

MiRNA: Od biogeneze po využití v lékařství

Veronika Vlahová^a, Kristýna Šmerková^a, Markéta Vaculovičová^{a,b}, René Kizek^{a,b}

^a Ústav chemie a biochemie, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika

^b Středoevropský technologický institut, Vysoké učení technické v Brně, Technická 10, 616 00 Brno, Česká republika

MiRNA: From biogenesis to medical utilization

MicroRNAs are small non-coding RNA molecules that are involved in post-transcriptional regulation of gene expression. They take up about 2 % of the genome and affects up to one third of the protein-coding genes. Their biogenesis starts in the cell nucleus and passes into the cytoplasm where the functional forms of miRNAs participate in the process of RNA interference.

Nowadays, the biggest interest focuses on the role of miRNAs during carcinogenesis. Mutations in the genes for various miRNAs types is to promote proliferation and inhibition of apoptosis. Therefore, the miRNA counts as a good diagnostic marker or even as a treatment method.

Přijato k publikování: 27. 2. 2014

Klíčová slova: biogeneze, diagnostický marker, Dicer, Drosha, MiRNA, RNA interference

Úvod

MicroRNA (miRNA) jsou malé endogenní molekuly RNA, které patří do skupiny nekódujících malých jaderných RNA. Velikost aktivních molekul miRNA se pohybuje zhruba okolo 22 nukleotidů. Význam těchto molekul spočívá v jejich schopnosti regulovat genovou expresi na posttranskripční úrovni¹. Tento proces probíhá navázáním na 3' UTR konec cílové mediátorové RNA (mRNA). Cílová mRNA je poté buď degradována, nebo je pozastavena její translace. Jedna molekula miRNA je navíc schopna ovlivnit více molekul mRNA.

Tímto způsobem je negativně regulována až třetina kódujících genů v genomu, což dělá z miRNA nejpočetnější skupinu regulátorů v buňce². Její působení reguluje proliferaci buněk, jejich diferenciaci a apoptózu a všeobecně ovlivňuje množství důležitých biologických procesů^{3,4}.

Geny pro miRNA jsou rozprostřeny napříč celým genomem a jejich výskyt je značný, zabírají až 2 % celého genomu⁵. Jejich výskyt je velmi konzervativní, u velmi příbuzných druhů jsou zachovány téměř všechny miRNA a homology se vyskytují i u druhů velmi vzdálených⁶.

V dnešních dnech je výzkumu miRNA věnována velká pozornost, a to hlavně díky jejímu vlivu na nádorovou transformaci buněk. Zhruba 50 % genů kódujících miRNA se nachází na fragilních částech chromozomů, které bývají pozměněny buď amplifikací, nebo delecí

v průběhu karcinogeneze⁷. MiRNA se vyskytuje jak v pozici onkogenu, kdy exprese takovéto molekuly v tumorových buňkách narůstá, tak i v pozici tumor-supresorového genu, kdy dochází ke snížení nebo naprosté absenci exprese dané miRNA^{4,8}.

Z tohoto pohledu je jasné, že díky svým vlastnostem by miRNA mohly sloužit jako ideální diagnostické markery pro zjištění pravděpodobnosti recidivity onemocnění, její odpovědi na léčbu a pravděpodobnosti vzniku metastáz. Dalším pozitivem je její větší stabilita oproti mRNA, která byla běžně používána jako diagnostický marker.

Velký potenciál má miRNA ve využití v protinádorové terapii. Díky procesu RNA interference, které se miRNA účastní, lze cíleně umlčet určité geny podporující např. proliferaci v nádorovém bujení.

V dnešních dnech probíhá velké množství studií, které se zabývají otázkou cíleného transportu miRNA do buněk nádoru, a to aniž by došlo k aktivaci imunitní odpovědi. Další otázkou je, jak docílit tlumení pouze cílových mRNA⁹.

Historie miRNA

V roce 1993 zkoumali Lee a Ambros se spolupracovníky molekuly RNA, vznikající z genu *lin-4* u *Caenorhabditis elegans*¹⁰. Tyto molekuly byly dvojího typu – delší měla 61 nukleotidů a kratší 22 nukleotidů. 5' konce těchto molekul byly identické, což vedlo k domněnce, že delší molekula slouží v buňce jako

prekurzor její kratší variantě. Důležitým zjištěním bylo, že tyto molekuly RNA se nepřepisují do žádného proteinu. Navíc obě tyto molekuly byly komplementární k 3' nepřekládanému konci (3' UTR konci) mRNA genu *lin-14*. Vědci zjistili, že *lin-4* se váže na mRNA genu *lin-14* a tím zamezuje jejímu přepisu do proteinu. Pokles hladiny tohoto proteinu zapříčiňuje přechod z prvního larválního stádia do druhého.

V roce 2000 byla objevena další malá molekula RNA s názvem *let-7* u *C. elegans*¹¹. Vědci objevili, že tato malá molekula RNA s délkou 21 nukleotidů se váže podobně jako *lin-4* na mRNA genů ovlivňujících larvální vývoj *C. elegans*. Po zvýšení exprese *let-7* dochází k posttranslační regulaci mRNA genů *lin-41* a *lin-42*, což způsobí přechod z larválního stádia do stádia dospělce.

Také bylo zjištěno, že geny pro *let-7* jsou vysoce konzervované a objevují se u různých živočišných druhů, jako u dospělých stádií kroužkvců a měkkýšů, zebříček a u octomilek¹².

Biogeneze miRNA

Geny pro miRNA se kromě chromozomu Y nacházejí na všech chromozomech. Nejčastější výskyt je v klastrech, ale mohou se vyskytovat i samostatně. Jejich největší zastoupení (asi 40%) je v intronech kódujících genů nebo v genech pro nekódující RNA¹³.

K biosyntéze miRNA (Obr. 1) dochází v jádře buňky a to prostřednictvím RNA polymerázy II, která vytváří transkript zvaný *pri-miRNA*, který je opatřen na 3' konci guanidinovou čepičkou a na 5' konci nese polyadenylový zbytek¹⁴. Tyto transkripty vznikají z intronových částí genomu o velikosti zhruba 400 nukleotidů a k jejich přepisu dochází po vystříhnutí z primárního transkriptu¹³. *Pri-miRNA* má částečně komplementární strukturu a tvoří vnitřní vlásenkové struktury¹⁵.

Tyto struktury jsou rozeznávané komplexem zvaným Mikroprocesor. Tento komplex se skládá ze dvou základních proteinů – z RNázy III, který je nazýván Droscha a z proteinu DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8), který je znám jako Pasha¹⁶. Protein Droscha je schopný rozeznat *pri-miRNA* od ostatních prekurzorů RNA, které také nesou vlásenky, a protein Pasha rozeznává dsRNA a vyhledává na molekule místo sestřihu, který zajistí RNázová aktivita proteinu Droscha¹⁷. Po sestřihu zprostředkovaným Mikroprocesorem se mění prekurzor na *pre-miRNA*. Tento prekurzor má strukturu úplné vlásenky

s přesahem 2 nukleotidů na 3' konci a délkou zhruba 70 nukleotidů¹⁸.

Tyto procesy probíhají v jádře. Za přepravu prekurzoru *pre-miRNA* skrze jaderné póry z jádra do cytoplazmy je zodpovědný transportní komplex Exportin 5¹⁹. Ten za přítomnosti kofaktoru Ran rozpoznává specifickou sekvenci vlásenky *pre-miRNA*. Na kofaktor Ran se váže GTP. Po hydrolyze GTP na GDP dochází k aktivaci komplexu Exportin 5 a k transportu *pre-miRNA* do cytoplazmy buňky²⁰.

V cytoplazmě je *pre-miRNA* rozpoznávána enzymem Dicer, což je ATP-dependenční multidoménový enzym, který se řadí do skupiny RNáz typu III o velikosti až 200 kD⁹. Dicer je v komplexu s dsRNA vazebným proteinem TRBP (trans-activator RNA binding protein). Tento komplex štěpí dlouhé *pre-miRNA* na krátké fragmenty o délce zhruba 22 nukleotidů, které se účastní RNA interference²¹.

RNA interference

Po působení enzymu Dicer vznikly tedy krátké duplexy RNA:RNA²². Tento duplex se rozděluje na vedoucí („guide“) řetězec a za „passenger“ řetězec (často značený RNA*), přičemž vedoucí řetězec se účastní umlčování mRNA, zatímco vedlejší řetězec je degradován. Nicméně v posledních studiích se zjistilo, že se aktivními řetězci mohou stát oba řetězce z duplexu RNA:RNA, kdy jeden je značen 5p a druhý 3p. Preference jednoho či druhého řetězce závisí na druhu tkáně²³.

Řetězec miRNA je navázán na komplex RISC (RNA-induced silencing complex), zatímco druhý řetězec je v cytoplazmě ihned degradován. Aktivní miRNA navázaná v RISC se váže na 3' UTR konec mRNA podle komplementarity bází, tento proces probíhá na polyribozomech. Centrum komplexu RISC tvoří proteiny z argonautové rodiny, speciálně Ago²⁴. Tento protein se váže se dvěma doménami, které jsou důležité v procesu RNA interference – domény PIWI a PAZ²⁵. Na doménu PAZ se vážou dva nukleotidy přesahující na 3' konci miRNA. Na PIWI doménu se váže 5' konec miRNA. PIWI doména funguje jako endoribonukleáza a štěpí mRNA, která se páruje s danou miRNA v komplexu. Ago 2 protein je řídicím centrem štěpící aktivity komplexu RISC²⁶.

Proces RNA interference (RNAi) může probíhat dvěma způsoby a je závislý na míře komplementarity sekvencí miRNA a cílové mRNA. Jestliže dochází k přesnému párování sekvencí mezi miRNA a mRNA,

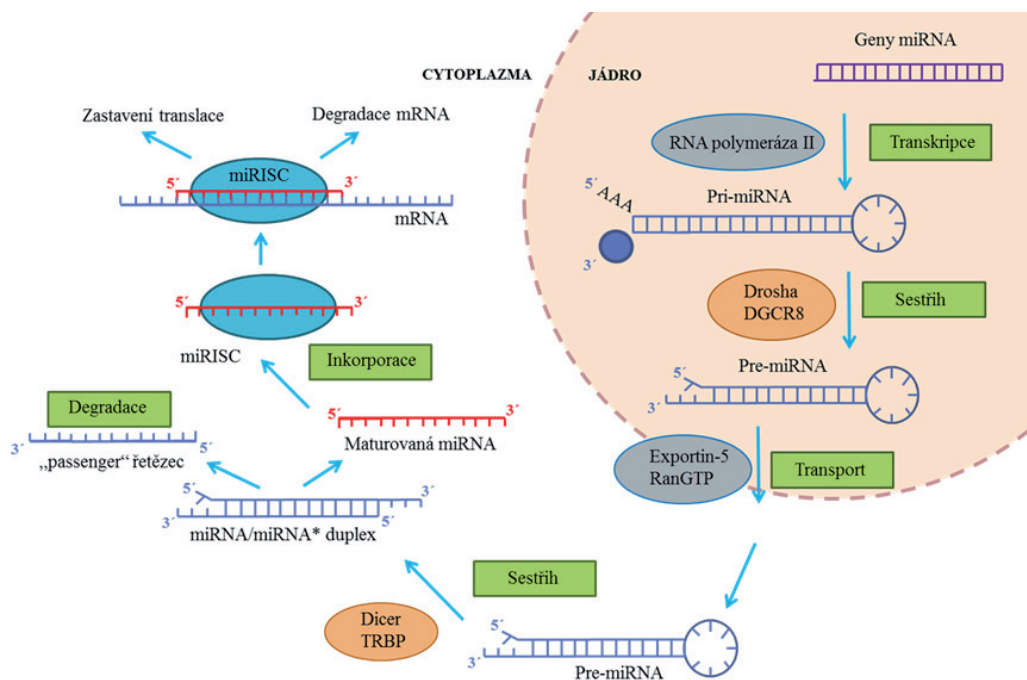
dochází k degradaci mRNA. Tento případ není u savců příliš běžný²⁸. Jestliže dochází jen k částečnému párování sekvencí, vznikají v duplexu vlásenky a výdutě. V tomto případě dochází k potlačení translace²⁹. Díky nepřesnému párování má jedna miRNA vliv na velké množství různých mRNA a má tak velký vliv na buněčnou fyziologii⁵

MiRNA a rakovina

Zjištění, že více jak polovina genů pro miRNA leží na fragilních částech chromozomů, které nejvíce podléhají mutačním změnám při rakovinném bujení, ať už se jedná o delece, amplifikace či translokace, vedlo k přesvědčení, že tyto malé molekuly hrají velkou roli ve vývoji rakoviny. V dnešních dnech probíhají mnohé studie ohledně výskytu a role jednotlivých miRNA v různých typech nádorů. Jak už bylo dříve zmíněno, miRNA se vyskytují v genomu v podobě onkogenů i v podobě tumor-supresorových genů a podle toho

také kolísá hladina jejich výskytu v rakovinové tkáni. Proto se s miRNA počítá jako s dobrým diagnostickým markerem, který by mohl určit jak druh tumoru, tak prognózu nebo stanovit míru reakce na podané léčivo. Příkladem je studie z roku 2005, kdy bylo využito stanovení miRNA pro určení progresu u chronické lymfoidní leukémie³⁰ nebo určení 7 typů miRNA u rakoviny žaludku, jejichž přítomnost zaručila přežití pacientů bez relapsu onemocnění³¹. Obdobně u kožního melanomu bylo zjištěno, že nízká hladina miR-191 a vysoká hladina miR-193 byla spojena s krátkou dobou přežití³².

Ovšem důležitější využití miRNA jako biomarkeru je v predikci reakce na specifickou terapii. Například u pacientů trpících hepatocelulárním karcinomem je snižená hladina miR-26 spojena s horší prognózou, avšak tito pacienti lépe reagují na léčbu interferonem- α ³³. Tím by bylo možné určení pacientů, pro které je léčba interferonem vhodnější. Naopak při určení zvý-



Obr. 1: Biogeneze miRNA. Prekurzor miRNA (pri-miRNA) je přepsán RNA polymerázou II. Pomocí komplexu Drosha/Pasha je pri-miRNA sestříhnuta na pre-miRNA, která je následně transportována do cytoplazmy pomocí komplexu Exportin 5. V cytoplasmě je pre-miRNA vyhledána komplexem Dicer, který sestříhne prekurzor na krátké duplexy RNA:RNA. Jeden řetězec z duplexu je degradován a druhý je navázán do komplexu RISC. Převzato a upraveno dle²⁷

šené hladiny miR-21 se projevila snížená odpověď na léčbu gemcitabinem u pacientů s rakovinou slinivky³⁴.

S touto problematikou také souvisí využití miRNA pro překonání rezistence vůči chemoterapeutikům. Jedna z prvních studií v této oblasti proběhla v roce 2006, kdy v buněčné kultuře buněk cholangiokarcinomu proběhla inhibice miR-21 a miR-200b, což způsobilo zvýšenou citlivost na léčivo gemcitabin³⁵. Tyto hypotézy jsou ovšem zatím na bázi in vitro studií.

Další možností využití miRNA v souvislosti s rakovinou je terapie pomocí jejího dodání do organismu-tedy vnesení supresorové miRNA, která byla mutací při vzniku rakoviny ztracena, nebo zavedení oligonukleotidů, které by blokovaly v organismu pomocí procesu RNA interference onkogenní formy miRNA³⁶.

Závěr

MiRNA je jedním z nejdůležitějších činitelů v procesu regulace genové exprese. Její význam stále roste s přibývajícimi poznatky ohledně principu jejího působení v procesu RNA interference. Její role v projevech rakovinného bujení je jasnou příčinou stále se zvyšujícího zájmu ze strany vědecké veřejnosti.

MiRNA má nesporně velký potenciál v diagnostice a léčbě rakoviny, ovšem je zde ještě mnoho nevyřešených otázek. V budoucnu je nutné zabývat se problémy při transportu miRNA k cílovým buňkám v organismu pacienta. Překážek je mnoho: překonání oběhového a imunitního systému, transport až k cílové buňce, překonání buněčné membrány a konečně samotné uvolnění miRNA do cytoplazmy.

Tato práce byla financována z projektu NanoBioTECell GA ČR P102/11/1068.

Literatura

- Ambros V.: Current Opinion in Genetics & Development, 21, 511 (2011).
- Pasquinelli A. E., Ruvkun G.: Annual Review of Cell and Developmental Biology, 18, 495 (2002).
- He L., Hannon G. J.: Nature Reviews Genetics, 5, 522 (2004).
- Johnstone R. W., Ruefli A. A., Lowe S. W.: Cell, 108, 153 (2002).
- Friedman R. C., Farh K. K. H., Burge C. B., Bartel D. P.: Genome Research, 19, 92 (2009).
- Rhoades M. W., Reinhart B. J., Lim L. P., Burge C. B., Bartel B., Bartel D. P.: Cell, 110, 513 (2002).
- Calin G. A., Sevignani C., Dan Dumitru C., Hyslop T., Noch E., Yendamuri S., Shimizu M., Rattan S., Bullrich F., Negrini M., Croce C. M.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 101, 2999 (2004).
- Kumar M. S., Lu J., Mercer K. L., Golub T. R., Jacks T.: Nature genetics, 39, 673 (2007).
- Iorio M. V., Croce C. M.: EMBO molecular medicine, 4, 143 (2012).
- Lee R. C., Feinbaum R. L., Ambros V.: Cell, 75, 843 (1993).
- Reinhart B. J., Slack F. J., Basson M., Pasquinelli A. E., Bettinger J. C., Rougvie A. E., Horvitz H. R., Ruvkun G.: Nature, 403, 901 (2000).
- Pasquinelli A. E., Reinhart B. J., Slack F., Martindale M. Q., Kuroda M. I., Maller B., Hayward D. C., Ball E. E., Degan B., Muller P., Spring J., Srinivasan A., Fishman M., Finnerty J., Corbo J., Levine M., Leahy P., Davidson E., Ruvkun G.: Nature, 408, 86 (2000).
- Rodriguez A., Griffiths-Jones S., Ashurst J. L., Bradley A.: Genome Research, 14, 1902 (2004).
- Zimmerman A. L., Wu S. Y.: Cancer Letters, 300, 10 (2011).
- Kim Y. K., Kim V. N.: Embo Journal, 26, 775 (2007).
- Lee Y., Kim M., Han J. J., Yeom K. H., Lee S., Bae S. H., Kim V. N.: Embo Journal, 23, 4051 (2004).
- Lee Y., Ahn C., Han J. J., Choi H., Kim J., Yim J., Lee J., Provost P., Radmark O., Kim S., Kim V. N.: Nature, 425, 415 (2003).
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J.: Nature, 409, 363 (2001).
- Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R.: Genes & development, 17, 3011 (2003).
- Gwizdek C., Ossareh-Nazari B., Brownawell A. M., Doglio A., Bertrand E., Macara I. G., Dargemont C.: Journal of Biological Chemistry, 278, 5505 (2003).
- Gregory R. I., Yan K. P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R.: Nature, 432, 235 (2004).
- Carthew R. W., Sontheimer E. J.: Cell, 136, 642 (2009).
- Bhayani M. K., Calin G. A., Lai S. Y.: Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, 731, 14 (2012).
- Okamura K., Ishizuka A., Siomi H., Siomi M. C.: Genes & development, 18, 1655 (2004).
- Lee I., Ajay S. S., Yook J. I., Kim H. S., Hong S. H., Kim N. H., Dhanasekaran S. M., Chinnaiyan A. M., Athey B. D.: Genome Research, 19, 1175 (2009).
- Krol J., Loedige I., Filipowicz W.: Nature Reviews Genetics, 11, 597 (2010).
- Winter J., Jung S., Keller S., Gregory R. I., Diederichs S.: Nature Cell Biology, 11, 228 (2009).
- Su H., Trombly M. I., Chen J., Wang X. Z.: Genes & development, 23, 304 (2009).
- Doench J. G., Sharp P. A.: Genes & development, 18, 504 (2004).
- Calin G. A., Ferracin M., Cimmino A., Di Leva G., Shimizu M., Wojcik S. E., Iorio M. V., Visone R., Sever N. I., Fabbri M., Iuliano R., Palumbo T., Pichiorri F., Roldo C., Garzon R., Sevignani C., Rassenti L., Alder H., Volinia S., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M.: New England Journal of Medicine, 353, 1793 (2005).
- Li X. H., Zhang Y., Zhang Y. F., Ding J., Wu K. C., Fan D. M.: Gut, 59, 579 (2010).
- Caramuta S., Eghazi S., Rodolfo M., Witten D., Hansson J., Larsson C., Lui W. O.: Journal of Investigative Dermatology, 130, 2062 (2010).
- Ji J. F., Shi J., Budhu A., Yu Z. P., Forgues M., Roessler S., Ambs S., Chen Y. D., Meltzer P. S., Croce C. M., Qin L. X., Man K., Lo C. M., Lee J., Ng I. O. L., Fan J., Tang Z. Y., Sun H. C., Wang X. W.: New England Journal of Medicine, 361, 1437 (2009).

34. Giovannetti E., Funel N., Peters G. J., Del Chiaro M., Erozenci L. A., Vasile E., Leon L. G., Pollina L. E., Groen A., Falcone A., Danesi R., Campani D., Verheul H. M., Boggi U.: *Cancer Research*, 70, 4528 (2010).
35. Meng F. Y., Henson R., Lang M., Wehbe H., Maheshwari S., Mendell J. T., Jiang J. M., Schmittgen T. D., Patel T.: *Gastroenterology*, 130, 2113 (2006).
36. Calin G. A., Cimmino A., Fabbri M., Ferracin M., Wojcik S. E., Shimizu M., Taccioli C., Zanesi N., Garzon R., Aqeilan R. I., Alder H., Volinia S., Rassenti L., Liu X., Liu C. G., Kipps T. J., Negrini M., Croce C. M.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5166 (2008).



Článek je volně šiřitelný
pod licencí Creative
Commons (BY-NC-ND).

Musí však být uveden autor a dokument nelze měnit
a používat pro komerční účely.