

Era RNA



ELŻBIETA KIERZEK

Instytut Chemii Bioorganicznej, Poznań
Polska Akademia Nauk
elzbieta.kierzek@ibch.poznan.pl
Dr Elżbieta Kierzek opracowała i wykorzystuje metodę mikromacierzy izoenergetycznych w badaniach RNA

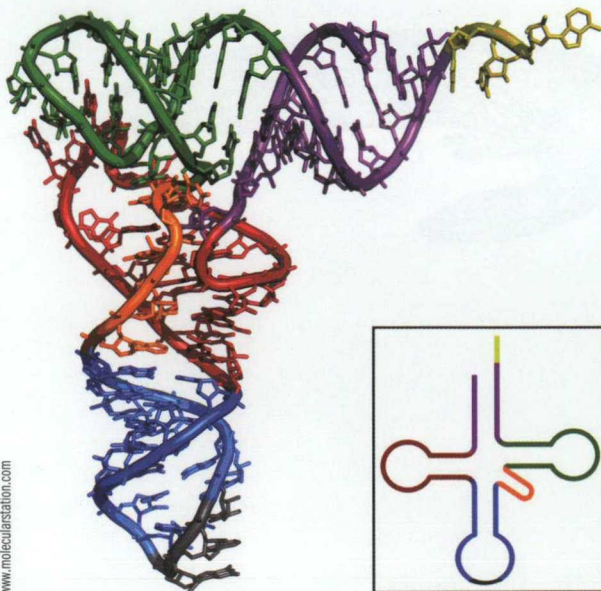


RYSZARD KIERZEK

Instytut Chemii Bioorganicznej, Poznań
Polska Akademia Nauk
rkierzek@ibch.poznan.pl
Prof. dr hab. Ryszard Kierzek kieruje Pracownią Chemii RNA Instytutu Chemii Bioorganicznej

RNA jest niezwykłą cząsteczką i prawdopodobnie już wkrótce znajdzie zastosowanie w terapii wielu ciężkich chorób. Jego strukturę i funkcje można badać, stosując mikromacierze izoenergetyczne

Prawie wszyscy znamy słowa piosenki „...życie jest formą istnienia białka...”. Tak, to prawda, ale także formą istnienia kwasów nukleinowych – DNA i RNA. Te trzy



Struktura „płaska” (drugorzędowa – obrazek w ramce) i przestrzenna (trzeciorzędowa) transferowego kwasu rybonukleinowego (tRNA)

cząsteczki to najważniejsze związki organiczne na Ziemi. To one grają kluczową rolę w życiu każdego organizmu żywego i wirusów. RNA jest z tych trzech cząsteczką szczególną. Ze względu na jego właściwości prawdopodobna wydaje się hipoteza „świata RNA”, w którym RNA był pierwszą cząsteczką z tej triady, jaka pojawiła się na Ziemi. RNA był chemicznie nietrwały w panujących warunkach geologicznych i został zastąpiony przez chemicznie trwalszy DNA. Właściwości katalityczne RNA też były ułomne i funkcje te przejęły w komórce wyspecjalizowane białka.

RNA ważny od dawna

Ostatnie 30 lat w biologii to w dużej mierze era RNA. Już od dłuższego czasu wiadano, że istnieją trzy rodzaje RNA, spełniające różne funkcje w biosyntezie białek. Rybosomalne RNA (rRNA) budują z białkami rybosom, na którym zachodzi biosynteza białka. Istnieją transferowe RNA (tRNA), będące „kurierami” dostarczającymi aminokwasy do odpowiedniego miejsca rybosomu. I wreszcie są informacyjne RNA (mRNA), będące matrycą w procesie biosyntezy białka.

Na przełomie lat 70. i 80. ubiegłego wieku biochemicy amerykańscy Thomas Cech i Sidney Altman odkryli, że bez udziału enzymów białkowych w niektórych RNA może dochodzić do hydrolizy i utworzenia określonych wiązań internukleotydomowych. Doprowadziło to do powstania nowej klasy enzymów niebiałkowych zwanych rybozymami. Uważa się, że właściwości autokatalityczne RNA to rodzaj „biochemicznej skamieniałości” z okresu „świata RNA”.

Dużą niespodzianką było też odkrycie, że nie wszystkie mRNA kodują określone białka. Badania genomów eukariotów wykazały, że w zależności od gatunku od 10 do 98% RNA to niekodujące RNA (ncRNA). Kontrolują one funkcjonowanie mRNA, szczególnie tych, które pojawiają się w komórce w wyniku stresu. Poprzez oddziaływanie pomiędzy regulatorowym ncRNA i mRNA, często także z udziałem białka, następuje kontrolowana biosynteza określonego białka niezbędnego dla komórki w warunkach pojawiającego się stresu.

Terapeutyczne RNA

Wyjątkowość RNA wynika także z faktu, że odgrywa on podwójną rolę – może być czynnikiem kontrolującym funkcje innych RNA, ale także sam może być obiektem regulacji. Wykorzystuje się to w terapii nakierowanej na RNA. Istnieją zasadniczo trzy sposoby regulacji aktywno-



Wyjątkowość RNA wynika także z faktu, że odgrywa on podwójną rolę – może być czynnikiem kontrolującym funkcje innych RNA, ale także sam może być obiektem regulacji

ści patogennych RNA. Dużą rolę odgrywa tu antysensowy oligonukleotyd, czyli „alter ego” sensowej informacji kodowanej w postaci RNA (jednociowy oligonukleotyd komplementarny do sensowego RNA). Już ponad 30 lat temu pojawiła się strategia antysensownych oligonukleotydów. Polega ona na hybrydyzacji antysensownego oligonukleotydu z komplementarnym fragmentem RNA, co prowadzi do aktywacji enzymu degradującego RNA, czyli rybonukleazy H, i w rezultacie do hydrolizy docelowego RNA. Inną możliwością jest przyłączenie antysensownego oligonukleotydu do RNA i blokowanie jego funkcji, na przykład procesu translacji („przepisywania” na białka).

Wraz z poznaniem aktywności autokatalitycznych RNA pojawiły się naturalne lub pozyskane poprzez selekcję niebiałkowe enzymy – rybozomy zdolne do hydrolizy określonego fragmentu RNA. To kolejny sposób „terapeutycznego” wykorzystania RNA. W wielu przypadkach udaje się zaprojektować miejsce przyłączenia rybozomu do patogennego RNA i hydrolizę określonego wiązania diestrowego.

Wyciszanie genów

Stosunkowo niedawno, bo 12 lat temu, pojawiła się najbardziej obiecująca metoda regulacji aktywności RNA. Amerykańscy biochemicy Andrew Z. Fire i Craig C. Mello odkryli zjawisko interferencji, czyli wyciszenia ekspresji genów przez dwuniciowe małe interferencyjne RNA (siRNA). Zwykle są to 21–23 nukleotydowe dwuniciowe cząsteczki, w których jedna z nici jest komplementarna do wyciszanego genu. W cytoplazmie tworzy się indukowany przez RNA „kompleks wyciszający” RISC (RNA-induced silencing complex) wyłączający ekspresję genu poprzez jego hydrolizę. Inny sposób wyciszenia interferencyjnego zachodzi z udziałem dłuższych mikro-RNA (miRNA), które

również wiążą się z kompleksem RISC i prowadzą do hamowania translacji mRNA. Uważa się, że przynajmniej 30% ludzkich genów jest wyciszanych w ten sposób.

Algorytm na strukturę

Aktywność biologiczna RNA jest funkcją jego struktury. Struktura drugorzędowa RNA jest znacznie bardziej skomplikowana niż DNA. RNA jest bardzo pofałdowany. Oprócz fragmentów dwuniciowych strukturę drugorzędową buduje wiele motywów, takich jak: struktury spinkowe, różnej wielkości wybrzuszenia jedno- i dwustronne, 3'- i 5'-niesparowane końce różnej długości, pętle wieloramienne. Istotny wpływ na pofałdowanie RNA ma również trwałość termodynamiczna wielu niesparowanych fragmentów. Dodatkowo na strukturę RNA wpływa wiele oddziaływań trzeciorzędowych: pseudowęzły, platformy AA czy oddziaływania współosiowe. Dla aktywności biologicznej RNA w komórce istotne są oddziaływania komplementarnych fragmentów RNA czy DNA, jak również białek wiążących się specyficznie lub niespecyficznie do rejonów jedno- i dwuniciowych. Poznanie struktury drugorzędowej RNA jest pierwszym krokiem do zrozumienia jego aktywności biologicznej i praktycznego wykorzystania RNA jako potencjalnego terapeutyku. Precyzyjne określenie pofałdowania kilkusetnukleotydowego RNA jest bardzo trudne. Określenie termodynamicznych reguł oddziaływań fragmentów helikalnych RNA, wpływu drugorzędowych oraz niektórych trzeciorzędowych motywów strukturalnych RNA na jego pofałdowanie umożliwiło z około 80% dokładnością przewidywanie struktury drugorzędowej RNA. Reguły te zostały opracowane w grupie Douglasa Turnera z University of Rochester, przy znaczącym udziale naszego zespołu badawczego, a algorytmy najczęściej stosowa-

Sztukatura i funkcja kwasu rybonukleinowego



Beetlelaas/Wikipedia Commons

Ostatnie 30 lat w biologii to w dużej mierze era RNA. Analizę kwasu rybonukleinowego wykonuje się w większości instytutów biochemicznych

nych programów komputerowych, takich jak *Mfold* czy *RNAstructure*, służące do przewidywania struktury drugorzędowej RNA, oparte są właśnie na tych parametrach termodynamicznych. Istnieją także eksperymentalne sposoby określania struktury drugorzędowej RNA. Są to metody mapowania chemicznego i enzymatycznego. W pierwszej wykorzystuje się różną reaktywność chemiczną określonych reagentów chemicznych i reszt nukleotydowych w rejonach jedno- i dwuniciowych. Natomiast mapowanie enzymatyczne wykorzystuje do tego celu enzymy – nukleazy specyficzne do fragmentów jedno- i dwuniciowych RNA. Wyniki mapowania chemicznego i enzymatycznego mogą służyć jako wyznaczniki do programów *Mfold* czy *RNAstructure*. Dzięki temu przewidują pofałdowanie RNA, które cechuje się najniższą energią swobodną, i równocześnie charakter rejonów jedno- i dwuniciowych jest zgodny z eksperymentalnymi wynikami mapowania.

Wykorzystanie mikromacierzy

Mapowanie chemiczne i enzymatyczne, służące określeniu sposobu pofałdowania RNA, jest uciążliwe i pracochłonne. Dodatkowo, określenie reszt nukleotydowych ulegających modyfikacji chemicznej lub podatnych na trawienia enzymatyczne wymaga często przepisania badanego RNA na DNA. Stosowane reagenty chemiczne czy rybonukleazy działają w warunkach odmiennych od natywnych. W skrajnych warunkach może to prowadzić do zmian struktury drugorzędowej badanego RNA.

Kilka lat temu, we współpracy z Douglasem Turnerem, zaproponowaliśmy wykorzystanie mikromacierzy oligonukleotydowych do badania struktury i oddziaływań RNA. Ten innowacyjny sposób opierał się na obserwacji, że krótkie oligonukleotydy hybrydują do rejonów jednoniciowych RNA, natomiast nie wiążą się do dwuniciowych. Początkowo jako sondy używano 2'-O-metylowanych heptanukleotydów, co było uzasadnione większą stabilnością termodynamiczną dupleksów utworzonych przez sondę i komplementarny jednoniciowy rejon badanego RNA (dupleksów hybrydacyjnych). Badania struktury 5S rRNA z *E. coli* z użyciem mikromacierzy pozwoliły zwiększyć przewidywalność poprawnego parowania zasad w 5S rRNA z 27 do 92%, ale wykazały też słabą stronę tego podejścia.

Krótkie sondy

Trwałość termodynamiczna dupleksów hybrydacyjnych zależy od ich składu nukleotydowego. W skrajnych przypadkach, dla sondy bogatej w reszty adenozyliny i urydyny mogą pojawić się trudności w detekcji dupleksu hybrydacyjnego. Niedogodność ta doprowadziła do koncepcji mikromacierzy izoenergetycznych, czyli takich, w których trwałość termodynamiczna wszystkich dupleksów hybrydacyjnych jest podobna i dodatkowo korzystniejsza. Wykorzystuje się w niej modyfikowane nukleotydy o usztywnionej konformacji rybozy, tzw. LNA (Locked Nucleic Acids). Skrócenie sond do pentanukleotydów ograniczyło pulę możliwych sond do 1024 oligonukle-

otydów. Zsyntetyzowano chemicznie 853 sondy cechujące się wystarczającą trwałością termodynamiczną dupleksów hybrydacyjnych. We wstępnych badaniach określono wpływ nukleotydów LNA na trwałość termodynamiczną dupleksów w zależności od ich położenia w dupleksie oraz tworzących niesparowań. Obliczone parametry termodynamiczne umożliwiają określenie trwałości termodynamicznej dowolnego dupleksu hybrydacyjnego. Kolejnym etapem było zbadanie struktury drugorzędowej pięciu retrotranspozonowych R2 5'RNA za pomocą mikromacierzy izoenergetycznych. Wyniki mapowania mikromacierzowego w różnych warunkach buforowych i temperaturach były wybiórczo weryfikowane mapowaniem chemicznym. Badania pozwoliły określić struktury drugorzędowe wszystkich pięciu R2 5'RNA, które w dużym stopniu mają korelację z ich aktywnością biologiczną. Badania pozwoliły też zidentyfikować tworzenie się trzeciorzędowego elementu strukturalnego – pseudowęzła. Mikromacierze izoenergetyczne zastosowano także do badania oddziaływań RNA z białkami oraz innymi RNA w kompleksach dwu- i trójskładnikowych. W tym przypadku obiektami badań były dwa regulatorowe RNA z *E. coli* (DsrA i OxyS RNA) oraz ich kompleksy z białkiem Hfq i określonymi mRNA, których aktywność biologiczną kontrolują analizowane RNA. Hybrydacje kompleksów dwu- i trójskładnikowych można badać na mikromacierzach w bardzo różnych warunkach eksperymentalnych, co nie jest możliwe przy zastosowaniu innych metod badawczych.

Mikromacierze izoenergetyczne mogą być także wykorzystane do poszukiwania w badanym RNA rejonów

jednociowych łatwo wiążących sondy oligonukleotydo-
we. To bardzo istotna informacja, jeśli chcemy używać antysensownych oligonukleotydów czy rybozymów jako potencjalnych terapeutyków.

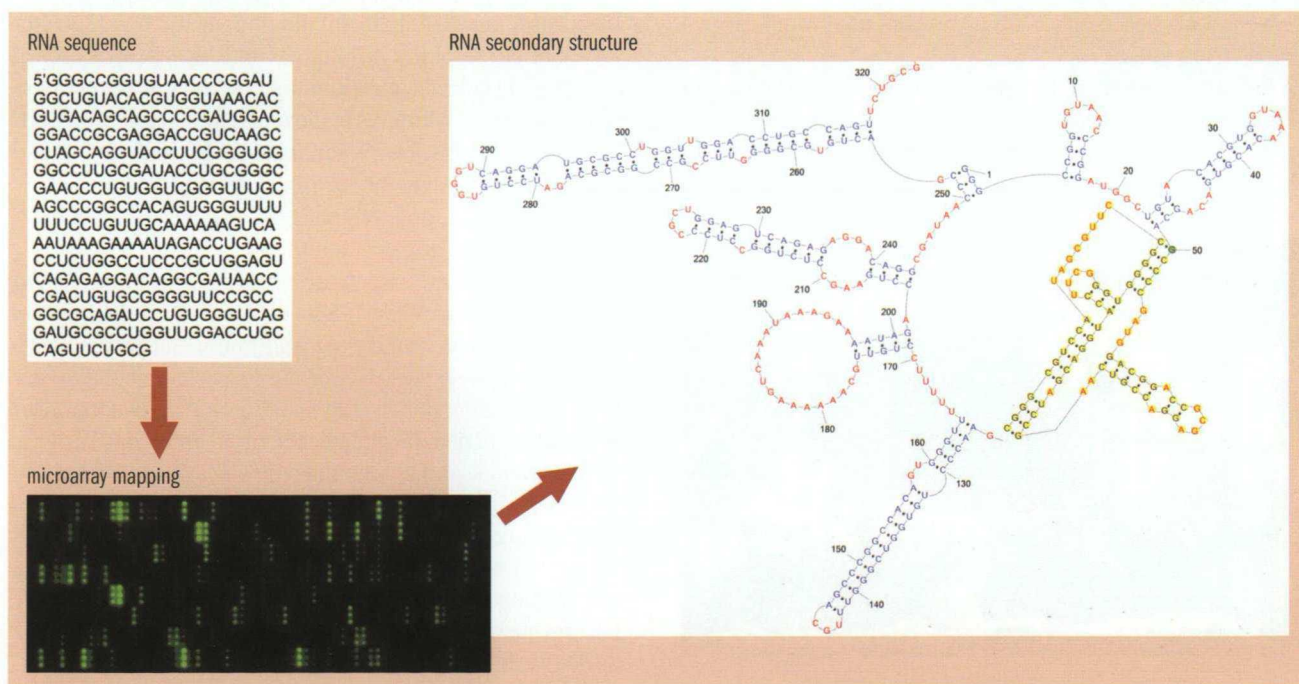
Inwestycja w przyszłość

Obecnie tylko pojedyncze antysensowne oligonukleotydy dopuszczone są do użytku jako terapeutyki. Wiele innych jest w różnych stadiach badań klinicznych. Rosnąca intensywność badań sprawia, że wykorzystanie RNA lub ich modyfikowanych analogów jako efektywnych terapeutyków jest możliwe w niedalekiej przyszłości. Także podejście, w których patogenne RNA będą obiektem działania terapeutycznego, wydaje się bliskie pomyślnego zakończenia.

RNA jest ważnym obiektem badawczym, to inwestycja w przyszłość. ■

Chcesz wiedzieć więcej?

- Gesteland R.F., Cech T.R., Atkins J.F. (2006). *RNA World*. Third Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Kierzek E., Kierzek R., Turner D.H., Catrina I.E. (2006). Facilitating RNA structure prediction with microarrays. *Biochemistry*, 45, 581–593.
- Kierzek E., Kierzek R., Moss W.N., Christensen S.M., Eickbush T.H., Turner D.H. (2008). Isoenergetic penta- and hexanucleotide microarray probing and chemical mapping provide a secondary structure model for an RNA element orchestrating R2 retrotransposon protein function. *Nucleic Acids Res.*, 36, 1770–1782.
- Kierzek E., Christensen S.M., Eickbush T.H., Kierzek R., Turner D.H., Moss W.N. (2009). Secondary structures for 5' regions of R2 retrotransposon RNAs reveal a novel conserved pseudoknot and regions that evolve under different constraints. *J. Mol. Biol.*, 390, 428–442.



Schematyczna prezentacja mapowania mikromacierzowego. Mikromacierze pozwalają przejść od sekwencji do pofalowanego RNA