

AGATA TYCZEWSKA¹, MAREK FIGLEROWICZ²

Nowe oblicze „świata RNA”

Wstęp

Jednym z najistotniejszych osiągnięć biologii w drugiej połowie XX wieku było poznanie podstaw molekularnych procesu ekspresji informacji genetycznej. Powstały wówczas precyzyjny i, jak sądziliśmy, całościowy schemat opisujący funkcjonowanie organizmów żywych, w sposób szczególnie koncentrował się na DNA, jako nośniku informacji genetycznej oraz białkach będących zarówno produktami końcowymi, jak i regulatorami procesu ekspresji genów. Częsteczkom RNA przypisywano jedynie drugoplanowe role, pośrednika w procesie biosyntezy białka (mRNA, tRNA), szkieletu spajającego multienzymatyczne kompleksy (rybosomy, spliceosomy), pozostałości po pierwotnych organizmach powstałych w próceanie pokrywającym abiotyczną Ziemię. Pogląd ten najbardziej wyraża teoria „świata RNA”, zakładająca, iż to właśnie kwasy rybonukleinowe dały początek pierwszym formom mającym cechy materii ożywionej, następnie jednak zostały zastąpione przez lepiej wyspecjalizowane biomolekuły, czyli DNA i białka.

Inną istotną cechą stworzonego w XX wieku modelu opisującego proces ekspresji informacji genetycznej była jego uniwersalność. Uważano, że dzięki tym samym mechanizmom włączane i wyłączane są geny w komórkach roślinnych i zwierzęcych. Równocześnie wierzone, iż istnieje prosta zależność między stopniem złożoności danego organizmu a liczbą genów obecnych w genomie jądrowym. Ze zdziwieniem przyjęto więc wiadomość, że w genomie *Homo sapiens* obecnych jest nie ponad 100 tys. genów, jak to wcześniej oczekiwano, lecz zaledwie około 25 tys., podobnie jak w niewielkim genomie modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana*. Co więcej dalsze analizy dowiodły, że zarówno u ssaków, jak i roślin rejony kodujące białka stanowią jedynie niewielką część genomu, zwykle zaledwie kilka procent. Prowadzone równolegle badania zjawiska zwanego alternatywnym splicingiem pokazały, że nieprawdziwą była także zasada, w myśl której z jednego pre-mRNA powstaje zawsze taki sam mRNA, a następnie takie samo białko. Okazało się więc, że zakodowana w genach informacja może być odczytywana na wiele różnych sposobów. Ostatecznym argumentem, który zmusił nas do zmiany poglądów na temat mechanizmów regulujących podstawowe procesy komórkowe, było od-

¹ Dr Agata Tyczevska, Gregor Mendel Institute of Molecular Plant Biology, Wiedeń, Austria

² Prof. dr hab. Marek Figlerowicz, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań,
e-mail: marek.figlerowicz@ibch.poznan.pl

krycie tzw. niekodujących RNA (ncRNA, ang. *noncoding RNA*), w tym szczególnie małych regulatorowych RNA (srRNA, ang. *small regulatory RNA*). Dowiodło ono, że nie tylko białka, lecz także cząsteczki RNA decydują o czasie, miejscu oraz kolejności włączania i wyłączania genów. Ponadto dowiedzieliśmy się, że u poszczególnych organizmów udział RNA w regulacji przepływu informacji genetycznej może być różny, a zatem schemat opisujący funkcjonowanie genomu nie jest tak uniwersalny, jak początkowo sądziliśmy.

Przedstawione powyżej fakty zmuszają nas do głębokiej rewizji dotychczasowych poglądów na temat funkcjonowania genomów eukariotycznych. W rezultacie, jednym z najpoważniejszych wyzwań stojących obecnie przed biologami stało się stworzenie nowego, precyzyjniejszego modelu opisującego proces ekspresji informacji genetycznej.

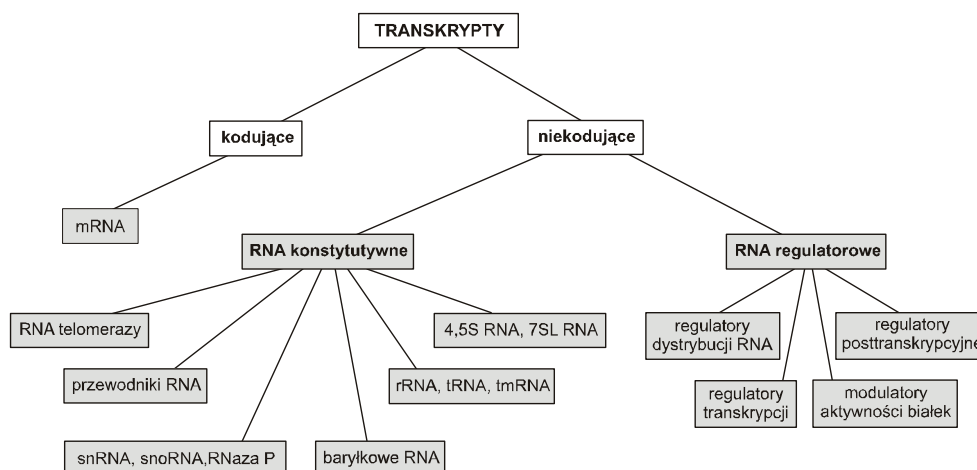
Niekodujące RNA

Pod pojęciem niekodujące RNA kryją się takie cząsteczki kwasu rybonukleinowego, które nie stanowią matrycy do syntezy białka. Nie oznacza to jednak, że nie niosą one żadnych informacji czy też że nie pełnią żadnych funkcji. Ostatnie badania wykazują, iż duża część sekwencji genomowych organizmów wyższych przepisywana jest na ncRNA, które poddawane są enzymatycznej obróbce, prowadzącej do powstawania regulatorowych lub katalitycznych RNA [1]. Okazuje się, że około 97-98% wszystkich transkryptów genomu ludzkiego to ncRNA [2-4], zakodowane zarówno w obrębie niektórych genów [5, 6], jak i w rejonach międzygenowych, które wcześniej uważane były za obszary nieulegające transkrypcji [7, 8]. Analizy z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych ujawniły, że poziom ekspresji ludzkich chromosomów 21 i 22 jest o rząd wielkości wyższy, niż określany tylko na podstawie obecności eksonów [9]. Ponadto znaczna część transkryptów zidentyfikowanych w bibliotekach cDNA myszy to niekodujące RNA, wiele z nich jest ewolucyjnie konserwatywna [10, 11]. Szacuje się, że całkowita liczba transkryptów u myszy jest co najmniej o jeden rząd wielkości wyższa niż liczba genów.

Wszystkie produkowane w organizmie cząsteczki RNA można podzielić na kodujące i niekodujące białek [12-14]. W obrębie drugiej grupy występują RNA, których geny ulegają ekspresji konstytutywnej. Odgrywają one bardzo istotne role w prawidłowym funkcjonowaniu komórek, tak jak np.: rybosomalne RNA (rRNA), transferowe RNA (tRNA), małe jądrowe RNA (snRNA), małe jąderkowe (snoRNA), RNA telomerazowe, RNA pełniące istotne funkcje podczas kontroli procesu translacji u bakterii (tmRNA) czy też będące komponentami kompleksów rybonukleoproteinowych (4.5S RNA, vRNA).

W ostatnich latach uwaga badaczy skoncentrowana została w szczególności na niekodujących RNA pełniących funkcje regulatorowe i im też poświęcona została dalsza część pracy. Cząsteczki takie zidentyfikowano zarówno u Prokaryota, jak i Eukaryota. U Eukaryota, większość z nich przypomina mRNA, są transkrybowane przez polimerazę

RNA II, posiadają czapeczkę na końcu 5' i są poliadenylowane, ale nie posiadają otwartych ramek odczytu (ORF, ang. *open reading frame*; sekwencje stanowiące matryce podczas procesu translacji).



Ryc. 1. Transkrypt pierwotny jako źródło wielu różnych typów cząsteczek RNA

Jedną z funkcji niekodujących RNA jest regulacja ekspresji genów poprzez udział w epigenetycznej modyfikacji chromatinu. Dzięki temu cząsteczki RNA wpływają na strukturę konkretnych domen chromosomalnych, a także całych chromosomów. Najprostszą formą regulacji epigenetycznej jest metylacja/demetylacja reszt cytozynowych w regionach promotorowych genów, prowadząca do włączenia/wyłączenia transkrypcji. Ze zjawiskiem takim mamy do czynienia podczas ekspresji genu kodującego kinazę sфинgozyny (SPHK1). SPHK1 jest enzymem katalizującym powstanie fosforanu sфинgozyny, zaangażowanego w wiele procesów biologicznych, np.: mitogenezę i zapobieganie apoptozie [15]. Różne tkankowo-specyficzne izoformy SPHK1 powstają na skutek wykorzystania alternatywnych miejsc startu transkrypcji genu *Sphk1*. Proces ten jest kontrolowany przez wyspę CpG długości 3700 pz, w obrębie której zlokalizowany jest w różnym stopniu zmetylowany region T-DMR (ang. *tissue-dependent differentially methylated region*). Poziom metylacji regionu T-DMR jest regulowany przez antysensowy transkrypt o długości 1290 nt (Khps1), który pokrywa się z regionem T-DMR, a także z dwoma eksonami *Sphk1*. Wyspa CpG genu *Sphk1* jest zatem matrycą do syntezy sensowego i antysensowego transkryptu, można więc sądzić, że zawiera ona kilka promotorów, z których transkrypcja zachodzi w obu kierunkach. Stwierdzono, że pojawienie się Khps1 indukuje demetylację miejsc CG oraz metylację cytozyn, tzw. non-CG, zlokalizowanych w pobliżu T-DMR. [16].

Innym przykładem epigenetycznej regulacji ekspresji genów jest inaktywacja chromosomu X. Wiadomo, że samice ssaków mają dwa chromosomy X, podczas gdy samce tylko jeden. W rezultacie u samic mogłoby dochodzić do podwojenia akumulacji produktów kodowanych przez geny umiejscowione na chromosomie X. Problem ten rozwiązany został poprzez wyciszenie transkrypcyjne jednego z chromosomów X w komórkach samic [17]. Kluczową rolę w tym procesie odgrywa rejon DNA zwany *XIC* (ang. *X-inactivation center*), z którego ekspresji ulega długi, podlegający splicingowi i poliadenylowany Xist RNA (ang. *X inactive-specific transcript*). Xist RNA znacząco wycisza miejsce wyciszenia poprzez hybrydyzację do DNA, dzięki czemu dochodzi do przyłączania białek odpowiedzialnych za modyfikacje i remodelowanie chromatyny [18, 19]. Ekspresja Xist RNA z allelu matczyńskiego zależy od ekspresji innego niekodującego RNA – Tsix, który częściowo pokrywa się z Xist w orientacji antysensowej. Tsix najprawdopodobniej hamuje transkrypcję Xist, indukując modyfikację chromatyny [20].

Według podobnego mechanizmu zachodzi regulacja ekspresji genu receptora insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 2-*Igf2r* (ang. *insulin-like growth factor type-2 receptor*). U myszy ekspresja *Igf2r* i dwóch innych genów (*Slc22a2*, *Slc22a3*), zlokalizowanych na chromosomie 17, zależy od obecności elementu kontrolującego imprinting (ang. *imprinting control element*, ICE), zwanego Regionem 2, o długości 3,7 kpz. Jest on zlokalizowany w drugim intronie *Igf2r* i posiada metylowaną wyspę CpG, która służy jako promotor do transkrypcji antysensowego Air RNA (ang. *antisense Igf2r RNA*). Air RNA ma długość 108 kz i ulega ekspresji tylko z allelu ojcowskiego [21]. Obejmuje on około 30 kz genu *Igf2r*, jego promotor rozciąga się na 70 kpz powyżej genu. Air RNA jest wymagany nie tylko do represji *Igf2r*, ale także do wyciszenia *Slc22a2* i *Slc22a3*, zlokalizowanych 110 i 155 kpz poniżej genu *Igf2r*. Zaproponowano, że Air RNA funkcjonuje jako dwukierunkowy wyciszacz, ponieważ rejony promotorowe regulowanych genów zlokalizowane są po obu stronach startu transkrypcji Air RNA [22].

Regulatorowe RNA mogą także wpływać na lokalizację mRNA, szczególnie w komórkach charakteryzujących się wysokim poziomem specjalizacji [23]. BC1 i BC200 RNA (ang. *brain cytoplasmic 1/200 RNA*) są mózgowo-specyficznymi transkryptami syntetyzowanymi przez polimerazę III RNA. 152-nukleotydowy BC1 RNA po raz pierwszy zidentyfikowany został w komórkach nerwowych hipokampa, podczas początkowych etapów tworzenia synaps, a później także w rybonukleoproteinach (RNP) ekstrahowanych z mózgów gryzoni. Gen kodujący BC1 RNA powstał prawdopodobnie na skutek retropozycji genu tRNA^{Ala}. Gen BC200 RNA powstał niezależnie przez retropozycję monomerycznego elementu Alu w locus, którego ekspresja zachodziła w neuronach. Mimo różnego pochodzenia obie cząsteczki RNA wykazują podobieństwa strukturalne i funkcjonalne [24]. Zarówno BC1, jak i BC200 zapewniają dendrytyczną lokalizację wybranych mRNA. Najprawdopodobniej uczestniczą w tym procesie także białka, które razem

z RNA tworzą kompleksy rybonukleoproteinowe (BC1/BC200 RNP) [25]. Stwierdzono, że za dendrytyczną lokalizację odpowiedzialny jest krótki rejon zlokalizowany przy końcu 5' RNA, do którego wiążą się przejściowo białka pur α i pur β (regulatory relikacji i transkrypcji DNA) [26]. Kolejnym białkiem specyficznie wiążącym BC1 i BC200 jest translatyna. Pura i pur β uczestniczą najprawdopodobniej w procesie przyłączania BC1 RNP do mikrotubul, następnie oddysocjują od kompleksu, a ich rolę przejmuje translatyna [27]. Niedawno wykazano, że BC1 i BC200 RNA uczestniczą także w regulacji translacyjnej, wpływając na lokalną syntezę białka w dendrytach [28].

Istnieją również ncRNA regulujące translację wybranych mRNA. Częstocząstką taką jest zidentyfikowany u *E. coli*, 87-nukleotyduowy DsrA RNA, zaangażowany w obronę komórek przed szokiem wywołanym niskimi temperaturami (ang. *cold shock response*). O ile szok powodowany wysokimi temperaturami prowadzi do zwiększonej produkcji białek (szaperony i proteazy), o tyle w przypadku obniżenia temperatury uaktywnione zostają specyficzne RNA i białka wiążące RNA. DsrA RNA wiąże dwa rodzaje mRNA. Pierwszy koduje czynnik sigma polimerazy RNA (σ^{38}) – RpoS (ang. *RNA polymerase sigma factor*), odpowiedzialny za globalną aktywację transkrypcji, drugi koduje H-NS (ang. *histonelike nucleoid structuring protein*) – antagonistę RpoS [29]. Miejsce wiązania w RpoS jest zlokalizowane w 5'UTR (ang. *untranslated region*), około 70-80 nukleotydów powyżej kodonu start, w rejonie stabilnej spinki zbudowanej m.in. z sekwencji RBS (ang. *ribosome binding site*). DsrA RNA, wiążąc RpoS mRNA, odblokuje RBS, przez co indukuje translację RpoS. Natomiast wiązanie H-NS mRNA w rejonie 3' i 5'UTR powoduje hamowanie translacji. W efekcie dochodzi do zwiększenia i zmniejszenia poziomu odpowiednio RpoS i H-NS w komórkach [29, 30]. Na aktywność DsrA wpływa także białko opiekuńcze wiążące RNA – Hfq. Jest ono niezbędne dla regulacji ekspresji H-NS i RpoS zależnej od DsrA [31].

micF jest genem odpowiedzi na czynniki stresowe u *E. coli* i innych bakterii. Również i on koduje RNA biorące udział w regulacji translacji. 93-nukleotyduowy *micF* RNA wiąże produkt transkrypcji genu *ompF* (ang. *outer membrane porin protein F*). Obniżenie akumulacji białka *ompF* jest głównym mechanizmem odpowiedzi komórek na toksyczne warunki środowiska, gdy zmniejszenie przepuszczalności błony komórkowej umożliwia przetrwanie. Sekwencja *micF* RNA jest częściowo komplementarna do *ompF* mRNA. Regulacja ekspresji kodującego go genu odbywa się przez inhibicję translacji i indukcję degradacji docelowego mRNA. Stwierdzono, że ekspresja genu *micF* jest kontrolowana zarówno przez stres środowiskowy, jak i wewnątrzkomórkowy. Znane są ponadto cztery regulatory wiążące specyficznie rejon promotorowy *micF* i aktywujące jego ekspresję [32].

Niekodujące RNA mogą także pośrednio wpływać na ekspresję genów jako modulatory aktywności czynników transkrypcyjnych. SRA RNA (ang. *steroid receptor activator RNA*) jest jednym z pierwszych odkrytych ncRNA wpływających na aktywność

czynników transkrypcyjnych. Został on zidentyfikowany jako poliadenylowany, ulegający splicingowi transkrypt, będący koaktywatorem hormonów steroidowych (progestyn, estrogenów, androgenów, glukokortykoidów) [33]. SRA RNA występuje w kilku wariantach powstałych na drodze alternatywnego splicingu, wszystkie posiadają wspólny konserwatywny trzon, otoczony przez zmienne sekwencje flankujące. Stwierdzono, że mutacje zaburzające strukturę drugorzędową trzonu redukują aktywność SRA RNA [34]. SRA RNA wykazuje powinowactwo do subrodziny białek wiążących RNA (p72/68), posiadających kasetę DEAD, która najprawdopodobniej pośredniczy w łączeniu SRA RNA z SRC-1 (ang. *steroid receptor coactivator 1*) [35]. SRA RNA wiąże ponadto indukowany hormonami transkrypcyjny represor SHARP (ang. *SMRT/HDAC1 associated represor proteins*). Jest to białko odpowiedzialne za dobór odpowiednich deacetylaz histonowych. Współzawodnictwo między aktywatorem a represorem może stanowić podstawę regulacji ekspresji genów kodujących hormony [36]. Częsteczką SRA RNA to również przykład na to, że z jednego genu mogą powstawać dwa różne końcowe produkty, jednym jest mRNA, z którego powstają funkcjonalne białka, drugim jest ncRNA.

Kolejnym przykładem niekodującego RNA, pośrednio wpływającego na proces transkrypcji, jest 6S RNA zidentyfikowany u *E.coli*. Wiąże on holoenzym polimerazy RNA σ^{70} i w ten sposób reguluje ekspresję genów podczas przejścia komórek z fazy wzrostu eksponencjalnego do stacjonarnego. Stwierdzono, że 6S RNA akumuluje się w miarę osiągnięcia przez komórki fazy stacjonarnej wzrostu i pośredniczy w specyficznych zmianach związanych z przejściem z jednej fazy do drugiej. Hamuje ekspresję genów z promotorów zależnych od σ^{70} [37]. Najważniejsze dla aktywności tej cząsteczki RNA jest jednoniciowe centralne wybrzuszenie, które otoczone jest strukturami dwuniciowymi [38].

Nowy mechanizm regulacji ekspresji genów

Pierwsze sugestie dotyczące istnienia nieznanego mechanizmu regulacji ekspresji genów pojawiły się na początku lat 90. ubiegłego wieku wraz z rozpoczęciem masowych badań roślin transgenicznych. Często, aby polepszyć cechy użytkowe jakiejś rośliny, wprowadzano do jej genomu dodatkową kopię istniejącego już wcześniej genu (genu endogennego). Ku zaskoczeniu badaczy, zamiast wydajniejszej syntezy białka, zwykle obserwowano wyciszenie obu genów [39]. Wyjaśnienie tego zjawiska przyniosły przeprowadzone osiem lat później badania zmierzające do selektywnego wyłączenia genów w modelowym organizmie zwierzęcym *Caenorhabditis elegans*. Wykazano, iż wprowadzenie do komórek *C. elegans* krótkich (około 20-nukleotydowych) dwuniciowych cząsteczek RNA, homologicznych do wybranego genu, prowadzi do jego całkowitego wyciszenia [40]. Stwierdzono, iż gen jest transkrybowany, jednak powstający mRNA ulega degradacji w cytoplazmie. Podobne zjawiska zaobserwowano u *Neurospora*, a także u *Dro-*

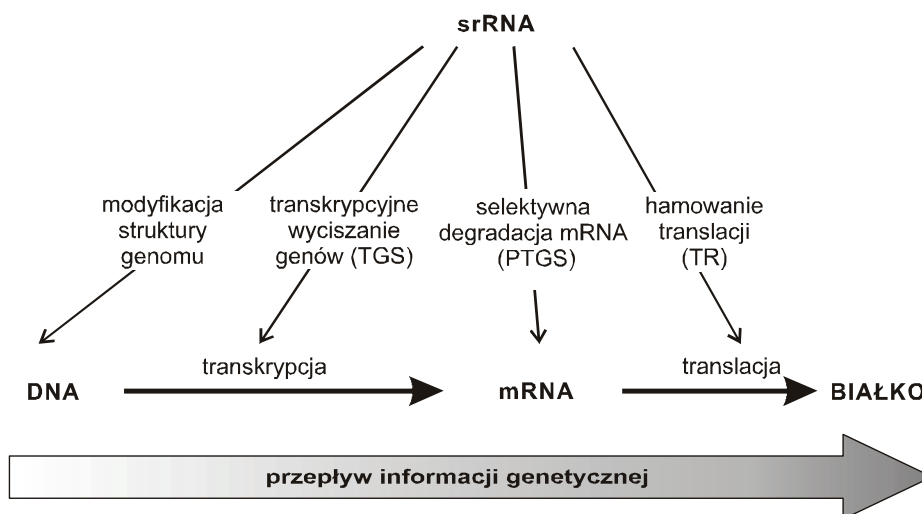
sophila [41, 42]. Równolegle wykazano, że w zainfekowanych wirusami roślinach dochodzi do specyficznej degradacji wytwarzanych przez patogena RNA [43-45]. Początkowo sądzono, iż odkryty został unikalny mechanizm potranskrypcyjnego wyciszania genów, polegający na selektywnym trawieniu mRNA. Kolejne badania pokazały jednak, iż zaobserwowane zjawisko, zwane interferencją RNA (RNAi), stanowi niewielką część niezwykle skomplikowanego mechanizmu regulacji ekspresji genów, w którym kluczową rolę odgrywają niewielkie cząsteczki RNA (srRNA; ang. *small regulatory RNA*).

Ogólny schemat biogenezy krótkich regulatorowych srRNA jest podobny dla większości tego typu cząsteczek. Dwuniciowe RNA są cięte, w wyniku czego powstają około 21-28-nukleotydowe dupleksy [46, 47]. Posiadają one dwa niesparowane nukleotydy na końcu 3'. Cięcie przeprowadzane jest przez posiadające kilka aktywności enzymatycznych białko, nazwane Dicer. W kolejnym etapie krótki dupleks RNA jest przenoszony od kompleksu białkowego RISC (ang. *RNA induced silencing complex*). Jedna z nici dupleksu jest następnie usuwana [47, 48], a druga funkcjonuje jako sonda umożliwiająca rozpoznawanie docelowej cząsteczki mRNA [49, 50]. Po sparowaniu z nią może dochodzić do cięcia wiązania fosfodiesterowego w mRNA, położonego między 10. i 11. nukleotydem dupleksu srRNA/mRNA [51]. Trawienie mRNA ma miejsce tylko wtedy, gdy większa część sekwencji srRNA paruje z sekwencją mRNA, tworząc przynajmniej jeden skręt helisy A [52, 55]. Fragment 3' powstały po cięciu mRNA jest hydrolizowany w cytoplazmie przez endonukleazę Xrn1, a fragment 5' jest degradowany przez egzozom za pomocą egzozukleaz 3'→5' [56]. U roślin i zwierząt do powstałego w wyniku cięcia fragmentu 5' mRNA może zostać dobudowywany krótki ogon poliurydynowy (poli(U)) na końcu 3'. Jest to związane z procesem usuwania struktury czapeczki i hydrolizy za pomocą egzozukleaz w kierunku 5'→3'. Wydaje się zatem, iż mogą istnieć co najmniej dwie alternatywne drogi degradacji w egzosomie [57].

Podczas niepełnego parowania krótkich RNA z cząsteczkami docelowymi nie dochodzi do hydrolizy mRNA, ale do hamowania translacji [58, 59]. Jednakże wiązanie pojedynczej cząsteczki srRNA nie jest wystarczające do efektywnej inhibicji, w związku z tym najczęściej kilka krótkich RNA wiąże jedną cząsteczkę mRNA [60]. Wykazano, że krótkie RNA, w kompleksie z białkiem Ago2, mogą uczestniczyć w przenoszeniu mRNA z cytozolu do miejsc degradacji, zwanych ciałkami P (*processing body*) [61, 62]. W ciałkach P najprawdopodobniej dochodzi do usuwania struktury czapeczki z końca 5' i hydrolizy mRNA. Dodatkowo ciałka P zapewniają izolację matrycowego mRNA od rybosomów i w ten sposób uniemożliwiają translację. Postuluje się istnienie dwóch dróg degradacji mRNA w ciałkach P. Pierwszej, polegającej na powolnej hydrolizie mRNA, w związku z czym może on być zawracany do cytoplazmy i uczestniczyć w translacji. Drugiej – szybkiej, podczas której enzym Dcp1/2 usuwa czapeczkę z mRNA, po czym następuje jego trawienie przez egzozukleazę Xrn1.

Małe regulatorowe RNA

Przeprowadzone w ostatnich latach badania pozwalają zdefiniować srRNA jako 19-28-nukleotydowe cząsteczki wycinane przez specyficzne rybonukleazy z dwuniciowych fragmentów większych prekursorowych RNA. srRNA włączane są do kompleksów białkowych, w których służą jako sondy umożliwiające specyficzne i selektywne rozpoznanie odpowiedniej cząsteczki DNA lub RNA. W zależności od budowy, składu i lokalizacji utworzonego kompleksu rybonukleinoproteinowego może on: (i) wpływać na strukturę genomu i w ten sposób decydować, które jego fragmenty ulegają transkrypcji; (ii) powodować selektywną degradację mRNA; (iii) selektywnie hamować translację wybranych cząsteczek mRNA. Z dotychczasowych obserwacji wynika, że srRNA odgrywają szczególnie istotną rolę w przechodzeniu komórek z jednego stanu funkcjonalnego w inny, a więc w procesach związanych z rozwojem organizmu i różnicowaniem się komórek, funkcjonowaniem komórek macierzystych, apoptozą czy transformacją nowotworową. W świetle dostępnych obecnie informacji srRNA jawią się zatem, jako cząsteczki o wielkim potencjale, zdolne regulować proces ekspresji informacji genetycznej praktycznie na wszystkich jego poziomach (ryc. 2).



Ryc. 2. Udział RNA w regulacji ekspresji informacji genetycznej

Odkrycie srRNA przyczyniło się także do diametralnej zmiany naszych poglądów na temat licznych procesów chorobowych. Obecnie wiemy, iż wiele z nich jest konsekwencją m.in. zaburzeń w ekspresji i działaniu srRNA. Wykazano istotny udział srRNA w etiologii chorób nowotworowych i neurologicznych. Dodatkowo istnieje wiele obserwacji wskazujących, iż srRNA uczestniczą nie tylko w regulacji ekspresji genów, lecz również w obronie komórki przed infekcją wirusową, szczególnie w przypadku wirusów

RNA. Replikacja ich genomu wymaga bowiem tworzenia długich cząsteczek dwuniciowych (dsRNA) powstających zarówno podczas syntezy nici (-), jak i w trakcie replikacji nici (+). Dwuniciowe produkty przejściowe, powstające podczas kopiowania wirusowych cząsteczek RNA, są doskonałym substratem dla rybonukleazy Dicer. Wytworzone przez nią siRNA włączane są do kompleksu RISC, w którym służą jako sonda umożliwiająca specyficzne rozpoznawanie i selektywną degradację wirusowych RNA. Dodatkowo wykazano, iż substratem dla Dicer mogą być również dwuniciowe struktury typu spinki do włosów, występujące w obrębie wirusowych RNA, lub częściowo komplementarne transkrypty powstające w oparciu o genomowe cząsteczki zarówno wirusów RNA, jak i DNA. W rezultacie okazało się, iż srRNA mogą służyć do obrony organizmu nie tylko przed wirusami RNA, ale i przed retrowirusami oraz wirusami DNA.

Analizy krótkich regulatorowych RNA doprowadziły do podzielenia ich na kilka klas, w zależności od pochodzenia lub sposobu działania. Znaczna część srRNA jest kodowana w genomie, ich źródłem może być też obcy materiał genetyczny, np.: wirusowy. Krótsze cząsteczki (20-23 nt) uczestniczą w degradacji mRNA i hamowaniu translacji, podczas gdy dłuższe (24-28 nt) wpływają na modyfikacje struktury DNA. Obecnie wyróżnia się następujące klasy krótkich srRNA: siRNA (ang. *small interfering RNA*), tasiRNA (ang. *trans-acting small interfering RNA*), rasiRNA (ang. *repeat-associated small interfering RNA*), tncRNA (ang. *tiny noncoding RNA*), mikroRNA (ang. *microRNA*, *miRNA*). W ostatnim czasie zidentyfikowano również piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*).

Małe interferujące RNA (siRNA) mają długość około 22 nukleotydów, tworzone są z długich dwuniciowych cząsteczek prekursorowych o różnym pochodzeniu. siRNA mogą powstawać pod wpływem wprowadzenia do organizmu dsRNA lub na skutek ekspresji transgenów. Wydaje się, że istnieje stosunkowo niewiele endogennych źródeł siRNA.

U roślin funkcją siRNA jest ochrona organizmu przed infekcjami wirusowymi i ekspresją transgenów, uczestniczą one także w organizowaniu struktury chromosomów i wyciszaniu ekspresji genów na drodze metylacji DNA [63, 64]. Pokazano, iż w obronie przed wirusami uczestniczy także kodowana przez rośliny polimeraza RNA zależna od RNA. Syntetyzuje ona dsRNA, wykorzystując wirusowy RNA jako matrycę. Powstały produkt jest następnie trawiony przez Dicer [65]. W rezultacie powstaje duża liczba siRNA skierowanych przeciwko wirusowym RNA [66].

siRNA biorą także udział w modyfikacji chromatyny. Na przykład gen *FWA* u *A. thaliana* posiada dwa powtórzenia tandemowe, które są niezbędne w metylacji DNA *de novo*. Endogenny *FWA* może przyjmować dwa stany – metylowany, czyli wyciszony, bądź niemetylowany, czyli aktywny. Stwierdzono, że w regulacji ekspresji genu *FWA* uczestniczą siRNA poprzez mechanizm zależnej od RNA metylacji reszt cytozynowych [67]. Wykazano także, że u drożdży *S. pombe* kompleks RITS (ang. *RNA induced transcriptional silencing*), w skład którego wchodzi między innymi białko Argonaute, rybonukleaza

Dicer i polimeraza RNA zależna od RNA oraz siRNA, jest niezbędny do tworzenia heterochromatyny. Metylacja reszty lizyny w pozycji 9 histonu H3 (H3-K9) powoduje wiązanie RITS do chromatyny, pozwalając maszynerii RNAi działać w układzie *cis* [68].

tasiRNA zidentyfikowano u roślin jako endogenne siRNA, kodowane przez geny jądrowe *TAS*. Sekwencje poszczególnych tasiRNA sąsiadują ze sobą w genomie, ale na siebie nie nachodzą. Znajdują się one między sekwencjami kodującymi białka i transkrybowane są najprawdopodobniej przy udziale polimerazy RNA III [69]. Stwierdzono, że w tworzenie tasiRNA zaangażowane są miRNA, a także RDR6, SGS3 (ang. *suppressor of gene silencing 3*) oraz DCL4 (ang. *Dicer-like protein 4*). Wykazano, że specyficzne miRNA rozpoznając *TAS* mRNA, doprowadzają do ich degradacji. Powstałe w ten sposób cząsteczki służą jako matryca dla roślinnej polimerazy RNA zależnej od RNA (RDR6). Po dobudowaniu drugiej nici, powstały dsRNA jest cięty przez rybonukleazę Dicer, tworząc tasiRNA. Uczestniczą one w degradacji innych mRNA niż te, z których powstały, stąd ich nazwa – siRNA działające w układzie *trans* [63].

Wykazano między innymi, że tasiRNA transkrybowane z genu *TAS3* są komplementarne do transkryptów ARF 1, 2, 3 (ang. *auxin response factor 1, 2, 3*) [69]. Stwierdzono także, że tasiRNA transkrybowane z genu *TAS2* uczestniczą w regulacji ekspresji genów kodujących białka z rodziny PPR (ang. *pentatricopeptide repeat protein*) [70].

rasiRNA powstają u roślin i niższych organizmów zwierzęcych najprawdopodobniej w wyniku degradacji długich komplementarnych transkryptów. Różnią się od pozostałych krótkich regulatorowych RNA długością wynoszącą 24-28 nukleotydów.

U *Drosophila* rasiRNA zapewniają stabilność genetyczną przez wyciszenie retrotranspozonów i sekwencji powtórzonych. Stwierdzono, że rasiRNA związane z białkami Piwi (ang. *P-element induced wimpy testis*) oraz Aub (ang. *aubergine*) – należącymi do rodziny białek Ago – powstają z nici antysensowej, natomiast te związane z Ago3 – z nici sensowej retrotranspozonów. Zaproponowano model, według którego za tworzenie końców 5' cząsteczek rasiRNA odpowiedzialne są rasiRNA utworzone z nici antysensowej, przy udziale białek Slicer oraz PIWI. W powstawanie rasiRNA u *Drosophila* najprawdopodobniej nie jest zaangażowana ani rybonukleaza Dicer-1 (tworzy miRNA), ani Dicer-2 (zaangażowana w produkcję siRNA) [71].

U *A. thaliana* rasiRNA powstają przy udziale polimerazy RDR6 i DCL3 (ang. *Dicer-like protein 3*). W kompleksie z białkiem Ago4 uczestniczą one w modyfikacji heterochromatyny na drodze zależnej od metylotransferazy KYP (ang. *kryptonite histone H3 lysine 9 (H3K9) methyltransferase*) metylacji histonów oraz zależnej od metylazy CMT3 (ang. *chromomethylase3*) i metylotransferazy DRM (ang. *domains-rearranged methyltransferase*) metylacji reszt cytydynowych w DNA [72].

tncRNA zostały zidentyfikowane u *C. elegans*. Badając cDNA krótkich niekodujących RNA, stwierdzono, że niektóre z nich przypominają miRNA, ponieważ wywodzą

się z rejonów niekodujących, jednak różnią się od nich strukturą drugorzędową, w związku z czym sklasyfikowano je jako odrębną grupę. Stwierdzono, że tncRNA zależą od aktywności rybonukleazy Dicer. Przypuszcza się, że przynajmniej część z nich powstaje z długich jednoniciowych bądź dwuniciowych RNA oraz że niektóre tncRNA mogą być syntetyzowane jako bardzo krótkie pierwotne transkrypty, mają ok. 20-22 nt długości. Kilka z nich może tworzyć struktury drugorzędowe przypominające spinki do włosów. Nie stwierdzono, by tncRNA były zachowawcze ewolucyjnie, co może podawać w wątpliwość ich istotność jako cząsteczek regulatorowych. Wykazują one jednak bardzo interesujące czasowe profile ekspresji, sugerując, że mogą uczestniczyć w ścieżkach rozwojowych. Wykazano, że tncRNA są antysensowe wobec sekwencji niektórych cDNA, co sugeruje, iż mogą to być cząsteczki siRNA-podobne. Do tej pory nie została jednak poznana funkcja tncRNA [73].

miRNA są najpowszechniej występującymi w komórkach roślinnych i zwierzęcych i zarazem najlepiej poznanymi krótkimi regulatorowymi RNA. Ich przeciętna długość to 22 nukleotydy (ale waha się między 19 a 25 nt). Geny miRNA są transkrybowane głównie przez polimerazę RNA II [60, 74]. Pierwotne transkrypty miRNA, zwane pri-miRNA, posiadają czapkę (ang. *cap*) na końcu 5' oraz ogon poli(A) (ang. *poly(A) tail*) na końcu 3'. W jądrze komórkowym podlegają wstępnej obróbce przy udziale kompleksu enzymatycznego zwanego Drosha/Pasha. W rezultacie powstają pre-miRNA, które przenoszone są do cytoplazmy przez eksportynę 5. W wyniku cięcia kolejnym enzymem – Dicer – powstają dojrzałe cząsteczki miRNA [75].

Rozmieszczenie genów miRNA w genomie nie jest przypadkowe. Ponad połowa zidentyfikowanych miRNA zakodowana jest w sekwencjach intronowych, ale kodowane są także w eksonach [13, 74, 76-79]. Stwierdzono, że zarówno lokalizacja niektórych intronowych miRNA, jak i poziom ich ekspresji jest ewolucyjnie zachowawczy. Na przykład mir-126 jest zlokalizowany w intronie genu *EGFL7* i ulega ekspresji na podobnym poziomie w komórkach śródbłonna serca i naczyń krwionośnych u myszy, człowieka i tropikalnej ryby *Danio rerio* [80]. Taka wysoka homologia sugeruje ważną i zachowawczą rolę miRNA. Wykazano również, że niektóre ssacze miRNA pochodzą z sekwencji powtórzonych, głównie transpozonów [81]. Część miRNA powstaje także z pseudogenów [82]. Niektóre z genów miRNA podlegają ekspresji konstytutywnej na stałym poziomie w trakcie całego cyklu rozwojowego organizmu, inne transkrybowane są tylko w ściśle określonych warunkach, w pewnym etapie rozwoju.

Wykazano, że miRNA pełnią bardzo istotne funkcje w procesach rozwojowych, podczas podziałów i różnicowania komórek [13, 83, 84]. Stwierdzono, że wszelkim zmianom zachodzącym w komórkach (zarówno fizjologicznym, jak i patologicznym) towarzyszą istotne zmiany w składzie krótkich regulatorowych RNA. Wzór ekspresji genów miRNA różni się znacznie w komórkach zdrowych i w poszczególnych typach komórek

nowotworowych [85-87]. Profile akumulacji miRNA okazały się bardzo informatywne w diagnostyce medycznej, stwierdzono bowiem, że nowotwory wywodzące się z tego samego typu tkanki mają podobne profile miRNA. W rezultacie, analizując profile ekspresji genów miRNA, można identyfikować różne rodzaje nowotworów.

piRNA są to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 26-31 nukleotydów. Do tej pory zidentyfikowano od 100 do 200 loci dla genów piRNA u myszy, szczura i człowieka. Mechanizm powstawania piRNA nie jest jeszcze poznany, do tej pory nie zidentyfikowano żadnych dwuniciowych prekursorów tych cząsteczek. Według jednego z modeli piRNA mogą powstawać z długich transkryptów trawionych na krótkie fragmenty. Długość piRNA sugeruje jednak, że w ich tworzenie nie jest zaangażowana rybonukleaza Dicer.

Po raz pierwszy piRNA zidentyfikowano w kompleksach z białkiem Miwi [88] i Riwi [89] (mysie i szczurze odpowiedniki ludzkiego Piwi). Rodzina białek Piwi uczestniczy w mejozie i podtrzymaniu linii zarodkowych komórek macierzystych, jednak ich rola nie jest jeszcze w pełni znana. Geny piRNA wykazują zróżnicowaną lokalizację w genomie, przeważnie połączone są w grupy o długości od 20 do 90 kpz. Zazwyczaj tylko jedna z nici DNA koduje piRNA, może się jednak zdarzyć, że są one także kodowane na drugiej, komplementarnej nici. Jak dotąd, funkcja piRNA nie została poznana. Jednakże prawdopodobna wydaje się być hipoteza, iż uczestniczą one w gametogenezie [88]. Sugeruje się, że produkcja piRNA jest wysoce konserwatywna, jednak sekwencyjnie nie są one zachowawcze. Wspiera to model, według którego piRNA wpływają na ekspresję tych samych loci, z których powstają [89].

Podsumowanie

Przedstawione powyżej fakty sprawiły, iż w ostatnim dziesięcioleciu nastąpił prawdziwy przełom w naszym myśleniu o roli, jaką kwasy rybonukleinowe odgrywają w organizmach żywych. Dzisiaj wiemy już, że są one nie tylko szkieletem spajającym białka czy adapterem umożliwiającym translację, lecz także enzymem bezpośrednio zaangażowanym w biosyntezę białka, kofaktorem umożliwiającym zajście wielu przemian biochemicznych, dezaktywującym enzymy inhibitorem, czynnikiem wpływającym na strukturę genomu, regulatorem transkrypcji i translacji. Obserwując wysiłki, jakie obecnie podejmują naukowcy na całym świecie, łatwo można dostrzec, że jednym z ich głównych celów jest jak najszybsze i jak najpełniejsze wykorzystanie praktyczne nowo odkrytych właściwości RNA. Szczególne nadzieje są związane z zastosowaniem małych regulatorowych RNA w genomice funkcjonalnej, biotechnologii oraz medycynie. Coraz powszechniej akceptowanym jest pogląd, że jednym z głównych czynników kształtujących rozwój nauk biologicznych i biomedycznych będą w najbliższych latach badania RNA, zarówno te charakterze podstawowym, jak i aplikacyjnym.

Piśmiennictwo

- [1] Mattick J.S., I.V. Makunin (2006) *Non-coding RNA*. Hum. Mol. Genet. 15 Spec No 1: R17-29.
- [2] Mattick J.S. (2001) *Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity*. EMBO Rep. 2(11): 986-91.
- [3] Venter J.C. et al. (2001) *The sequence of the human genome*. Science 291(5507): 1304-51.
- [4] Lander E.S. et al. (2001) *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature 409(6822): 860-921.
- [5] Ashe H.L. et al. *Intergenic transcription and transinduction of the human beta-globin locus*. Genes Dev, 1997. 11(19): 2494-509.
- [6] Wroe S.F. et al. (2000) *An imprinted transcript, antisense to Nesp, adds complexity to the cluster of imprinted genes at the mouse Gnas locus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(7): 3342-6.
- [7] Lau N.C. et al. (2001) *An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans*. Science 294(5543): 858-62.
- [8] Lagos-Quintana M. et al. (2002) *Identification of tissue-specific microRNAs from mouse*. Curr. Biol. 12(9): 735-9.
- [9] Kapranov P. et al. (2002) *Large-scale transcriptional activity in chromosomes 21 and 22*. Science 296(5569): 916-9.
- [10] Okazaki Y. et al. (2002) *Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs*. Nature 420(6915): 563-73.
- [11] Carninci P. et al. (2005) *The transcriptional landscape of the mammalian genome*. Science 309(5740): 1559-63.
- [12] Mattick J.S. (2003) *Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms*. Bioessays 25(10): 930-9.
- [13] Mattick, J.S., I.V. Makunin (2005) *Small regulatory RNAs in mammals*. Hum. Mol. Genet. 14 Spec No 1: R121-32.
- [14] Szymanski, M., J. Barciszewski (2006) *Regulatory RNAs in mammals*. Handb. Exp. Pharmacol. (173): 45-72.
- [15] Olivera A. et al. (1999) *Sphingosine kinase expression increases intracellular sphingosine-1-phosphate and promotes cell growth and survival*. J. Cell Biol. 147(3): 545-58.
- [16] Imamura T. et al. (2004) *Non-coding RNA directed DNA demethylation of Sphk1 CpG island*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 322(2): 593-600.
- [17] Heard E. (2004) *Recent advances in X-chromosome inactivation*. Curr. Opin. Cell Biol. 16(3): 247-55.
- [18] Chureau C. et al. (2002) *Comparative sequence analysis of the X-inactivation center region in mouse, human, and bovine*. Genome Res. 12(6): 894-908.
- [19] Plath K. et al. (2003) *Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation*. Science 300(5616): 131-5.
- [20] Shibata S., J.T. Lee, (2004) *Tsix transcription-versus RNA-based mechanisms in Xist repression and epigenetic choice*. Curr Biol. 14(19): 1747-54.
- [21] Sleutels F., R. Zwart, D.P. Barlow (2002) *The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes*. Nature 415(6873): 810-3.
- [22] Sleutels F. et al. (2003), *Imprinted silencing of Slc22a2 and Slc22a3 does not need transcriptional overlap between Igf2r and Air*. EMBO J. 22(14): 3696-704.
- [23] Kloc, M., G. Spohr, L.D. Etkin, (1993) *Translocation of repetitive RNA sequences with the germ plasm in Xenopus oocytes*. Science 262(5140): 1712-4.

- [24] Khanam, T. et al. (2007) *Two primate-specific small non-protein-coding RNAs in transgenic mice: neuronal expression, subcellular localization and binding partners*. Nucleic Acids Res. 35(2): 529-39.
- [25] Dahm, R., M. Kiebler, P. Macchi (2007) *RNA localisation in the nervous system*. Semin. Cell Dev. Biol. 18(2): 216-23.
- [26] Ohashi S. et al. (2000) *The single-stranded DNA- and RNA-binding proteins pur alpha and pur beta link BC1 RNA to microtubules through binding to the dendrite-targeting RNA motifs*. J. Neurochem. 75(5): 1781-90.
- [27] Muramatsu T., A. Ohmae, K. Anzai (1998) *BC1 RNA protein particles in mouse brain contain two y-h-element-binding proteins, translin and a 37 kDa protein*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 247(1): 7-11.
- [28] Cao X. et al. (2006) *Noncoding RNAs in the Mammalian Central Nervous System*. Ann. Rev. Neurosci. 28: 223-250.
- [29] Majdalani, N. et al. (1998) *DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95(21): 12462-7.
- [30] Rolle K. et al. (2006) *Evaluation of the dynamic structure of DsrA RNA from E. coli and its functional consequences*. J. Biochem. (Tokyo) 139(3): 431-8.
- [31] Sledjeski D.D., C. Whitman, A. Zhang (2001) *Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA*. J. Bacteriol. 183(6): 1997-2005.
- [32] Delihhas, N., S. Forst (2001) *MicF: an antisense RNA gene involved in response of Escherichia coli to global stress factors*. J. Mol. Biol. 313(1): 1-12.
- [33] Lanz, R.B. et al. (1999) *A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex*. Cell 97(1): 17-27.
- [34] Lanz R.B. et al. (2002) *Distinct RNA motifs are important for coactivation of steroid hormone receptors by steroid receptor RNA activator (SRA)*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(25): 16081-6.
- [35] Watanabe M. et al. (2001) *A subfamily of RNA-binding DEAD-box proteins acts as an estrogen receptor alpha coactivator through the N-terminal activation domain (AF-1) with an RNA coactivator, SRA*. EMBO J. 20(6): 1341-52.
- [36] Shi Y. et al. (2001) *Sharp, an inducible cofactor that integrates nuclear receptor repression and activation*. Genes Dev. 15(9): 1140-51.
- [37] Barrick J.E. et al. (2005) *6S RNA is a widespread regulator of eubacterial RNA polymerase that resembles an open promoter*. RNA 11(5): 774-84.
- [38] Trotochaud A.E., K.M. Wassarman (2005) *A highly conserved 6S RNA structure is required for regulation of transcription*. Nat. Struct. Mol. Biol. 12(4): 313-9.
- [39] Napoli C., C. Lemieux, R. Jorgensen (1990) *Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans*. Plant Cell 2(4): 279-289.
- [40] Fire A. et al. (1998) *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature 391(6669): 806-11.
- [41] Dernburg A.F. et al. (2000) *Transgene-mediated cosuppression in the C. elegans germ line*. Genes Dev. 14(13): 1578-83.
- [42] Pal-Bhadra M., U. Bhadra, J.A. Birchler (1997) *Cosuppression in Drosophila: gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is polycomb dependent*. Cell 90(3): 479-90.

- [43] Dougherty W.G. et al. (1994) *RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation*. Mol. Plant Microbe Interact. 7(5): 544-52.
- [44] Kumagai M.H. et al. (1995) *Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(5): 1679-83.
- [45] Angell S.M., D.C. Baulcombe 1997 *Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA*. EMBO J. 16(12): 3675-84.
- [46] Hamilton A.J., D.C. Baulcombe (1999) *A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants*. Science 286(5441): 950-2.
- [47] Hammond S.M. et al. (2000) *An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in Drosophila cells*. Nature 404(6775): 293-6.
- [48] Nykanen A., B. Haley, P.D. Zamore (2001) *ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway*. Cell 107(3): 309-21.
- [49] Martinez J. et al. (2002) *Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi*. Cell 110(5): 563-74.
- [50] Schwarz D.S. et al. (2003) *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell 115(2): 199-208.
- [51] Elbashir S.M., W. Lendeckel, T. Tuschl (2001) *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev. 15(2): 188-200.
- [52] Haley B., P.D. Zamore (2004) *Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex*. Nat. Struct. Mol. Biol. 11(7): 599-606.
- [53] Martinez J., T. Tuschl (2004) *RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease*. Genes Dev. 18(9): 975-80.
- [54] Zamore P.D. et al. (2000) *RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals*. Cell 101(1): 25-33.
- [55] Rivas F.V. et al. (2005) *Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC*. Nat. Struct. Mol. Biol. 12(4): 340-9.
- [56] Orban T.I., E. Izaurralde (2005) *Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome*. RNA 11(4): 459-69.
- [57] Shen B., H.M. Goodman (2004) *Uridine addition after microRNA-directed cleavage*. Science 306(5698): 997.
- [58] Olsen P.H., V. Ambros (1999) *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev. Biol. 216(2): 671-80.
- [59] Doench et al. (2003) *siRNAs can function as miRNAs*. Genes Dev. 17(4): 438-42.
- [60] Bartel D.P. (2004) *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell 116(2): 281-97.
- [61] Liu J. et al., *MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies*. Nat Cell Biol, 2005. 7(7): 719-23.
- [62] Sen G.L., H.M. Blau (2005) *Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies*. Nat. Cell Biol. 7(6): 633-6.
- [63] Aravin A., T. Tuschl (2005) *Identification and characterization of small RNAs involved in RNA silencing*. FEBS Lett. 579(26): 5830-40.
- [64] Nakahara K., R.W. Carthew (2004) *Expanding roles for miRNAs and siRNAs in cell regulation*. Curr. Opin. Cell Biol. 16(2): 127-33.

- [65] Nishikura K. (2001) *A short primer on RNAi: RNA-directed RNA polymerase acts as a key catalyst*. Cell 107(4): 415-8.
- [66] McManus M.T. (2004) *Small RNAs and immunity*. Immunity 21(6): 747-56.
- [67] Chan S.W. et al. (2006) *Two-step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats*. PLoS Biol. 4(11): e363.
- [68] Sugiyama T. et al. (2005) *RNA-dependent RNA polymerase is an essential component of a self-enforcing loop coupling heterochromatin assembly to siRNA production*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102(1): 152-7.
- [69] Allen E. et al. (2005) *microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants*. Cell 121(2): 207-21.
- [70] Yoshikawa M. et al. (2005) *A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in Arabidopsis*. Genes Dev. 19(18): 2164-75.
- [71] Vagin V.V. et al. (2006) *A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline*. Science 313(5785): 320-4.
- [72] Zilberman D., X. Cao, S.E. Jacobsen (2003) *ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation*. Science 299(5607): 716-9.
- [73] Ambros V. et al. (2003) *MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in C. elegans*. Curr. Biol. 13(10): 807-18.
- [74] Lee Y. et al. (2004) *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J. 23(20): 4051-60.
- [75] Murchison E.P., G.J. Hannon (2004) *miRNAs on the move: miRNA biogenesis and the RNAi machinery*. Curr. Opin. Cell Biol. 16(3): 223-9.
- [76] Rodriguez A. et al. (2004) *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome Res. 14(10A): 1902-10.
- [77] Cai X., C.H. Hagedorn, B.R. Cullen (2004) *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA 10(12): 1957-66.
- [78] Baskerville S., D.P. Bartel (2005) *Microarray profiling of microRNAs reveals frequent co-expression with neighboring miRNAs and host genes*. RNA 11(3): 241-7.
- [79] Ying S.Y., S.L. Lin (2005) *Intronic microRNAs*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 326(3): 515-20.
- [80] Wienholds E. et al. (2005) *MicroRNA expression in zebrafish embryonic development*. Science 309(5732): 310-1.
- [81] Smalheiser N.R., V.I. Torvik (2005) *Mammalian microRNAs derived from genomic repeats*. Trends Genet. 21(6): 322-6.
- [82] Devor E.J. (2006) *Primate microRNAs miR-220 and miR-492 lie within processed pseudogenes*. J. Hered. 97(2): 186-90.
- [83] Croce C.M. G.A. Calin (2005) *miRNAs, cancer, and stem cell division*. Cell 122(1): 6-7.
- [84] Giraldez A.J. et al. (2005) *MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish*. Science 308(5723): 833-8.
- [85] Meltzer P.S. (2005) *Cancer genomics: small RNAs with big impacts*. Nature 435(7043): 745-6.
- [86] O'Donnell K.A. et al. (2005) *c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression*. Nature 435(7043): 839-43.
- [87] He L. et al. (2005) *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature 435(7043): 828-33.

- [88] Girard A. et al. (2006) *A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins*. Nature 442(7099): 199-202.
- [89] Lau N.C. et al. (2006) *Characterization of the piRNA complex from rat testes*. Science 313(5785): 363-7.

New face of the “RNA world”

For a very long time, RNA was considered just the medium by which information flows from DNA into the cell. The model proposed in the 1960s assumed that proteins are the main products and regulators of the gene expression process. In this context, the results of the Human Genome Project and the discoveries of RNA interference and small regulatory RNAs (srRNAs) came as a true surprise. The first ones demonstrated that less than 5% of the human genome encodes proteins. The second showed that RNA, especially 20-30 nt-long molecules should be placed among the most important factors controlling gene expression. srRNAs are capable of affecting the release and flow of genetic information in many different ways. They can induce changes in the genome structure, inhibit transcription, mediate mRNA degradation and repress translation. Interestingly, in different organisms, different pathways are used to regulate gene expression. It has recently been estimated that, in humans, the expression of 35-40% of genes is controlled by srRNA. As a result, RNA is currently believed to be a central molecule in many biological processes.

Key words: non-coding RNA, small regulatory RNA, gene expression, RNA world

