie w wyniku rybonukleazowej aktywności RNazy III (prawdopodobnie na terenie jąderka) dochodzi do skrócenia cząsteczki RNA przy 3' i 5' końcu [9]. Powstaje w ten sposób produkt o długości około 70 nukleotydów, który określany jest jako pre-miRNA. Pre-miRNA, w połączeniu z jądrowym

białkiem transportowym – eksportyną 5, przechodzi do cytoplazmy, gdzie odbywa się dalsza obróbka cząsteczki prekursorowej [29].

W powstawaniu dojrzałej cząsteczki miRNA uczestniczy enzym Dicer oraz powiązane z nim białka Argonaut (AGO) i TRBP (ang. *transactivating response RNA-binding protein*) [4]. Dicer jest enzymem zależnym od ATP, wykazującym silne powinowactwo do dsRNA, które mają dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. W komórkach człowieka występuje głównie na obszarze cytoplazmy i siateczki śródplazmatycznej [29]. Dicer jest dużym białkiem (ok. 200 kDa), zawierającym sześć domen: domenę odpowiedzialną za wiązanie dsRNA, dwie katalityczne domeny o aktywności RNazy III (RIIID), domenę PAZ, odpowiedzialną za wiązanie innych białek (np. białka z rodziny Argonaut), jak również domenę helikaza-ATPaza oraz DUF283 [29]. Białka AGO dzielą się na dwie podrodziny Ago i Piwi. Eukariotyczne białka AGO mają wielkość ok. 100 kDa i są zasadowe. Mają one dwie domeny: PAZ, która wiąże RNA i PIWI wykazującą aktywność endorybonukleazy [4]. Enzym Dicer rozpoznaje dwuniciowy pre-miRNA i rozcina ten dupleks w okolicy podstawy pętli [4, 29]. W wyniku takiego działania powstają dwuniciowe RNA o długości 22 nukleotydów, pozostające w kompleksie RISC. Kompleks ten rozpoznaje nić przewodnią dupleksu RNA, która po degradacji nici drugiej staje się dojrzałym miRNA. W jego obrębie występuje konserwatywna, 7-nukleotydowa sekwencja na końcu 5', która jest bardzo istotna dla wiązania docelowego mRNA. Dojrzałe miRNA zostaje włączone w efektorowy kompleks RISC i wraz z nim może rozpoznawać mRNA genu docelowego i wpływać na poziom jego ekspresji w dwojaki sposób [29]. W przypadku pełnej komplementarności nukleotydowej miRNA z mRNA endonukleaza Dicer hydrolizuje mRNA (mRNA zostaje rozcięte w połowie regionu sparowanego z miRNA), zaś sam miRNA pozostaje niezmieniony i może ponownie uczestniczyć w rozpoznawaniu i degradacji kolejnych transkryptów mRNA [29]. W efekcie następuje obniżenie poziomu określonego transkryptu i syntezy białka, które koduje. Ten sposób wyciszania genów nazwano potranskrypcyjnym wyciszaniem genów – PTGS (ang. *Post-Transcriptional Gene Silencing*) i w bardzo niewielkim stopniu występuje on w komórkach zwierzęcych. Z kolei regulacja ekspresji genów przez hamowanie translacji nie zależy od pełnej komplementarności pomiędzy miRNA a docelowym mRNA. Zahamowanie syntezy białka następuje po przyłączeniu miRNA do rejonu 3' UTR mRNA [4]. Zwykle poziom transkryptów nie ulega zmianie, ponieważ są one przechowywane lub degradowane w znajdujących się na terenie cytoplazmy ciałkach P. W ten sposób dokonuje się regulacji ekspresji genów zwierzęcych. W podobny sposób dochodzi do degradacji mRNA przez cząsteczki siRNA (*small interfering RNA*) [9]. Jednakże różnica polega na tym, że cząsteczki siRNA mogą działać zarówno na etapie potranskrypcyjnym, jak i transkrypcyjnym. Aby doszło do aktywacji kompleksu RISC, jedna z nici siRNA pozostaje usunięta (siRNA to cząsteczki dwuniciowe), a druga służy jako sonda rozpoznająca komplementarne cząsteczki RNA [9].

mikroRNA a siRNA. Zarówno miRNA, jak i siRNA należą do grupy małych niekodujących cząsteczek RNA, biorących udział w regulacji ekspresji genów. Pomimo że w biogenezie i mechanizmie działania miRNA i siRNA istnieje wiele podobieństw, cząsteczki te wykazują także różnice przedstawione w tabeli 1.

TABELA 1. Różnice między mikroRNA a siRNA [4, 9, 29, 35, 42]
TABLE 1. Differences between microRNA and siRNA [4, 9, 29, 35, 42]

Cecha	miRNA	siRNA
Pochodzenie	Są naturalnie występującymi cząsteczkami kodowanymi zawsze przez genomy organizmów, są pochodzenia endogennego	Powstają z długich, dwuniciowych cząsteczek RNA – dsRNA, (które pojawiają się w komórce jako efekt replikacji wirusowego RNA, transkrypcji retrotranspozonów, nieprawidłowej transkrypcji transgenów), cięcie dsRNA na 20–23-nukleotydowe dwuniciowe odcinki przeprowadza enzym Dicer; mogą być pochodzenia egzogenego, jak i endogenego
	Pierwotny transkrypt nazwany pri-miRNA to długie, jednoniciowe RNA, w którego strukturze drugorzędowej występuje wiele fragmentów typu spinki do włosów, w regionie dwuniciowym zawsze występuje częściowe niesparowanie, w takiej formie pri-miRNA jest substratem dla enzymów Drosha i Dicer	Cząsteczka siRNA składa się z dwóch perfekcyjnie komplementarnych nici: sensownej i antysensownej. Nici antysensowna jest komplementarna do odpowiedniego fragmentu nici docelowego mRNA; natomiast sekwencja nici sensownej jest taka sama jak sekwencja docelowego mRNA. Tylko jedna nie odpowiada za aktywność siRNA i pozostaje związana z kompleksem RISC
Forma działania	Działają w układzie <i>trans</i> (nie oddziałują ze sobą), regulując poziom docelowego mRNA poprzez komplementarność sekwencji miRNA do mRNA	Działają w układzie <i>cis</i> i <i>trans</i> , kierując się do cząsteczek RNA, z których pochodzą (<i>cis</i>) lub do docelowego mRNA (<i>trans</i>)
Poziom działania	Działają na etapie potranskrypcyjnym	Działają zarówno na etapie potranskrypcyjnym, jak i transkrypcyjnym

mikroRNA ZWIĄZANE Z ROZWOJEM I FUNKCJONOWANIEM UKŁADU ODPORNOŚCIOWEGO

Badania dowodzą, że u ssaków cząsteczki miRNA regulują wytwarzanie i różnicowanie komórek krwi, w tym komórek układu odpornościowego oraz biorą udział w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej na infekcje [3, 5, 8, 15, 19, 24, 25, 30, 36, 43, 45]. Jak dotychczas dowiedziono, w wyżej opisanych procesach uczestniczą takie cząsteczki miRNA, jak: miRNA-155, grupa miRNA-146, miRNA-150, miRNA-181a, grupa miRNA-17-92, miRNA-223 oraz miRNA-16, miRNA-196, miRNA-296, miRNA-351, miRNA-431, miRNA-448 [3, 5, 8, 15, 19, 24, 25, 30, 36, 43, 45].

MiRNA-155 wykazuje wysoką ekspresję w ssaczycych komórkach progenitorowych linii limfoidalnej, mieloidalnej, w tym granulocytarnej i monocytarnej oraz megakariocytarnej i erytrocytarnej. Cząsteczka ta determinuje różnicowanie limfocytów Th1, Th2 oraz reguluje odpowiedź immunologiczną limfocytów T, a także jest niezbędna do produkcji IgG1 [24]. Wysoką ekspresję miRNA-155 wykazano w granulocytach i monocytach w odpowiedzi na czynniki zapalne oraz w limfocytach T i B w wyniku ich kontaktu z antygenami bakteryjnymi i wirusowymi [3, 24]. Wykazano, że stymulacja lipopolisacharydem (LPS) mysich białaczkowych linii makrofagów i monocytów prowadziła do zwiększenia wydzielania cytokiny prozapalnej TNF- α , czemu towarzyszyła wysoka ekspresja miRNA-155 [36]. Ponadto u tych zwierząt wykazano, że miRNA-155 reguluje ekspresję genów kodujących IL-4, chemokiny – CCL5 oraz czynnik transkrypcji – C-Maf [43].

Grupę cząsteczek miRNA-146 (miRNA-146a, miRNA-146b) po raz pierwszy opisano w komórkach ssaków przy próbie ustalenia związku miRNA z odpowiedzią immunologiczną na zakażenia bakteryjne. Większość kręgowców ma po dwie kopie genu kodującego miRNA-146 to jest miRNA-146a i miRNA-146b, które zlokalizowane są na oddzielnych chromosomach [3]. Dziś już wiadomo, że fizjologiczna rola miRNA-146 związana jest z regulowaniem odpowiedzi immunologicznej na zakażenia bakteryjne [5]. Okazało się, że ekspozycja ludzkich monocytów na lipopolisacharyd, peptydoglikan oraz cytokiny prozapalne (IL-1, TNF), w bardzo szybkim tempie indukowało ekspresję dojrzałych cząsteczek miRNA-146 [3, 24]. Także *in vitro* wykazano, wzrost produkcji miRNA-146a w ludzkich komórkach dendrytycznych w odpowiedzi na LPS oraz w komórkach B po kontakcie z wirusem Epstein-Barr [3]. Stwierdzono także, że podczas hematopoezy ekspresja tej cząsteczki jest zróżnicowana w komórkach Th1 i Th2, przy czym większą obserwowano w komórkach Th1.

MiRNA-150 bierze udział w hematopoezie u ssaków. Wysoką ekspresję tej cząsteczki obserwowano podczas dojrzewania limfocytów B i T, ale także w dojrzałych formach tych komórek. Natomiast nie wykazano ekspresji tej cząsteczki w komórkach progenitorowych limfocytów T i B. Małą ekspresję miRNA-150 obserwowano w czasie rozwoju megakariocytów i erytrocytów [3].

MiRNA-181a czuwa u ssaków nad prawidłowym rozwojem komórek B i T (CD4+) oraz moduluje odpowiedź komórek T na antygeny [15]. Najwyższą ekspresję tego miRNA obserwowano w komórkach szpiku kostnego, śledziony i grasicy [3].

MiRNA-17-92 to grupa, w której skład wchodzi cząsteczki miRNA-17, miRNA-18a, miRNA19a, miRNA19b, miRNA20a, miRNA-92. U większości kręgowców cząsteczki te są wysoce konserwatywne [24]. U ludzi nadzorują przemianę komórek pro- i pre- w dojrzałe limfocyty B i T. Wysoką ekspresję tej grupy cząsteczek obserwowano w komórkach pre-B i komórkach prekursorowych limfocytów T, zaś mniejszą w dojrzałych limfocytach T i B [24, 45]. U myszy ekspresję tych cząsteczek rejestrowano w różnych tkankach [3].

MiRNA-223 obserwowano u ludzi i myszy zarówno w stanach fizjologicznych, jak i patologicznych [3]. Szczególne znaczenie przypisuje się tym cząsteczkom w rozwoju granulocytów, ponieważ wyższą ich ekspresję stwierdzono w komórkach progenitorowych linii granulocytarnej niż w dojrzałych granulocytach. Ponadto wykazano, że ekspresja tego miRNA wzrasta w granulocytach w odpowiedzi na stan zapalny [19]. Sugeruje się, że cząsteczka ta reguluje dojrzewanie granulocytów i prawdopodobnie jest niezbędna do ich powstawania [3, 19].

MiRNA-16 – to cząsteczki, które obserwowano w tkankach i komórkach układu odpornościowego: monocytach, neutrofilach, limfocytach B i limfocytach T z receptorem CD4+ i CD8+ [24]. Szerokie występowanie i ekspresja tych cząsteczek może sugerować, że mają one ważną funkcję i być może związana jest ona z zahamowaniem przebiegu cyklu komórkowego w stanach zapalnych [25].

MiRNA inne – to cząsteczki mikroRNA-196, mikroRNA-296, mikroRNA-351, mikroRNA-431, mikroRNA-448, opisane u ludzi i myszy, które indukowane są przez IFN- β i hamują replikację wirusa hepatitis typu C [30].

MikroRNA A NOWOTWORY

Potencjalny związek między miRNA a procesem nowotworowym zaczęto brać pod uwagę z chwilą stwierdzenia, że cząsteczki te odgrywają ważną rolę we wzroście i różnicowaniu komórek [20]. Pierwsze badania kliniczne uwzględniające ewentualny udział tej cząsteczki, dotyczyły przewlekłej białaczki limfocytarnej B (PBL-B) u ludzi [20]. W badaniach tych wykazano, że profil miRNA pozwala na ustalenie pochodzenia komórek, ale także pozwala określić stadium ich rozwoju i różnicowania. Obserwacje z tego zakresu wykazały, że miRNA mają zdolność regulowania ekspresji licznych onkogenów i genów supresorowych i że same mogą działać jako onkogeny i supresory [26]. W warunkach laboratoryjnych dowiedziono, że miRNA powoduje obniżenie proliferacji komórek nowotworowych w przypadku raka prostaty (w liniach komórkowych PC-3) oraz raka szyjki macicy (w liniach komórkowych HeLa) [26]. Na podstawie poziomu ekspresji miRNA można diagnozować liczne choroby nowotworowe. W przypadku glejaków obserwowano wzrost ekspresji miRNA-21, w przypadku nowotworów płuc wzrost miRNA-155 i miRNA-17-92. Przy chłoniaku Burkitta i Hodgkina stwierdzono wzrost ekspresji miRNA-155 [26]. Nieco inny obraz stwierdzono w przypadku raka jelita grubego – obniżenie ekspresji miRNA-143 i miRNA-145; a w przypadku raka piersi – obniżenie

ekspresji miRNA125-1, miRNA125-2 i miRNA-145 i wzrost miRNA-21. Wyniki tych badań wskazują, że w przyszłości będzie możliwe zastosowanie miRNA w leczeniu chorób nowotworowych, a ich zastosowanie opierać się będzie na kilku strategiach [6]. Może to być synteza sztucznych miRNA komplementarnych do mRNA określonego genu. W takiej sytuacji zadaniem syntetycznych miRNA byłoby wyciszenie ekspresji genu odpowiedzialnego za daną chorobę. Inna strategia to zastosowanie tzw. antagomirów, czyli syntetycznych oligonukleotydów komplementarnych do określonego miRNA. Idea takiego leczenia polega na modyfikacji aktywności określonych białek, pośrednio poprzez wyciszenie genów miRNA regulujących ich ekspresję [6]. Najnowsze badania [28] wskazują, że cząsteczki miRNA są także zaangażowane w przerzuty nowotworów i ich funkcja w tym procesie może być dwójaka. Z jednej strony mogą działać jako aktywatory przerzutów, a z drugiej strony mogą hamować ten proces. Takie działanie obserwowano przy: białaczkach, nasieniakach, chłoniakach, glejakach, raku piersi, trzustki, śledziony, prostaty, okrężnicy i jajnika [28]. Stwierdzono także, że miRNA-373, 520c, 155, 21, 10b aktywują proces przerzutów, zaś cząsteczki miRNA-9, 340, 34b, 34c, 148a, 126, rodzina miRNA-200, 206, 335, 146a, 146b, 29c; rodzina let-7, miRNA-101 oddziałują hamująco. Rozważa się także wykorzystanie cząsteczek miRNA w klinice nie tylko jako „broni” w terapii przy przerzutach nowotworów, ale także jako markerów nowotworowych [28]. W tym momencie warto wspomnieć o badaniach [7, 11, 23, 27, 32, 48], które mogą zapoczątkować nowy nurt terapeutyczny w leczeniu nowotworów. Obiektem tych badań były cząsteczki siRNA skierowane przeciwko genom kodującym elementy kompleksu telomerazy, enzymu wykazującego dużą aktywność w komórkach nowotworowych. W przeprowadzonych badaniach udało się uzyskać znaczny spadek syntezy i aktywności telomerazy. Nastąpiło to w wyniku działania cząsteczek siRNA na różne podjednostki telomerazy, co powodowało zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych. Najczęściej była to podjednostka katalityczna o aktywności odwrotnej transkryptazy, tzw. hTERT (ang. *human telomerase reverse transcriptase*), rzadziej cząsteczka RNA stanowiąca matrycę dla wydłużania jednoniciowego fragmentu telomeru, tzw. hTR (ang. *human telomerase RNA*) [23, 27]. Skuteczność takiego postępowania wykazano w przypadku komórek raka prostaty (PC3, DU145) [11], szyjki macicy [7], żołądka (SGC7901) [31], wątroby (SMMC-7721) [31], pęcherza moczowego (T24) [31], krtani (Hep2) oraz glejaków (U87MG) [48].

MikroRNA A WYBRANE INFEKCJE WIRUSOWE I CHOROBY NEUROLOGICZNE

Wykazano, że miRNA jest również kodowane przez wirusy mające materiał genetyczny w postaci dsDNA (tab. 2), chociaż możliwość kodowania miRNA przez inne wirusy nie jest wykluczona [30, 37]. Wirusowe miRNA może interferować z mRNA komórek zakażonych, regulując w ten sposób ekspresję genów. Wykazano [14, 33], że miRNA kodowane przez ludzki herpeswirus KSHV (ang. *Kaposi's-*

TABELA 2. Wirusy kodujące mikroRNA [13, 18, 39] – TABL E2. Viruses encoding microRNA [13, 18, 39]

Rodzina	Podrodzina/Rodzaj	Nazwa wirusa	Gospodarz	Liczba identyfikowanych pre-mikroRNA	Nazwa mikroRNA
<i>Herpesviridae</i>	<i>Alphaherpesviridae</i> / <i>Simplexvirus</i>	HSV-1	człowiek	1	miR-H1
	<i>Alphaherpesviridae</i> / <i>Mardivirus</i>	MDV1	kureczak	12	miR-M1 do miR-M12
		MDV2	kureczak	17	miR-M14 do miR-M30
	<i>Betaherpesviridae</i> / <i>Cytomegalovirus</i>	hCMV	człowiek	11	miR-UL22A, miR-UL36, miR-UL70, miR-UL112, miR-UL148D, miR-US4, miR-US5-1, miR-US5-2, miR-US25-1, miR-US25-2, miR-US33
		mCMV	mysz	18	miR-M23-1, miR-M23-2, miR-M44-1, miR-M55-1, miR-M87-1, miR-M95-1, miR-m01-1, miR-m01-2, miR-m01-3, miR-m01-4, miR-m21-1, miR-m22-1, miR-m59-1, miR-m59-2, miR-m88-1, miR-m107-1, miR-m108-1, miR-m108-2
		EBV	człowiek	23	miR-BART1 do miR-BART20; miR-BHRF1-1 do miR-BHRF1-3
	<i>Gammaherpesviridae</i> / <i>Lymphocryptovirus</i>	rLCV	małpa	16	miR-rL1-1 do miR-rL1-16
	<i>Gammaherpesviridae</i> / <i>Rhadinovirus</i>	KSHV	człowiek	12	miR-K12-1 do miR-K12-12
		RRV	małpa	7	miR-rR1-1 do miR-rR1-7
		MHV68	mysz	9	miR-M1-1 do miR-M1-9
<i>Polioviridae</i>	<i>Poliovirus</i>	SA40 SA12	małpa	1	miR-S1
<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	hAV	małpa	1	nienazwane
		HvAV	człowiek	1	nienazwane
<i>Ascoviridae</i>	<i>Ascovirus</i>	HvAV	motyl	1	HvAV-miR-1

Objaśnienia: HSV-1 – ludzki wirus herpes typu 1; MDV1 i MDV2 – wirus choroby Mareka typu 1 i 2; hCMV – ludzki herpesvirus typu 5; mCMV – mysi wirus cytomegalii; EBV – wirus Epsteina Barr; rLCV – małpi limfokryptowirus; KSHV – wirus mięsaka Kaposiego; RRV – małpi radinowirus; MHV68 – mysi herpesvirus-68; SV40 – małpi wirus 40; SA12 – małpi poliomawirus 12; hAV – ludzki adenowirus; HvAV – owadzi askowirus

sarcoma-associated herpes virus), określane jako miR-K12-11, funkcjonujące jako ortolog komórkowego miRNA-155, umożliwiając replikację tego wirusa przez obniżenie ekspresji genów odpowiedzialnych za wzrost i apoptozę komórek. Ponadto wysoką ekspresję miRNA-155 obserwowano także w przebiegu zakażenia wirusem EBV (ang. *Epstein-Barr virus*) [46].

W badaniach przeprowadzonych *in vitro* wykazano, że miRNA hamuje replikację wirusa HIV-1 (ang. *human immunodeficiency virus-1*) w obwodowych jednojądrzastych komórkach krwi pochodzącej od ludzi zainfekowanych tym wirusem, a także w przetrwałych, zakażonych liniach komórkowych [37]. Okazało się także, że wirus HIV-1 ma zdolność hamowania ekspresji miR-17/92, ponieważ taka supresja jest niezbędna do jego efektywnej replikacji [37]. Badania Hunga i wsp. [17] wykazały, że komórkowe miRNA (miRNA-28, miRNA-125b, miRNA-150, miRNA-223 i miRNA-382) hamuje ekspresję wirusa HIV-1 w spoczynkowych limfocytach T (CD4+). W wyniku związania miRNA z regionem 3'-UTR mRNA wirusa HIV-1 dochodzi do zahamowania translacji białek wirusowych Tat i Rev. Jak uważają badacze, nieefektywna ekspresja białka Tat w spoczynkowych limfocytach T (CD4+), odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu latencji wirusa HIV-1. Kolejne badania nad wirusem HIV [47] wskazały, że hamowanie jego ekspresji w spoczynkowych limfocytach T (CD4+) można przeprowadzić stosując specyficzne inhibitory anty-miRNA. Podczas badań nad wirusem PFV-1 (ang. *primate foamy virus-1*) [1] zarejestrowano, że ludzkie komórkowe miRNA-32 efektywnie ograniczają replikację tego wirusa w zakażonych liniach komórkowych HeLa. Z drugiej jednak strony wirus ten nabył zdolność blokowania wyciszania genów w drodze interferencji RNA, co realizuje przez kodowanie białka TAS, które jest supresorem miRNA w komórkach ssaków [1]. U ludzi wykazano, że wytwarzany i uwalniany w odpowiedzi na zakażenie wirusem HCV interferon typu 1 indukuje ekspresję wielu cząsteczek miRNA: miRNA-196, miRNA-296, miRNA-351, miRNA-431, miRNA-448, które mogą hamować replikację tego wirusa [30]. Badania naukowców z Danii i USA donoszą o opracowaniu nowej metody walki z wirusowym zapaleniem wątroby typu C [21]. Przedmiotem ich badań stała się cząsteczka miRNA-122, która w dużej ilości występuje w wątrobie. Pierwsze eksperymenty na hodowlach komórkowych tego narządu wskazały, że miR-122, przyłącza się do wirusa HCV, umożliwiając mu namnażanie się w komórkach wątroby. Zainspirowani tym faktem naukowcy postanowili przeprowadzić podobne doświadczenie na szympanсах z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C. Zwierzętom podawano lek opracowany na bazie kwasu nukleinowego – SPC3649, który miał blokować w wątrobie miRNA-122. Po trwającej trzy miesiące kuracji okazało się, że u zwierząt, którym podawano lek w większej dawce (5 mg/kg masy ciała), liczba wirusów w komórkach wątroby, jak i we krwi spadła aż 350 razy, objawy choroby cofnęły się, a efekt ten utrzymywał się przez kolejne miesiące. W chwili obecnej trwają już pierwsze testy preparatu SPC3649 z udziałem ludzi, jednak jak na razie mają one na celu sprawdzenie bezpieczeństwa leku [21]. Niedawno wykazano również udział cząsteczek miRNA w przebiegu latentnej infekcji wirusem HSV-1 (ang. *herpes simplex virus-1*) [38]. W stanie latencji ekspresja wszystkich genów tego wirusa zostaje zatrzymana, z

wyjątkiem transkrypcji genu dla LAT (transkrypt latencyjny). Dziś już wiadomo, że w komórkach zainfekowanych HSV-1, transkrypt LAT funkcjonuje jako prekursor miRNA i koduje cztery główne typy miRNA (mir-H2-3p, mir-H4-3p, mir-H2-5p, mir-H4-5p) [38].

Badania z 2008 i 2009 roku wykazały, że miRNA ma również związek z takimi chorobami, jak choroba Parkinsona [40] i Alzheimer [16, 41]. Wykazano [40], że istnieje ścisły związek między polimorfizmem czynnika FGF20 (ang. *fibroblast growth factor 20*) i miRNA-433 a ryzykiem wystąpienia choroby Parkinsona. W mózgu ludzi zdrowych zanotowano wysoką ekspresję miRNA-433, której nie obserwowano w innych narządach (serce, wątroba, śledziona). Wykazano, że miRNA-433 przez wiązanie się z transkryptem mRNA genu *FGF20* zawierającym allel C działa jako negatywny regulator translacji FGF20, jeżeli natomiast ten sam transkrypt wiąże się z miRNA-433, lecz w obszarze zawierającym allel T, to dochodzi do wysokiej translacji FGF20 do białka. Z kolei wzrost translacji FGF20 prowadzi do nadprodukcji toksycznej postaci neuronalnego białka α -synukleiny, pierwotnie uważanego za bezpośrednią przyczynę choroby Parkinsona [40]. Przeprowadzone badania sugerują także, że miRNA-107 może być zaangażowane w rozwój choroby Alzheimer [16, 41]. U pacjentów z tą chorobą obserwowano znaczący spadek poziomu miRNA-107 i wyraźny wzrost ekspresji genu *BACE1* (ang. *β -amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1*) [16, 41].

PODSUMOWANIE

Na podstawie przytoczonych faktów można stwierdzić, że cząsteczki miRNA są obecnie uważane za „materiał” o ogromnym potencjale biologicznym, w tym także aplikacyjnym. W przyszłości będzie można wykorzystać je w leczeniu chorób o etiologii wirusowej i bakteryjnej, a przede wszystkim (na podstawie ich ekspresji) monitorować i zapobiegać chorobom nowotworowym.

LITERATURA

- [1] ALVAREZ-GARCIA I, MISKA EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development* 2005; **132**: 4653–4662.
- [2] BACKOFEN R, BERNHART SH, FLAMM C, FRIED C, FRITZSCH G, HACKERMULLER J, HERTEL J, HOFACKER IL, MISSAL K, MOSIG A, PROHASKA SJ, ROSE D, STADLER PF, TANZER A, WASHIETL S, WILL S. RNAs everywhere: genome-wide annotation of structured RNAs. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2007; **308**: 1–25.
- [3] BALTIMORE D, BOLDYN MP, O'CONNELL RM, RAO DS, TAGANOV KD. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nature Immunology* 2008; **9**: 839–845.
- [4] BARTEL DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell* 2004; **116**: 281–297.
- [5] CARISSIMI C, FULCI V., MACINO G. MicroRNAs: Novel regulators of immunity. *Autoimmunity Reviews* 2009; **8**: 520–524.
- [6] CIEPLUCH A, JAMROZIAK K, ROBAK T. Perspektywy zastosowania mikroRNA w leczeniu nowotworów. *Acta Haemat Pol* 2007; **38**: 425–435.

- [7] DE SOUZA NASCIMENTO P, ALVARES G, FIEDLER W. Telomerase inhibition by an siRNA directed against hTERT leads to telomere attrition in HT29 cells. *Oncol Rep* 2006; **16**: 423–428.
- [8] FARAONI I, ANTONETTI FR, CARDONE J, BONMASSAR E. MiR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 497–505.
- [9] FILIP A. MikroRNA: nowe mechanizmy regulacji ekspresji genów. *Post Bioch* 2007; **53**: 413–419.
- [10] 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; **391**: 806–811.
- [11] GANDELLINI P, FOLINI M, BANDIERA R, DE CESARE M, BINDA M, VERONESE S, DAIDONE MG, ZUNINO F, ZAFFARONI N. Down-regulation of human telomerase reverse transcriptase through specific activation of RNAi pathway quickly results in cancer cell growth impairment. *Biochem Pharmacol* 2007; **73**: 1703–1714.
- [12] GHILDIYAL M, ZAMORE P.D. Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature* 2009; **10**: 94–108.
- [13] GOTTSWEIN E, CULLEN BR. Viral and cellular microRNAs as determinants of viral pathogenesis and immunity. *Cell Host Microbe* 2008; **3**: 375–387.
- [14] GOTTSWEIN E, MUKHERJEE N, SACHSE C, FRENZEL C, MAJOROS WH, CHI JT, BRAICH R, MANOHARAM, SOUTSCHEK J, OHLER U, CULLEN BR. A viral microRNA functions as an orthologue of cellular mir-155. *Nature* 2007; **450**: 1096–1099.
- [15] GROSSHANS H, FILIPOWICZ W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature* 2008; **451**: 414–416.
- [16] HEBERT SS, HORRE K, NICOLAI L, BERGMAN B, PAPADOPOULOU AS, DELACOURTE A, STROOPER BD. MicroRNA regulation of Alzheimer's amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis* 2009; **33**: 422–428.
- [17] HUANG J, WANG F, ARGYRIS E, CHEN K, LIANG Z, TIAN H, HUANG W, SQUIRES K, VERLINGHERI G, ZHANG H. Cellular microRNAs contribute to HIV-1 latency in resting primary CD4+ T lymphocytes. *Nature Med* 2007; **13**: 1241–1247.
- [18] HUSSAIN M, RYAN J, TAFT J, ASGARI S. An insect virus-encoded microRNA regulates viral replication. *J Virol* 2008; **82**: 9164–9170.
- [19] JOHNNIDIS JB, HARRIS MH, WHEELER RT, STEHLING-SUN S, LAM MH, KIRAK O, BRUMMEL-KAMP TR, FLEMING MD, CAMARGO FD. Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008; **451**: 1125–1130.
- [20] KOWAL M. Znaczenie mikroRNA w onkogenezie. *Acta Haemat Pol* 2007; **38**: 275–290.
- [21] LANFORD RE, HILDEBRANDT-ERIKSEN ES, PETRI A, PERSSON R, LINDOW M, MUNK ME, KAUPPINEN S, ORUM H. Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science* 2010; **327**: 198–201.
- [22] LI SC, TANG P, LIN WC. Intronic micro-RNA: discovery and biological implications. *DNA Cell Biol* 2007; **26**: 195–207.
- [23] LI Y, LI H, YAO G, LI W, WANG F, JIANG Z, LI M. Inhibition of telomerase RNA (hTR) in cervical cancer by adenovirus-delivered siRNA. *Cancer Gene Ther* 2007; **14**: 748–755.
- [24] LINDSAY MA. MicroRNAs and the immune response. *Trends Immunol* 2008; **29**: 343–351.
- [25] LINSLEY PS, SCHELTER J, BURCHARD J, KIBUKAWA M, MARTIN MM, BARTZ SR, JOHNSON JM, CUMMINS JM, RAYMOND CHK, DAI H, CHAU N, CLEARY M, JACKSON AL, CARLETON M, LIM L. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol* 2007; **27**: 2240–2252.
- [26] MAJOREK K, KRZYŻOSIAK WJ. Rola mikroRNA w patogenezie, diagnostyce i terapii nowotworów. *Współcz Onkol* 2006; **10**: 359–366.
- [27] NATARAJAN S, CHEN Z, WANCEWICZ EV, MONIA BP, COREY DR. Telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA and telomerase RNA (hTR) as targets for downregulation of telomerase activity. *Oligonucleotides* 2004; **14**: 263–273.
- [28] NICOLOSO MS, SPIZZO R, SHIMIZU M, ROSSI S, CALIN G.A. MicroRNAs-the micro steering wheel of tumor metastases. *Natural Rev Cancer* 2009; **9**: 293–302.
- [29] OUELLET DL, PERRON MP, GOBELI LA, PLANTE P, PROVOST P. MicroRNAs in gene regulation : when the smallest governs it all. *J Biomed Biotechnol* (on-line) 2006: article ID 69616: 1–20.
- [30] PEDERSEN IM, CHENG G, WIELAND S, VOLINIA S, CROCE CM, CHISARI FV, DAVID M. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature* 2007; **449**: 919–922.
- [31] RUBIŚ B, PÓLROLNICZAK A, RYBCZYŃSKA M. siRNA skierowane przeciwko telomerazie – skuteczne narzędzie w leczeniu nowotworów. *Post Bioch* 2008; **54**: 384–392.

- [32] SHAW JW, WRIGHT WE. Telomerase therapeutics for cancer: challenges and new direction. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 577–584.
- [33] SKALSKY RL, SAMOLS MA, PLAISANCE KB, BOSS IW, RIVAA, LOPEZ MC, BAKER HV, RENNE R. Kaposi's sarkoma-associated herpesvirus encodes an ortholog of miR-155. *J Virol* 2007; **81**: 12836–12845.
- [34] SZARZYŃSKA B, SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, JARMOŁOWSKIA A. Mikrozarządzanie. *Biotechnologia* 2005; **7**: 144–164.
- [35] SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z, SZARZYŃSKA B. Nagroda Nobla 2006 za fundamentalne odkrycia w regulacji ekspresji genów u eukariontów. *Post Biol Kom* 2007; **1**: 3–13.
- [36] TILIE, MICHAILLE IJ, CIMINO S, COSTINEAN S, DUMITRU CD, ADRIA B, FABBRI M, ALDER H, LIU CG, CALIN GA, CROCE CM. Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/ TNF-alpha stimulation and their possible role in regulation the response to endotoxin shock. *J Immunol* 2007; **179**: 5082–5089.
- [37] TRIBOULET R, MARI B, LIN YL, CHABLE-BESSIA C, BENNASSER Y, LEBRIGAND K, CARDINAUD B, MAURIN T, BARBY P, BAILLAT V, REYNES J, CORBEAU P, JEANG KT, BENKIRANE M. Suppression of microRNA-silencing pathway by HIV-1 during virus replication. *Science* 2007; **315**: 1579–1582.
- [38] UMBACH JL, KRAMER MF, JURAK I, KARNOWSKI HW, COENDM, CULLEN BR. MicroRNAs expresses by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 2008; **454**: 780–785.
- [39] UMBACH JL, CULLEN BR. The role of RNAi and microRNAs in animal virus replication and antiviral immunity. *Genes Dev* 2009; **23**: 1151–1164.
- [40] WANG G, VAN DER WALT JM, MAYHEW G, LI YJ, ZÜCHNER S, SCOTT WK, MARTIN ER., VANCE LM. Variation in the miRNA-433 binding site of FGF20 confers risk for Parkinson disease by over-expression of alpha-synuclein. *Am J Hum Genet* 2008; **82**: 283–289.
- [41] WANG WX, RAJEEV BW, STROMBERG AJ, REN N, TANG G, HUANG Q, RIGOUTSOS I, NELSON PT. The expression of microRNA mir-107 decreased in Alzheimer's disease and may accelerate disease progression through regulation of β -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme 1. *J Neurosci* 2008; **28**: 1213–1223.
- [42] WARKOCKI Z, FIGLAROWICZ M. Krótkie interferencyjne RNA działające in trans. *Post Bioch* 2006; **52**: 253–259.
- [43] WILLIAMS AE. Functional aspect of animal microRNAs. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 545–562.
- [44] WIŚNIEWSKAA, FILIPECKI M. Wyciszenie genów jako strategia badania ich funkcji w roślinach. *Post Biol Komórki* 2003; **30**: 339–358.
- [45] XIAO C, SRINIVASAN L, CALADO DP, PATTERSON HC, ZHANG B, WANG J, HENDERSON JM, KUTOK JL, RAJEWSKY K. Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat Immunol* 2008; **9**: 405–414.
- [46] YIN Q, MCBRIDE J, FEWELL C, LACEY M, WANG X, LIN Z, CAMERON J, FLEMINGTON EK. MicroRNA-155 as an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulate gene expression pathways. *J Virol* 2008; **82**: 5295–5306.
- [47] ZHANG H. Reversal of HIV-1 latency with anti-microRNA inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**: 451–454.
- [48] ZHAO P, WANG C, FU Z, SOU Y, CHEN Y, LU X, LU A, LIU N, PU P, KANG C, SALFORD LG, FAN X. Lentiviral vector mediated siRNA knock-down of hTERT results in diminished capacity in invasiveness and in vivo growth of human glioma cells in a telomere length-independent manner. *Int J Oncol* 2007; **31**: 361–368.

Redaktor prowadzący – M. Nowicki

Otrzymano: 10.01. 2010 r.

Przyjęto: 25.04. 2010 r.

Beata Hukowska-Szematowicz, dr n. biol.

Katedra Mikrobiologii i Immunologii, Uniwersytet Szczeciński,

ul. Z. Felczaka 3c, 71-412 Szczecin

e-mail: beatahukowska@poczta.onet.pl