

Magdalena Józwicka, Andrzej Głąbiński

Received: 12.03.2012

Accepted: 29.03.2012

Published: 30.04.2012

Rola niekodującego RNA w patologii układu nerwowego

The role of non-coding RNA in nervous system pathology

Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej z Pododdziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi, WSS im. M. Kopernika
 Adres do korespondencji: Oddział Kliniczny Propedeutyki Neurologicznej z Pododdziałem Udarowym, Uniwersytet Medyczny w Łodzi,
 WSS im. M. Kopernika, ul. Pabianicka 62, 93-513 Łódź, tel.: 42 689 53 61, e-mail: aglabinski@gmail.com
 Praca finansowana ze środków własnych

Streszczenie

Oprócz białek oraz niskocząsteczkowych regulatorów znaczącą rolę kontrolną w funkcjonowaniu układu nerwowego odgrywają niekodujące RNA (*non-coding RNA*, ncRNA). Dotychczasowe badania wykazały, że są one istotnym elementem w procesie regulacji ekspresji informacji genetycznej w każdej komórce. Liczba znanych obecnie cząsteczek ncRNA stale rośnie, jednak rola większości wciąż jest słabo poznana. Stanowią one grupę cząsteczek pełniących zasadniczą funkcję zarówno w rozwoju układu nerwowego, jak i jego funkcjonowaniu w warunkach fizjologicznych i patologicznych. O olbrzymim potencjale regulacji opartej na RNA w ośrodkowym układzie nerwowym może świadczyć wielość procesów, w których wykazano ich zaangażowanie (są to między innymi mechanizmy plastyczności synaptycznej, uczenia się, pamięci i odpowiedzi na stres). Zaburzenia biosyntezy ncRNA prowadzą do rozwoju wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, neurorozwojowych i neuropsychiatrycznych. Bez zrozumienia roli ncRNA nie będzie możliwe pełne poznanie złożonych procesów wewnątrzkomórkowych w ośrodkowym układzie nerwowym. Od niedawna dużą popularnością wśród badaczy cieszą się mikroRNA (miRNA) – małe, endogenne, niekodujące cząsteczki RNA, które odgrywają istotną rolę w wielu procesach biologicznych, takich jak proliferacja, różnicowanie komórek, angiogeneza czy apoptoza. Około 70% poznanych dotychczas ludzkich miRNA występuje w mózgu. Sądzę się, że regulują one ekspresję około połowy ludzkich genów i praktycznie każdy szlak komórkowy znajduje się pod ich wpływem. Są zatem doskonałym celem poszukiwań nowych metod terapeutycznych dla schorzeń ośrodkowego układu nerwowego.

Słowa kluczowe: niekodujące RNA, mikroRNA, biogeneza mikroRNA, regulacja ekspresji genów, ośrodkowy układ nerwowy, rola ncRNA w chorobach neurologicznych

Summary

Besides proteins and low-molecular-weight regulators, non-coding RNA (ncRNA) plays an important regulatory role in nervous system function. Recent studies revealed that this is an important mechanism regulating expression of cellular genetic information. Number of ncRNA molecules discovered to date is increasing continuously, while the exact role of most of them is still poorly understood. ncRNA plays a crucial role in nervous system development and function, both in normal and in pathological conditions. Enormous potential of ncRNA-based control of central nervous system function is evidenced by multitude of processes where their contribution has been demonstrated. These include mechanisms of synaptic plasticity, learning, memory, and reaction to stress. Defective ncRNA biosynthesis results in development of several neurodegenerative, neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. As long as their role remains obscure, it will be impossible to elucidate complex intracellular processes going on in nervous system cells. Recently, interest

of scientific community focused on microRNA (miRNA). These small, endogenous, non-coding molecules participate in several biological processes, e.g. proliferation, angiogenesis, cell differentiation or apoptosis. Nearly 70% of human miRNA discovered to date are located in the brain. As estimated, they control expression of about 50% of genes, and affect almost all metabolic pathways. Therefore, they appear a perfect target of research when looking for novel therapies for central nervous system diseases.

Key words: non-coding RNA, microRNA, biogenesis of microRNA, regulation of gene expression, central nervous system, role of ncRNA in neurological diseases

WSTĘP

Cząsteczki mikroRNA (miRNA) funkcjonują jako składniki kompleksu rybonukleoproteinowego nazywanego miRISC (*microRNA-induced silencing complex*)⁽¹⁾ i są zaangażowane w wiele ważnych procesów biologicznych. Wśród nich na szczególną uwagę zasługują takie procesy, jak regulacja proliferacji, różnicowanie komórek, apoptoza, embriogeneza i organogeneza⁽¹⁾. Cząsteczki miRNA odgrywają szczególną rolę w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i występują we wszystkich komórkach – od bakterii po ssaki naczelne. Ponieważ rola tych cząsteczek nie jest dokładnie poznana, prowadzone są intensywne badania w tym zakresie. Wiadomo, że miRNA pełnią wiele istotnych funkcji.

Układ nerwowy jest systemem bardzo skomplikowanym. Jego cechami są między innymi sprawny system regulacji, niezwykłość pod względem budowy i współdziałania komórek, ich różnorodności, właściwości oraz odpowiedzi na różnego rodzaju sygnały środowiskowe, zmiany aktywności synaps czy sieci powiązań neuronalnych.

Zasadniczy dogmat biologii molekularnej wynikający z badań nad organizmami prokariotycznymi mówi, że RNA pełni funkcję informacyjnego produktu pośredniego między genem a kodowanym przez niego białkiem. Zakładano, że większość informacji genetycznej realizowana jest w formie białek – to one odpowiadały za regulację ekspresji genów. U eukariontów sekwencje niekodujące białek traktowane były jako nagromadzone w trakcie ewolucji pozostałości procesów kształtujących geny lub integracji elementów mobilnych⁽²⁾. Mimo że niewielki procent nukleotydów w DNA ssaków wchodzi w skład sekwencji kodujących białka, przynajmniej 60-70% genomu tej grupy zwierząt ulega transkrypcji z jednej lub obu nici^(3,4).

W komórce poza cząsteczkami RNA kodującymi białka występuje także znaczna liczba tzw. niekodujących RNA (*non-coding RNA*, ncRNA). Początkowo twierdzono, że nie stanowią one ciekawego celu badawczego, jednak obecnie uważa się inaczej. Wykazano mianowicie, że ekspresja wielu ncRNA jest specyficzna dla określonych regionów mózgu i przedziałów komórkowych⁽⁵⁾. Ich lokalizacja w nieznanych wcześniej domenach komórkowych wskazuje na ich ważną funkcję w biologii komórki⁽⁶⁾. Cząsteczki te odgrywają znaczącą rolę w rozwoju, funkcjonowaniu i zaburzeniach funkcji OUN. Wraz z białkowymi czynnikami transkrypcyjnymi określają specyficzny dla danej komórki profil ekspresji genów^(7,8).

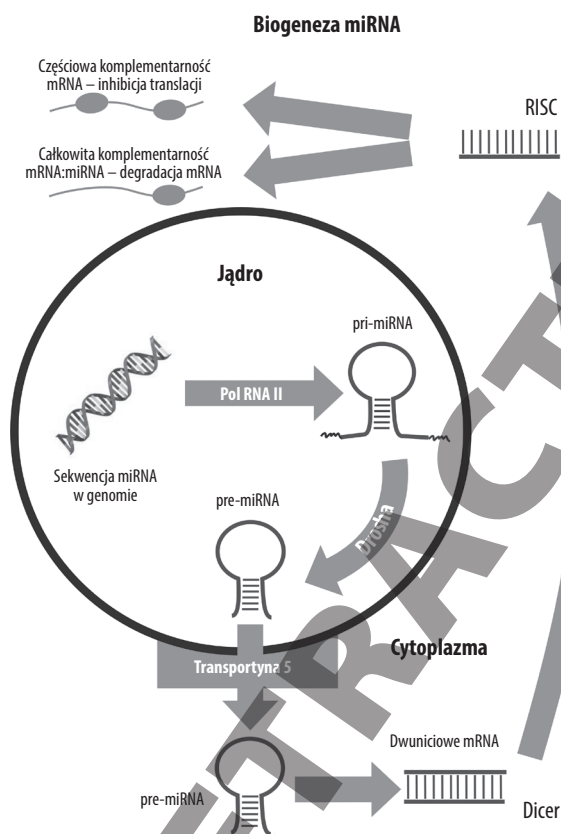
Co ważne, w mózgu człowieka zidentyfikowano wiele swoistych ncRNA. Synteza i zróżnicowany mechanizm ich działania są przyczyną wielu chorób, między innymi autyzmu, schizofrenii, choroby Alzheimera, zespołu Pradera-Williego, udaru niedokrwienego. Pogłębianie i wykorzystywanie posiadanej już bogatej wiedzy na temat struktury niekodujących RNA (ncRNA), ich genów i profilów ekspresji w mózgu zbliża nas do pełnego zrozumienia złożoności ludzkiego genomu, mechanizmów zarządzających realizacją zawartych w nim informacji, a co najważniejsze – molekularnych podstaw funkcjonowania OUN.

Najlepiej poznaną klasą niekodujących regulatorowych RNA są mikroRNA (miRNA). Wykazują one dużą zachowawczość ewolucyjną u organizmów znacznie oddalonych od siebie filogenetycznie^(8,9). U człowieka zidentyfikowano dotąd około 530 różnych miRNA, ale ich liczba może wynosić nawet ponad 1000^(10,11). Posiadają one zdolność kontroli ekspresji wielu genów poprzez regulację aktywności poszczególnych mRNA. Do niedawna uważano, iż regulacja ekspresji przez miRNA prowadzi wyłącznie do zahamowania syntezy białka. Ostatnio pojawiły się doniesienia wskazujące na nasilenie translacji niektórych mRNA przez miRNA, co pokazuje ich potencjał regulatorowy⁽¹²⁾. Dziś wiadomo, że w komórkach mamy do czynienia z bardzo zróżnicowanym profilem miRNA, co umożliwia dokładne dopasowanie poziomu ekspresji poszczególnych genów do aktualnych wymagań i potrzeb danej komórki.

BIOCHEMIA miRNA

MiRNA to grupa endogennych, jednoniciowych, niekodujących RNA. Mają długość od 19 do 25 nukleotydów. Odgrywają znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym⁽¹³⁾. Biogeneza miRNA jest procesem wieloetapowym, rozpoczynającym się w jądrze komórkowym, a kończącym w cytoplazmie. Ekspresja wielu tych cząstek jest specyficzna dla konkretnej tkanki lub stadium rozwoju^(14,15). Znaczna ich część jest zachowana ewolucyjnie. Ilość określonego miRNA może się różnić w zależności od typu komórki. Liczba kopii niektórych miRNA może przekraczać 10⁴ na komórkę, czyli znacznie więcej niż typowego mRNA⁽¹⁶⁾. Większość miRNA powstaje z pierwotnych transkryptów (pre-miRNA), przepisywanych z genomów przez polimerazę RNA II jako fragmenty intronów eliminowanych w procesie składania pre-miRNA. W wyniku hydrolizy pierwotnych

transkryptów enzymem Drosha wycinane są prekursorzy miRNA (pre-miRNA) o długości 60-80 nukleotydów. Endonukleaza typu RNA-zy III Drosha generuje dwuniciowy RNA z fosforanem przy końcu 5' i grupą OH przy końcu 3' oraz dwoma niesparowanymi nukleotydami przy końcu 3'^(17,18). Drosha wykazuje aktywność jedynie w obecności podjednostki regulatorowej DGCR8 (u człowieka) lub Pasha (u *D. melanogaster*)⁽¹⁷⁾. Prekursorzy miRNA są transportowane z jądra do cytoplazmy przez eksportynę 5 (Exp5), współdziałającą z białkiem RAN zależnym od GTP (RAN-GTP)⁽¹⁹⁾. W konsekwencji pre-miRNA jest transportowane z jądra komórkowego do cytoplazmy poprzez białko RAN-GTP i eksportynę 5⁽¹⁹⁾, gdzie są generowane dojrzałe i funkcjonalne cząsteczki miRNA w następstwie działania endonukleazy Dicer. Wynikiem jej działania jest dupleks miRNA składający się z 20-22 nukleotydów z 2-nukleotydowym 3' końcem. Dojrzałe cząsteczki miRNA po rozpleceniu przez enzym Dicer tworzą z białkami kompleks RISC (*RNA-induced silencing complex*)⁽²⁰⁻²²⁾, który poprzez specyficzne wiązanie do

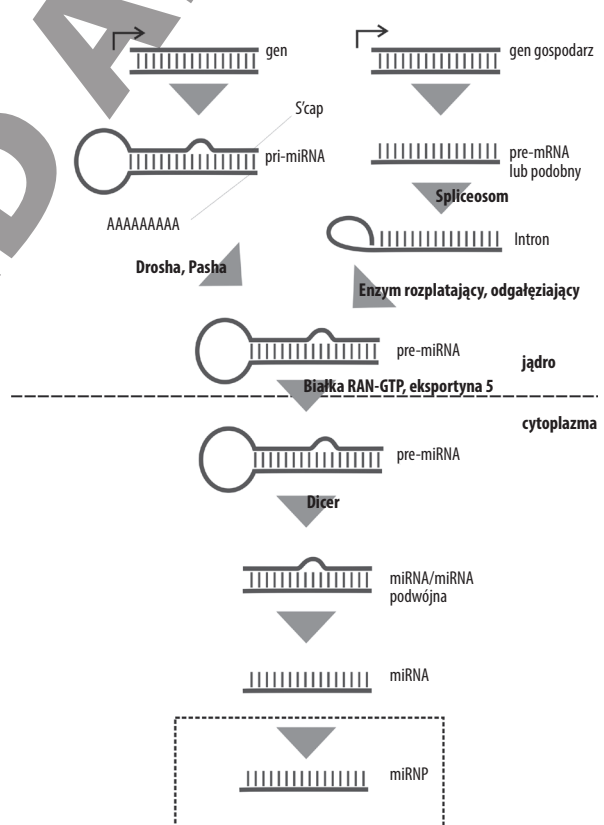


Rys. 1. Biogeneza miRNA u człowieka. Zdecydowana większość miRNA powstaje w wyniku dojrzwania pierwotnych transkryptów pri-miRNA syntetyzowanych przez polimerazę RNA II. Następnie w jądrze komórkowym za pomocą enzymu Drosha wycinane są prekursorzy miRNA (pre-miRNA). Białko RAN-GTP i transportyna 5 transportują je do cytoplazmy, a w niej endonukleaza Dicer generuje dojrzałe i funkcjonalne cząsteczki miRNA, które z białkami tworzą kompleks miRNP

komplementarnego regionu docelowej cząsteczki RNA wpływa na stabilność i translację mRNA. Efektem działania miRNA jest hamowanie syntezy białka poprzez oddziaływanie z częściowo komplementarnymi regionami w obrębie regionu przy końcu 3' (*untranslated region*, 3'UTR) niepodlegającego translacji⁽¹³⁾ (rys. 1 i 2).

Czas i lokalizacja komórkowa syntezy wielu poznanych dotychczas miRNA są ściśle i skrupulatnie kontrolowane. W odniesieniu do ssaków aż 70% wszystkich znanych miRNA jest obecna w mózgu. Spośród miRNA wykazujących specyficzność tkankową połowa jest charakterystyczna dla mózgu^(23,24). Podczas rozwoju mózgu poziom ekspresji niektórych miRNA ulega widocznym zmianom⁽²⁵⁾. Niewielkie rozmiary miRNA powodują, iż trudno je wykrywać metodą hybrydyzacji *in situ*. Ich ekspresja jest zwykle analizowana metodą hybrydyzacji Northern blotting i przy pomocy mikromacierzy.

Profil ekspresji miRNA badano między innymi w neuronach pierwotnych, które po przejściu szeregu zmian morfologicznych



Rys. 2. Szlak biogenezy miRNA w komórkach zwierzęcych (schemat szczegółowy). Gen miRNA ulega transkrypcji z udziałem polimerazy RNA II. Z powstałego pre-miRNA enzymem Drosha wycinane są pre-miRNA, które z udziałem białek RAN-GTP i eksportyny 5 przenoszone są z jądra do cytoplazmy. Enzym Dicer hydrolizuje pre-miRNA, a z powstałego dwuniciowego produktu pośredniego jedna nić zostaje włączona do funkcjonalnego kompleksu wyciszającego RISC

przekształcają się w dojrzałe, zróżnicowane neurony⁽²⁵⁾. Badania te prowadzono także na linii komórkowej P19, wyprowadzonej z komórek nowotworu embrionalnego myszy. W linii tej po indukcji kwasem retinowym badane komórki podlegają różnicowaniu do neuronów. W trakcie tego procesu ekspresji ulegają liczne miRNA, w tym również te specyficzne dla mózgu⁽²⁶⁾. Jednocześnie wykazano, że niektóre miRNA, wykrywane w mózgu (na przykład miR-29 i miR-128), nie pojawiają się w neuronach powstałych z linii P19. Prawdopodobnie występują w innych typach komórek znajdujących się w mózgu (na przykład glee) lub w podtypach neuronów, których nie uzyskuje się z linii komórkowej P19. Doświadczenia przeprowadzone na pierwotnych hodowlach neuronów i astrocytów dowiodły, że ekspresja niektórych miRNA jest specyficzna dla określonej linii komórkowej⁽²⁷⁾.

Dotychczas poznano funkcje nielicznych miRNA obecnych w układzie nerwowym. Są to między innymi występujące u *C. elegans* miR-273 i lsy-6, zaangażowane w różnicowanie neuronów smakowych w zależności od tego, czy znajdują się one po prawej [powstają wtedy neurony ASER (*ASE right*) reagujące na obecność chloru], czy po lewej stronie ciała [neurony ASEL (*ASE left*) wykrywające sól]⁽²⁸⁾. W mutantach ryby *Danio rerio* (danio przegowanego) pozbawionych rybonukleazy Dicer, a zatem i dojrzałych miRNA, obserwuje się zaburzoną morfogenezę, w tym również nieprawidłowości w rozwoju układu nerwowego⁽²⁹⁾. Nie dochodzi u nich do pełnego wykształcenia komór bocznych mózgu oraz granicy między śródmózgiem a tyłomózgiem. Upośledzeniu ulega także reakcja ucieczki w odpowiedzi na dotyk. Mimo nieprawidłowości w rozwoju efekty braku miRNA w przypadku myszy są bardzo poważne. Mianowicie brak rybonukleazy Dicer powoduje niedobór wielopotencjalnych komórek macierzystych i śmierć między siódmym a ósmym dniem rozwoju embrionalnego⁽³⁰⁾. Wiele z wyżej wymienionych defektów rozwojowych u danio nie pojawia się po podaniu pojedynczej rodziny miRNA – miR-430. Częściki docelowe tych miRNA to kilkadziesiąt mRNA deponowanych w komórce jajowej, gdyż w samym embrionie początkowo nie zachodzi transkrypcja. Jednym z pierwszych genów, których ekspresja następuje w zycie, jest właśnie miR-430. Umożliwia on rozpad matczynej mRNA, a tym samym przejście od matczynej do zygotycznego programu rozwoju⁽²⁹⁾. Wspólne ewolucyjne pochodzenie z miR-430 wykazuje rodzina genów ulegających specyficznej ekspresji w embrionalnych komórkach macierzystych ssaków, do której należą miR-302 i miR-372⁽³¹⁾. Powstają one z tych samych prekursorów co miR-430 oraz mają identyczne nukleotydy w pozycjach od 2. do 8., uważane za kluczowe w rozpoznawaniu cząsteczki docelowej⁽²⁹⁾.

miRNA W MÓZGU

Cząsteczką miRNA najliczniej występującą w mózgu dorosłych ssaków jest miR-124, stanowiąca 25-48% ogólnej puli miRNA w mózgu^(32,33). Analizy bioinformatyczne potencjalnych miejsc oddziaływania miR-124 z mRNA pokazują, że może on być zaangażowany w regulację translacji nawet

1100 białek. Uzyskany profil ekspresji genów wykazywał znaczne podobieństwo do obserwowanego w komórkach tkanki mózgowej. Fragment obejmujący nukleotydy 2-8 miR-124 jest komplementarny do regionów 3'UTR ponad 1100 genów ssaków, co czyni je potencjalnymi cząsteczkami docelowymi dla tego miRNA⁽³⁴⁾. Po transfekcji komórek HeLa genem miR-124 zaobserwowano spadek ekspresji 174 genów. Są to geny, których ekspresja jest niższa w mózgu niż w innych tkankach, zatem obecność specyficznego dla mózgu miRNA w komórkach HeLa zmieniła profil ekspresji ich genów na właściwy dla mózgu. Wykazano, iż transfekcja z użyciem miR-1 zmienia kierunek różnicowania na charakterystyczny dla mięśnia sercowego i mięśni szkieletowych, gdzie ekspresja miR-1 zachodzi w największym stopniu. Przejście w kierunku ekspresji właściwej dla mózgu lub serca i mięśni szkieletowych nie musi wynikać z bezpośredniego oddziaływania miRNA z wyciszonymi genami. Może być wtórnym efektem tłumienia aktywności kluczowych genów regulatorowych. Przy pomocy programu MEME przeprowadzono analizę nagromadzonych w ich regionach 3'UTR motywów sekwencyjnych. Siedemdziesiąt sześć procent genów, których poziom ekspresji uległ obniżeniu, zawierało w badanym regionie heksamer odpowiadający nukleotydowi 2-8 miR-124⁽³⁵⁾. Było to pierwsze eksperymentalne potwierdzenie, że pojedyncza cząsteczka miRNA może regulować ekspresję wielu mRNA. Potrzebne są dalsze badania *in vivo*, aby stwierdzić, czy miR-124 jest konieczny do utrzymania charakterystycznego profilu ekspresji w mózgu i czy może pobudzać neurony do różnicowania.

Zespół łamliwego chromosomu X (*fragile X syndrome*, FXS) jest jedną z częstszych i bardzo powszechnych chorób genetycznych sprzężonych z chromosomem X. Podobnie jak choroba Huntingtona i przynajmniej siedem innych zaburzeń neurodegeneracyjnych, należy do grupy schorzeń powodowanych przez ekspansję powtórzeń 3-nukleotydowych⁽³⁶⁻³⁸⁾. W przypadku FXS 3-nukleotydowe powtórzenia występują w sekwencji regulatorowej przy końcu 5' genu kodującego białko upośledzenia umysłowego łamliwego chromosomu X (*fragile X mental retardation protein*, FMRP), powodując jego hipermetylację i wyciszenie transkrypcyjne. Zespół łamliwego chromosomu X może być także spowodowany mutacjami punktowymi lub delecjami w sekwencji kodującej, co potwierdza, że przyczyną choroby jest utrata funkcji genu⁽³⁹⁾. Białko FMRP jest niezbędne do prawidłowego rozwoju synaps między neuronami biorącymi udział między innymi w procesach uczenia się i zapamiętywania. Badania genetyczne *Drosophila* wykazały, że FMRP do prawidłowego funkcjonowania wymaga białka AGO1 (ortologa Argonaute 2). Obniżenie poziomu białka AGO1 w komórce hamuje apoptozę neuronów wywołaną nadmierną ekspresją *DFMR1* (*Drosophila fragile X mental retardation 1 gene*, genu upośledzenia umysłowego łamliwego chromosomu X u *Drosophila*), natomiast osobniki heterozygotyczne pod względem AGO1 i *DFMR1* cechują się znacznie poważniejszym przerostem synaps niż mutanty pozbawione *DFMR1*⁽³⁸⁾. Analiza 397 mRNA mających zdolność wiązania białka FMRP wykazała, że aż 74% z nich stanowi potencjalne

cele dla miRNA, w porównaniu z 15% dla przypadkowo wybranego zestawu mRNA⁽³⁹⁾. Nie jest znana kolejność oddziaływań FMRP, mRNA oraz miRNA i RISC, jednak wspólne działanie FMRP i miRNA zwiększa prawdopodobnie specyficzność rozpoznania docelowego mRNA. Ustalenie dokładnego powiązania między FMRP i szlakiem miRNA dostarczyłby pełniejszych informacji na temat patogenezę zespołu łamliwego chromosomu X, jak również mechanizmu regulacji genów przez miRNA.

W trakcie różnicowania w prekursorach komórek neuronalnych następuje ekspresja miRNA odpowiedzialnych za kolejne stadia tego procesu (rys. 3).

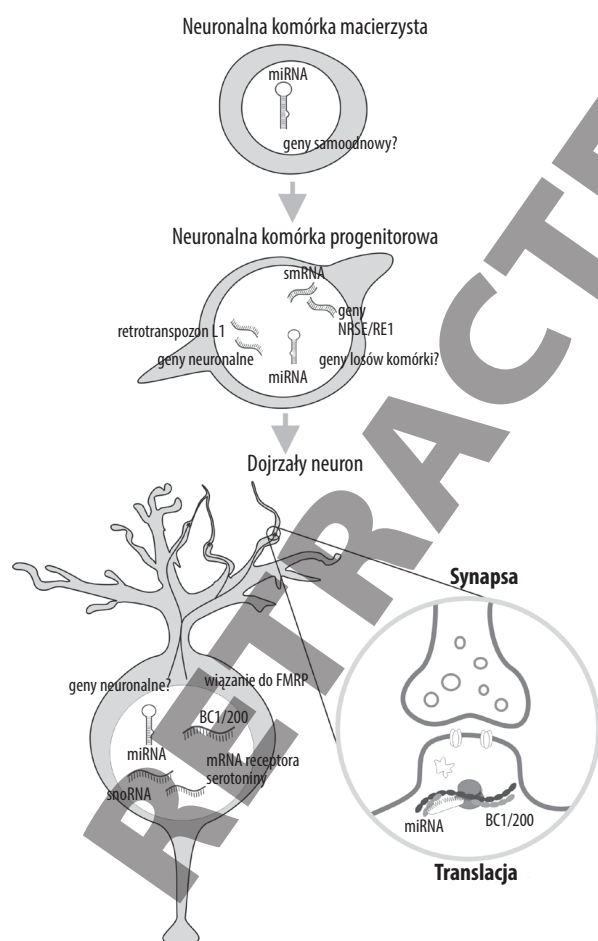
Jedną z funkcji, jakie miRNA mogą pełnić w komórkach nerwowych, jest regulacja syntezy białek w synapsach, która jest niezbędna dla ich plastyczności stanowiącej molekularną podstawę procesów uczenia i pamięci⁽⁴⁰⁾. Zmiany w aktywności synaps związane są z lokalnymi zmianami w biosyntezie białka. Przy współudziale białek wiążących RNA, miRNA mogą hamować translację określonych mRNA przed otrzymaniem sygnału przewodnictwa nerwowego. Aktywność synaptyczna mogłaby prowadzić do zniesienia inhibicji, a przez to do syntezy odpowiednich białek. Synteza specyficznych

białek synaptycznych, wymaganych na danym etapie aktywności neuronów, może być efektywniej kontrolowana na poziomie translacji. Zainicjowanie syntezy białka z istniejącego już (okresowo zablokowanego przez miRNA) mRNA wymaga znacznie mniej czasu niż uruchomienie całego procesu od poziomu transkrypcji.

NIEKODUJĄCE RNA W STANACH PATOLOGICZNYCH

W ostatnich kilku latach szczególnie intensywnie prowadzone są badania zależności rozwoju nowotworów od ekspresji miRNA. Założenie, że proces nowotworzenia może być związany ze zmianami w profilu ekspresji miRNA, znajduje swoje uzasadnienie w obserwacjach, które wskazują na ich udział w rozwoju i różnicowaniu komórek oraz utrzymywaniu swojego dla tkanek profilu ekspresji genów. Transformacja nowotworowa charakteryzuje się drastycznymi zmianami w realizacji programu genetycznego, małym zróżnicowaniem komórek, zwiększoną zdolnością do wzrostu i proliferacji oraz zaburzeniami systemów kontrolujących programowaną śmierć komórki (apoptozę). Należy podkreślić, że ogólny poziom miRNA w komórkach zdrowych tkanek jest znacznie wyższy niż w komórkach nowotworowych⁽⁴¹⁾. Na udział miRNA w procesach nowotworowych wskazują również wyniki analizy lokalizacji ich genów u człowieka i myszy. Związane są one często z regionami charakterystycznymi dla różnych form raka. Kolokalizacja genów miRNA z minimalnymi regionami utraty homozygotyczności i amplifikacji oraz z łamliwymi fragmentami chromosomów wskazywała, że miRNA mogą odgrywać rolę zarówno onkogenów (*oncogene*), jak i supresorów nowotworzenia (*tumour suppressor*)^(42,43). Określenie profilu ekspresji miRNA w nowotworach może stanowić wartościowe narzędzie w diagnostyce medycznej, co pokazano przy klasyfikacji 17 słabo zróżnicowanych guzów z wykorzystaniem standardowych metod w oparciu o profile ekspresji mRNA⁽⁴⁴⁾. Profilowanie ekspresji miRNA może być przydatne do oceny złośliwości nowotworu i pozwala jednocześnie uzyskać informację o rokowaniach pacjenta oraz prawdopodobnej odpowiedzi na istniejące leki⁽⁴⁴⁾. Określenie ogólnego poziomu miRNA czy ich profili ekspresji w nowotworach jest bardzo użyteczne z punktu widzenia diagnostyki medycznej. Niestety, nie wyjaśnia mechanizmów kancerogenezy. Prowadzone są intensywne i szczegółowe badania nad rolą indywidualnych miRNA w powstawaniu i rozwoju raka. W glejaku zarodkowym (*glioblastoma multiforme*, GBM) oraz w liniach komórkowych pochodzenia glejakaowego stwierdzono 5-100-krotnie podwyższoną ekspresję miR-21^(45,46). Wyciągnięto na tej podstawie wniosek, iż prawdopodobnie uczestniczy on w inhibicji apoptozy^(45,46). Wyłączenie ekspresji tego genu w liniach komórkowych za pomocą modyfikowanych oligonukleotydów powodowało aktywację kaskady kaspaz i odpowiedzi apoptotycznej, a to doprowadzało do śmierci komórek nowotworowych⁽⁴⁶⁾.

Wśród potencjalnych genów docelowych dla miR-21 są występujący w neuronach proteoglikan SPOCK1 oraz poten-



Rys. 3. Schemat udziału ncRNA w różnicowaniu komórek neuronalnych

cialny supresor nowotworów TRP1 (*tropomyosin 1*)⁽⁴⁷⁾. Ekspresja miRNA jest powiązana z proliferacją komórek. Jednym z genów w to zaangażowanych jest *let-7*, wykazujący cechy supresora nowotworzenia. Jego ekspresja jest znacznie obniżona w raku płuc⁽⁴⁸⁾. *Let-7* może hamować syntezę białka RAS oraz innych protoonkogenów związanych z regulacją cyklu komórkowego^(49,50). Uczestniczy również w regulacji ekspresji genu *HMGA2* (*high mobility group A2*), którego produkt białkowy bierze udział w modelowaniu chromatyny. Zaburzenia ekspresji *HMGA2* (*high mobility group A2*) obserwowano w wielu ludzkich nowotworach⁽⁵¹⁾. Obniżenie ekspresji *let-7* może prowadzić do niekontrolowanego wzrostu i rozwoju komórki. U pacjentów cierpiących na schizofrenię lub inne choroby neurologiczne wykazano ekspresję endogennych retrowirusów⁽⁵²⁾. Ich wysoka aktywność transkrypcyjna jest związana z dużym ryzykiem insercji do ważnych dla komórki genów oraz z zaburzeniem normalnego stanu komórki.

Neurodegeneracja wynikająca z procesu starzenia lub będąca wynikiem choroby Alzheimera ma związek z ilościowymi zmianami BC200 RNA. Wykazano, iż odpowiadają one za długoterminową plastyczność synaptyczną. W trakcie procesu starzenia u ludzi między 50. a 90. rokiem życia dochodzi do ponad 60% redukcji poziomu BC200 w korze mózgowej, natomiast u pacjentów cierpiących na chorobę Alzheimera obserwowany jest widoczny wzrost poziomu BC200 RNA przy jednoczesnej i zauważalnej utracie jego lokalizacji w dendrytach⁽⁵³⁾.

UDZIAŁ ncRNA W INNYCH CHOROBAH NEUROLOGICZNYCH

Dowodzono, iż zmiany ekspresji niekodujących RNA często i w dużym stopniu związane są między innymi ze stanami patologicznymi. Niekiedy wynikają one z pierwotnych defektów genetycznych, które w konsekwencji prowadzą do zaburzeń rozwojowych i neurobehawioralnych. Jest to szczególnie widoczne w przypadku nieprawidłowej ekspresji genów podlegających znakowaniu genomowemu (*genomic imprinting*). Ich zaburzona ekspresja występuje w takich chorobach, jak autyzm, schizofrenia, zespół zaburzeń zachowania ADHD (*attention deficit hyperactivity disorder*), zaburzenia dwubiegunowe (*bipolar disorders*) oraz zespół Tourette'a, zespół Pradera-Williego, zespół Angelmana, stwardnienie rozsiane i choroba Alzheimera^(53,54).

Istnieje pewna liczba chorób, w których powtórzenia występują w regionach niekodujących, takich jak introny lub obszary nieulegające translacji. Można tu wymienić: dystrofię miotoniczną typu 1. i 2. (*myotonic dystrophy type 1 and 2*, DM1 i DM2), ataksję rdzeniowo-mózdkową typu 8. (*spinocerebellar ataxia 8*, SCA8), SCA10, SCA12 oraz zespół drżenia i ataksji związany z zespołem łamliwego chromosomu X – FXTAS (*fragile X-associated tremor/ataxia syndrome*)⁽⁵⁵⁾. Wykazano, iż produktem genu odpowiedzialnego za SCA8 jest niekodujący RNA. Ataksja rdzeniowo-mózdkowa typu 8. charakteryzuje się występowaniem powtórzenia CTG przy końcu 3' RNA,

który obejmuje koniec 5' innego genu, mianowicie *KLHL1* (*Kelch-like 1*)⁽⁵⁶⁾. Gen *KLHL1* jest transkrybowany w przeciwnym kierunku i koduje białko wiążące aktywne. Przypuszcza się, że prawidłowa wersja SCA8 RNA reguluje ekspresję *KLHL1* przez oddziaływanie antysensowne. Nie znaleziono jednak dotąd związku funkcjonalnego między oboma transkryptami⁽⁵⁶⁾. Mimo że objawy DM1 i DM2 są do siebie podobne, to sekwencje powtórzone występują w tych chorobach w dwóch różnych genach. Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku SCA8, SCA10 i SCA12. Przypuszcza się, że choroby te nie są spowodowane utratą funkcji genów, lecz uzyskaniem funkcji przez patologicznie zmieniony RNA. Transferowe oraz rybosomalne RNA (tRNA, rRNA) kojarzone są z szerokim spektrum funkcji związanych z rozwojem neuronalnym oraz funkcjonowaniem OUN. Najnowsze badania pokazały, iż mutacje w genach kodujących te klasy cząsteczek wiążą się z wieloma chorobami neurorozwojowymi, neurodegeneracyjnymi oraz neuropsychiatrycznymi, takimi jak CPEO (*chronic progressive external ophthalmoplegia*), zespół Kearnsa-Sayre'a, zespół MELAS, zespół MERRF oraz choroba neuronu ruchowego. Zespół MELAS oraz inne choroby związane z wadliwymi mitochondrialnymi tRNA kojarzone są ze schorzeniami neuropsychiatrycznymi: schizofrenią, psychozą, majaczeniem, zaburzeniami osobowości, zespołem depresyjnym oraz zaburzeniami lękowymi^(57,58).

PODSUMOWANIE

Niekodujące RNA są istotnym elementem w systemie regulacji ekspresji informacji genetycznej w komórce. O ogromnym potencjale regulacyjnym miRNA może świadczyć duża liczba procesów, w które są one zaangażowane. Zaburzenia tych cząsteczek prowadzą do wielu schorzeń neurodegeneracyjnych, neurorozwojowych oraz neuropsychiatrycznych, co czyni z nich doskonały obiekt poszukiwań nowych metod terapeutycznych dla tych schorzeń. Zrozumienie funkcji biologicznych miRNA może doprowadzić również do ich wykorzystywania do celów diagnostycznych oraz jako potencjalnych biomarkerów tych chorób.

PIŚMIENNICTWO: BIBLIOGRAPHY:

1. Kim V.N.: MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol* 2004; 14: 156-159.
2. Lee Y.S., Dutta A.: MikroRNAs: small but potent oncogenes or tumor suppressors. *Curr. Opin. Invest. Drugs* 2006; 7: 560-564.
3. Doolittle W.F., Sapienza C.: Selfish genes, the phenotype paradigm and genome evolution. *Nature* 1980; 284: 601-603.
4. Frith M.C., Pheasant M., Mattick J.S.: The amazing complexity of the human transcriptome. *Eur. J. Hum. Genet.* 2005; 13: 894-397.
5. Billy E., Brondani V., Zhang H. i wsp.: Specific interference with gene expression induced by long, double-stranded RNA in mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2001; 98: 14428-14433.

6. Lecellier C.H., Dunoyer P., Arar I. i wsp.: A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science* 2005; 308: 557-560.
7. Cavaillé J., Buiting K., Kieffmann M. i wsp.: Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2000; 97: 14311-14316.
8. Sassen S., Miska E.A., Caldas C.: MicroRNA – implications for cancer. *Virchows Arch.* 2008; 452: 1-10.
9. Balakin A.G., Smith L., Fournier M.J.: The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions. *Cell* 1996; 86: 823-834.
10. Calin G.A., Sevignani C., Dumitru C.D. i wsp.: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101: 2999-3004.
11. John B., Enright A.J., Aravin A. i wsp.: Human microRNA targets. *PLoS Biol.* 2004; 2: e363.
12. Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A.: Switching from repression to activation: microRNAs can upregulate translation. *Science* 2007; 318: 1931-1934.
13. Bartel D.P.: MicroRNAs: genomic, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
14. Lau N.C., Lim L.P., Weinstein E.G., Bartel D.P.: An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-862.
15. Lee R.C., Ambros V.: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-864.
16. Lim L.P., Lau N.C., Garrett-Engle P. i wsp.: Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005; 433: 769-773.
17. Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V.: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-854.
18. Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H. i wsp.: Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-235.
19. Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D.: Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-191.
20. Schwarz D.S., Hutvagner G., Du T. i wsp.: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115: 199-208.
21. Tomari Y., Matranga C., Haley B. i wsp.: A protein sensor for siRNA asymmetry. *Science* 2004; 306: 1377-1380.
22. Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J.: Role for bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-366.
23. Barad O., Meiri E., Avniel A. i wsp.: MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res.* 2004; 14: 2486-2494.
24. Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Townsend M. i wsp.: Microarray analysis of microRNA expression in the developing mammalian brain. *Genome Biol.* 2004; 5: R68.
25. Sempere L.F., Freemantle S., Pitha-Rowe I. i wsp.: Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* 2004; 5: R13.
26. Johnston R.J. Jr, Chang S., Etchberger J.F. i wsp.: MicroRNAs acting in a double-negative feedback loop to control a neuronal cell fate decision. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2005; 102: 12449-12454.
27. King M.C., Wilson A.C.: Evolution at two levels in humans and chimpanzees. *Science* 1975; 188: 107-116.
28. Johnston R.J., Hobert O.: A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2003; 426: 845-849.
29. Bernstein E., Kim S.Y., Carmell M.A. i wsp.: Dicer is essential for mouse development. *Nat. Genet.* 2003; 35: 215-217.
30. Houbaviy H.B., Dennis L., Jaenisch R., Sharp P.A.: Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene. *RNA* 2005; 11: 1245-1257.
31. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Meyer J. i wsp.: New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-179.
32. Lagos-Quintana M., Rauhut R., Yalcin A. i wsp.: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr. Biol.* 2002; 12: 735-739.
33. Sasaki Y.T., Sano M., Ideue T. i wsp.: Identification and characterization of human non-coding RNAs with tissue-specific expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 357: 991-996.
34. Lim L.P., Lau N.C., Weinstein E.G. i wsp.: The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.* 2003; 17: 991-1008.
35. Tissir F., Goffinet A.M.: Reelin and brain development. *Nature Rev. Neurosci.* 2003; 4: 496-505.
36. Jin P., Zarnescu D.C., Ceman S. i wsp.: Biochemical and genetic interaction between the fragile X mental retardation protein and the microRNA pathway. *Nat. Neurosci.* 2004; 7: 113-117.
37. Jin P., Warren S.T.: New insights into fragile X syndrome: from molecules to neurobehaviors. *Trends Biochem. Sci.* 2003; 28: 152-158.
38. Zalfa F., Giorgi M., Primerano B. i wsp.: The fragile X syndrome protein FMRP associates with BC1 RNA and regulates the translation of specific mRNAs at synapses. *Cell* 2003; 112: 317-327.
39. O'Donnell W., Warren S.T.: A decade of molecular studies of fragile X syndrome. *Annu. Rev. Neurosci.* 2002; 5: 315-338.
40. Presutti C., Rosati J., Vincenti S., Nasi S.: Non coding RNA and brain. *BMC Neuroscience* 2006; 7 (supl. 1):S5.
41. Lu J., Getz G., Miska E.A. i wsp.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-838.
42. Storz G.: An expanding universe of noncoding RNAs. *Science* 2002; 296: 1260-1263.
43. Sevignani C., Calin G.A., Nnadi S.C. i wsp.: MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104: 8017-8022.
44. Stahlhut Espinosa C.E., Slack F.J.: The role of microRNAs in cancer. *Yale J. Biol. Med.* 2006; 79: 131-140.
45. Ciafre S.A., Galardi S., Mangiola A. i wsp.: Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 334: 1351-1358.
46. Caudy A.A., Myers M., Hannon G.J., Hammond S.M.: Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev.* 2002; 16: 2491-2496.
47. Wells D.G.: RNA-binding proteins. *J. Neurosci.* 2006; 26: 7135-7138.
48. Chan J.A., Krichevsky A.M., Kosik K.S.: MicroRNA-21 an apoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 6029-6033.
49. Takamizawa J., Konishi H., Yanagisawa K. i wsp.: Reduced expression of the *let-7* microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.* 2004; 64: 3753-3756.
50. Davies W., Isles A.R., Humby T., Wilkinson L.S.: What are imprinted genes doing in the brain? *Epigenetics* 2007; 2: 1-4.
51. Johnson C.D., Esquela-Kerscher A., Stefani G. i wsp.: The *let-7* MicroRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 2007; 67: 7713-7722.
52. Johnson S.M., Grosshans H., Shingara J. i wsp.: RAS is regulated by the *let-7* microRNA family. *Cell* 2005; 120: 635-647.
53. Mus E., Hof P.R., Tiedge H.: Dendritic BC200 RNA in aging and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 2007; 104: 10679-10684.

54. Lee Y.S., Dutta A.: The tumor suppressor microRNA *let-7* represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* 2007; 21: 1025-1030.
55. Mehler M.F., Mattick J.S.: Non-coding RNAs in the nervous system. *J. Physiol.* 2006; 575: 333-341.
56. Stajich J.E., Hahn M.W.: Disentangling the effects of demography and selection in human history. *Mol. Biol. Evol.* 2005; 22: 63-73.
57. Ranum L.P., Day J.W.: Pathogenic RNA repeats: an expanding role in genetic disease. *Trends Genet.* 2004; 20: 506-512.
58. Cao X., Yeo G., Muotri A.R. i wsp.: Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 2006; 29: 77-103.

Informacja dla Autorów!

Chcąc zapewnić naszemu czasopismu „AKTUALNOŚCI NEUROLOGICZNE” wyższą indeksację MNiSW i Index Copernicus, zwracamy się do Autorów o dopełnienie poniższych warunków podczas przygotowywania pracy do publikacji:

- Publikację należy opatrzyć afiliacją z podaną nazwą ośrodka i jego pełnym adresem oraz numerem telefonu.
 - Praca oryginalna powinna być poprzedzona **streszczeniem** zawierającym **od 200 do 250 słów**, a pogładowa i kazuistyczna – **od 150 do 200**. Streszczeniu pracy oryginalnej należy nadać budowę strukturalną: wstęp, materiał i metoda, wyniki, wnioski.
 - Liczba **słów kluczowych** nie może być mniejsza niż **5**. Słowa kluczowe nie powinny być powtórzeniem tytułu. Najlepiej stosować słowa kluczowe z katalogu MeSH.
 - **Praca oryginalna** winna zawierać elementy: wstęp, materiał i metoda, wyniki, omówienie, wnioski, piśmiennictwo.
 - **Piśmiennictwo** powinno być ułożone w **kolejności cytowania**.
- Pełny Regulamin ogłaszania prac znajduje się na stronie 6.