

PŘEHLED MALÝCH NEKÓDUJÍCÍCH RNA

**KLÁRA SPURNÁ, JITKA VIKTOROVÁ
a TOMÁŠ RUML**

*Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 3, 166 28 Praha 6
rumlt@vscht.cz*

Došlo 31.1.18, přepracováno 4.9.18, přijato 10.9.18.

Klíčová slova: miRNA, krátké interferující RNA, regulace transkripce

Obsah

1. Úvod
2. Rozdělení malých nekódujících RNA podle jejich funkcí
 - 2.1. RNA interference
 - 2.2. Regulace transkripce
 - 2.2.1. TSSaRNA
 - 2.2.2. nro-RNA
 - 2.3. Regulace posttranskripčních modifikací RNA
 - 2.3.1. snRNA
 - 2.3.2. snoRNA
 - 2.3.3. scaRNA
 - 2.3.4. 7SK RNA
 - 2.3.5. gRNA
 - 2.3.6. piRNA
 - 2.3.7. vault RNA
 - 2.3.8. SRP RNA
 - 2.3.9. tiRNA
 - 2.3.10. Y RNA
 - 2.4. Bakteriální nekódující RNA s duální funkcí
3. Závěr

1. Úvod

Výsledky vysokokapacitních sekvenačních metod ukázaly, že velká část lidského genomu je transkribována do RNA, které nekódují žádný protein. Tyto tzv. nekódující RNA (ncRNA) jsou děleny na dlouhé ncRNA (> 200 až 300 nt) a krátké (< 200 nt) ncRNA. Byly nalezeny v různých organismech od archaebakterií a bakterií, přes eukaryotní mikroorganismy až po vyšší rostliny a různé savce^{1,2}. Je zřejmé, že většina, ne-li všechny mají důležitou regulační roli. Jsou důležitými regulátory různých buněčných procesů, jako je remodelace chromatinu, transkripce,

posttranskripční úpravy a intracelulární transport. Tím se významně uplatňují v regulaci vývoje i v patogenezi různých onemocnění, zejména rakoviny a autoimunitních onemocnění³. Navíc se ncRNA mohou šířit do jiných buněk nebo jader, což rozšiřuje jejich pole působnosti i mimo jedinou buňku¹.

Obrovský rozvoj zkoumání těchto molekul byl iniciován objevem siRNA (z angl. small interfering RNA) a miRNA (z angl. microRNA), které regulují genovou expresi jako transkripční aktivátory nebo represory, kontrolují stabilitu RNA, či její specifickou degradaci a řídí posttranskripční modifikace RNA. Existují ještě další krátké RNA, jejichž přesný mechanismus působení dosud nebyl objasněn. Jako příklad můžeme uvést piRNA (z angl. Piwi-interacting RNA, 26–30 nt), tasiRNA (z angl. *trans*-acting siRNA), hc-siRNA (nebo hetsiRNA; z angl. heterochromatic siRNA), scnsRNA (z angl. small scan RNA) nebo qisRNA (QDE2 – z angl. quelling-defective interacting small RNA; pozn.: quelling je výraz pro umlčení genové exprese u plísní)¹. Dále v rostlinách phasiRNA (z angl. phased siRNAs) a easiRNA (z angl. epigenetically activated-siRNAs). Zajímavým rysem je, že na rozdíl od živočichů jsou všechny malé RNA v rostlinách modifikovány na 3' konci 2'-*O*-methylací. Detailnější přehled malých ncRNA přináší Kapitola 2.

Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) můžeme dle struktury rozdělit do několika podskupin jako cirkulární RNA (circRNA), přírodní antisense transkripty (NAT), transkribované ultrakonzervované regiony (T-UCR), dlouhé nekódující RNA (z angl. long enhancer ncRNA), dlouhé mezi-genové ncRNA (lincRNA) a pseudogeny. Dlouhé nekódující RNA mohou regulovat genovou expresi prostřednictvím interakce s jinými RNA, čímž dochází k ovlivnění stability mRNA. Také často interagují s DNA a proteiny za vytvoření komplexní struktury, která může významně regulovat genovou aktivitu¹. Pro informaci o lncRNA lze doporučit např. přehledový článek⁴.

2. Rozdělení malých nekódujících RNA podle jejich funkcí

2.1. RNA interference

Vzhledem k možnému terapeutickému a technologickému potenciálu jsou nejprostudovanější skupinou endogenní miRNA a siRNA. Tyto regulační RNA jsou většinou produkovány pouze v určitých stádiích buněčného vývoje a diferenciaci nebo jako odpověď na vnější podnět. Obě tyto typy RNA regulují posttranskripční umlčování genů, ačkoliv jejich biosyntéza a způsob regulace jsou odlišné⁵. Je obecně uznáváno, že se RNA interference vyvinula

nejprve jako obranný mechanismus proti RNA virům a cizorodé RNA a později byly tyto mechanismy modifikovány pro regulaci exprese endogenních genů.

2.1.1. siRNA

Dvojřetězcové molekuly siRNA o velikosti 20–25 nt jsou převážně exogenního původu (vznikají např. přepisem dsRNA virů) a napomáhají při ochraně proti expresi cizorodé (zejména virové) genetické informace. siRNA zprostředkovávají degradaci mRNA specifickým navedením endonukleasy v komplexu RISC (z angl. RNA-induced silencing complex) do cílové oblasti⁵. Jakmile se původně dvojřetězcová molekula stane součástí RISC komplexu, jeden řetězec je uvolněn a siRNA se tak stává aktivní jednořetězcovou formou hledající komplementární mRNA.

Genová interference byla nejprve objevena u rostlin, jimž slouží jako součást přirozené obrany proti transgeny a virové DNA. Později byly sekvence pro siRNA nalezeny v centromerách, transposonech a v dalších repetitivních genomových sekvencích i jiných organismů, avšak u rostlin jsou jejich funkce popsány nejpodrobněji. Kromě vlivu na růst, vývoj a udržení integrity genomu hrají siRNA klíčovou roli také v rostlinné odpovědi na stres. Rostliny reagují na změny v environmentálních podmínkách modifikací genové exprese prostřednictvím aktivity malých RNA. Mnoho rostlinných genů je regulováno stresovými faktory, jakými jsou sucho, sůl, chlad, teplo, světlo a oxidativní stres⁶.

Rostlinné endogenní siRNA jsou odvozené z dvojřetězcových prekurzorů a obvykle bývají děleny do tří skupin zahrnujících a) hc-siRNA, které navozují tvorbu transkripčně inaktivního heterochromatinu, b) sekundární siRNA a c) přírodní antisense transkripty siRNA⁷. Kromě siRNA s miRNA obsahují rostliny ještě hpRNA (z angl. hairpin derived), což jsou jednořetězcové molekuly, které mají strukturu vlásenek.

Mezi sekundární siRNA patří např. tasiRNA. Jedná se o polyadenylované molekuly tvořící sekundární vlásenkovou strukturu. V kontrastu s běžnými siRNA, které cílí na stejný lokus, ze kterého byly odvozeny (*cis*-acting RNA), tasiRNA cílí mRNA jiného lokusu⁷. Průběh biogeneze sekundárních siRNA je stimulován jinou malou RNA. Např. miRNA řídí vystřížení primárního prekurzorového transkriptu při úpravě polyadenylovaných TAS transkriptů. Ten následně slouží jako templát pro syntézu komplementárního vlákna pomocí RNA-dependentní-RNA-polymerasy 6 a RNA vazebného proteinu, nazvaného supresor genového umlčování 3. Vzniklá dsRNA je následně přeměněna na sekundární siRNA, jedinečnou 21 nt dlouhou tasiRNA (cit.⁷). Ta specificky navádí RISC na cílovou sekvenci v mRNA, která je posléze degradována⁷. Například miR390, spouštějící syntézu TAS3 rodiny sekundárních siRNA, produkuje dvě téměř identické tasiRNA, které cílí na „Auxin Response Factor“ 3 (ARF3) a ARF4. Tato interakce hraje klíčovou roli v regulaci polaritě orgánů, v časování vývoje a v diferenciaci meristému. Dalším příkladem je miR828 indukující produkci sekundární tasiRNA lokusu TAS4. Jejím cílem je mRNA transkripční-

ho faktoru MYB a ovlivňuje tak produkci antokyanu. U dvouděložných rostlin jsou geny kontrolující rezistenci k nemocem indukované sekundárními siRNA, jejichž produkce je vyvolána jinými nekódujícími RNA ze superrodiny miRNA miR482/miR2118 (cit.⁷).

NAT-siRNA jsou třetí skupinou siRNA. Na rozdíl od ostatních typů siRNA, tvořených z prekurzorů syntetizovaných RNA-dependentní-RNA-polymerasou, prekurzory NAT-siRNA vznikají hybridizací samostatně transkribovaných komplementárních RNA. Oddělené RNA mohou být komplementární, protože buď vznikly transkripční opačných vláken stejného lokusu, tzv. *cis*-NAT-siRNA, nebo vzájemnou hybridizací RNA transkriptů genů, které se nepřekrývají, tzv. *trans*-NAT-siRNA. V rostlinách byly doposud popsány pouze *cis*-NAT-siRNA, existence *trans*-NAT-siRNA nebyla zatím prokázána a je pouze hypotetická⁷.

Studie role NAT-siRNA, odvozené z páru *cis*-antisense překrývajících se transkriptů genů *SR05* a *P5CDH*, prokázala důležitou roli NAT-siRNA ve zvládnání oxidačního stresu a osmotických změn v *Arabidopsis* sp. *P5CDH* gen je exprimován konstitutivně, zatímco exprese *SR05* genu je indukována stresem způsobeným zvýšenou koncentrací soli. Při vystavení vysokým koncentracím soli jsou produkovány 24 nt a 21 nt dlouhé siRNA zodpovědné za degradaci transkriptu *P5CDH*. Snížená exprese genu *P5CDH* (kóduje delta-1-pyrrolin-5-karboxylátdehydrogenasu) potom vede k akumulaci prolinu, který je nutný pro toleranci zvýšených koncentrací soli⁶.

První endogenní siRNA, u které bylo potvrzeno zapojení do rostlinného biotického stresu, byla NAT-siRNAATGB2, která reguluje R-geny zprostředkovávající imunitu⁶. Tato siRNA je specificky indukovaná pomocí Pst DC3000 efektoru rostlinného patogenu *Pseudomonas syringae* a potlačuje expresi negativního regulátoru imunity. Byla také objevena nová třída endogenních siRNA, tzv. lsiRNA (long siRNA). Tyto molekuly jsou 30–40 nt dlouhé a jsou indukované bakteriálními infekcemi nebo specifickými růstovými podmínkami⁶.

2.1.2. miRNA

Na regulaci obrovského množství procesů ve všech typech lidských buněk se podílejí miRNA (22–25 nt). V současné době známe téměř 2000 sekvencí miRNA, které figurují ve více než deseti veřejných databázích pro predikci vazebných míst na cílové mRNA. Pro příklad uveďme alespoň volně dostupnou databázi LimiTT (cit.⁸) zahrnující genomy 26 druhů organismů, či databázi miRNAWalk2.0 (cit.⁹), zaměřenou na genom člověka, myši a potkana.

Existují hypotézy, že až 60 % lidských genů kódujících proteiny může obsahovat cílové místo pro vazbu miRNA (cit.¹⁰). S tím souvisí role miRNA ve vzniku obezity, diabetu, neurodegenerativních onemocnění a rakoviny⁵. miRNA jsou zpravidla produkovány RNA-polymerasou II jako primární prekurzory (tzv. pri-miRNA), které zaujímají sekundární strukturu ve formě vlásenek se smyčkou. Pri-miRNA jsou v jádře posttranskripčně modifikovány

podobně jako mRNA (čepičkou na 5' konci a polyadenylací na 3' konci). Následně jsou oba konce štěpeny RNasou Drosha s kofaktorem Pasha na prekurzorovou miRNA (pre-miRNA), která je exportována z jádra. V cytoplasmě je pre-miRNA štěpena nukleasou Dicer na efektorovou miRNA⁵. Jednořetězcové produkty miRNA pak kontrolují genovou expresi posttranskripčně tím, že se vážou ke komplementárním sekvencím na cílové mRNA a zprostředkovávají navázání efektorových proteinů komplexu RISC. Úplná komplementarita mezi miRNA a cílovým úsekem mRNA se u savců vyskytuje velice zřídka, ale k potlačení genové exprese postačuje komplementarita pouze mezi 6 páry nt (cit.¹¹). S výjimkou některých miRNA, u kterých bylo prokázáno, že dokážou zvýšit expresi cílových genů, zastavují miRNA genovou expresi inhibicí translace, případně iniciací degradace mRNA (cit.¹¹). miRNA zpravidla blokuje translaci vazbou na ne-translatovanou 3' koncovou sekvenci mRNA, ale není vzácná ani vazba na kódující sekvence mRNA, nebo na její 5' konec. Degradaci mRNA mohou miRNA řídit dvěma mechanismy (obr. 1). Těmi jsou štěpení mRNA pomocí endonukleas nebo deadenylace a následné odbourání mRNA pomocí exonukleas. Druhý z uvedených mechanismů je dominantní u savců. Přímé rozštěpení nastává pouze tehdy, je-li komplementarita mezi mRNA a miRNA téměř perfektní, což je častější pro rostliny¹¹.

Řada biotechnologických společností na zakázku dodává siRNA proti jakékoli mRNA, což představuje mocný nástroj molekulární biologie a potenciálně i genových terapií. U nich však existuje ještě řada limitací spojených např. s neúčinnou dopravou do cílové tkáně. Situaci ještě komplikuje skutečnost, že jedna miRNA může zároveň ovlivňovat expresi několika genů. Bylo např. zjištěno,

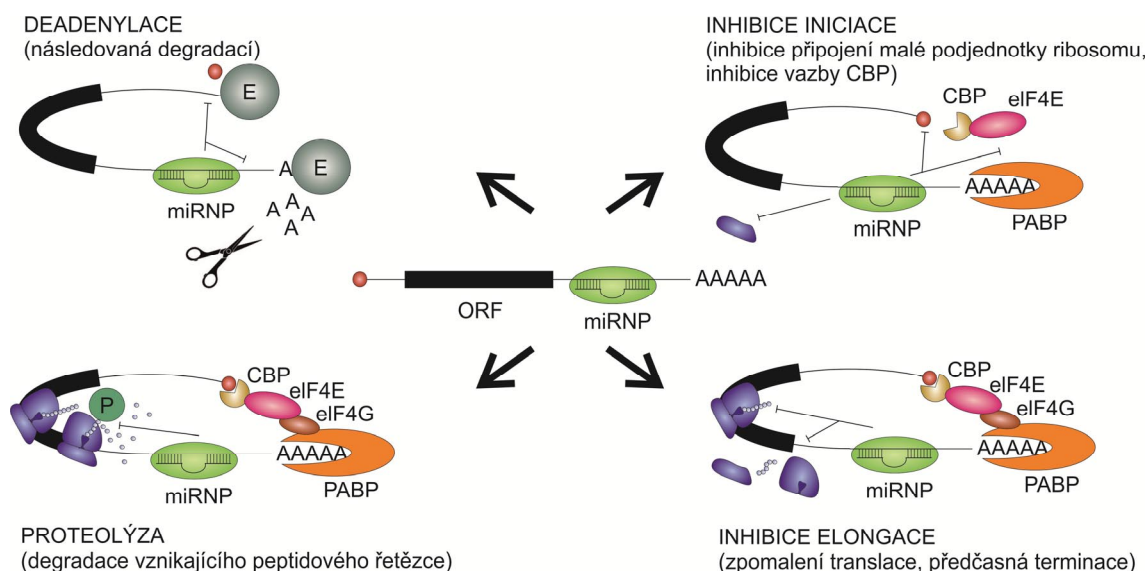
že stejná miRNA může inhibovat rozvoj jednoho typu nádoru, ale podporovat růst jiného. Např. miR-221 a miR-222 jsou homologní RNA, které vykazují onkogenní aktivitu v jaterní tkáni potlačením exprese fosfatasy působící jako supresor tumoru, zatímco v leukemických buňkách potlačují expresi *KIT* onkogenu¹². Jsou známy i další případy podobného duálního efektu (pro přehled viz¹³). Složitost sítě regulací ukazují případy, kdy jedna mRNA je cílem několika miRNA. Navíc existuje určitá kooperace mezi aktivitou jednotlivých miRNA, kdy např. miR-22 podporuje metastazování karcinomu prsu umlčením exprese miR-200, která má anti-metastatickou funkci. Mechanismus tohoto umlčení spočívá primárně ve snížení exprese enzymu zodpovědného za inaktivaci (demethylaci) promotoru miR-220 (cit.¹³).

2.2. Regulace transkripce

2.2.1. TSSaRNA

TSSaRNA (z angl. Transcription Start Site associated RNA) eukaryotních organismů i bakterií¹⁴ jsou transkribovány v oblastech blízko aktivních promotorů¹⁵. Jejich délka je variabilní a závisí na druhu organismu. U člověka se pohybuje v rozmezí 13–26 nt (cit.¹⁴).

V eukaryotních kmenových buňkách se specificky vážou na sekvence ležící cca 250 nt před a 50 nt za počátkem transkripce kontrolované CpG ostrovy. Přestože není mechanismus regulace ještě detailně objasněn, současná data naznačují, že vazba TSSaRNA na cílovou sekvenci v jednom nebo druhém vlákne může ovlivnit směr, kterým se bude pohybovat RNA-polymerasa II při transkripci¹⁶ a zároveň tato vazba udržuje v aktivní formě promotorové oblasti genů kódujících proteiny¹⁵.



Obr. 1. Mechanismy posttranskripční represe genů zprostředkované miRNA. miRNP – mikroribonukleoproteiny, eIF – eukaryotní iniciační faktory, CBP – protein vázající čepičku, PABP – protein vázající poly-A konec, zelené kolečko P – proteasa, šedé kolečko E – exonukleasa, červené kolečko – 7-methylguanidinová čepička. (Upraveno dle³⁵)

2.2.2. *nro-RNA*

Jaderná run-on RNA (*nro-RNA*, z angl. nuclear run on RNA) je další málo prozkoumaná ncRNA, která byla zatím nalezena pouze u člověka¹⁵. *nro-RNA* se podílí na regulaci iniciace transkripce RNA-polymerasou II a umí řídit orientaci transkripce podobě jako TSSaRNA¹⁵.

2.3. Regulace posttranskripčních modifikací RNA

2.3.1. *snRNA*

Molekuly snRNA jsou malé nukleární RNA, které tvoří velmi bohatou nepolyadenylovanou skupinu nekódujících transkriptů, jejichž funkce se uplatňuje v nukleoplasmě¹⁷. Tyto snRNA jsou spolu s pěti až deseti proteiny základem ribonukleoproteinových částic (snRNP, z angl. small nuclear ribonucleoprotein particles), nazvaných U1, U2, U4, U5 a U6. Ty spolu interagují díky vzájemné komplementaritě snRNA na povrchu částic. snRNA hrají zásadní roli při tvorbě spliceosomu a jeho umístění na komplementární sekvence intronu (U1 se váže na 5' konec, U2 na polypyrimidinový úsek poblíž 3' konce intronu (místo větvení, které 2'-hydroxylovou skupinou iniciuje první transesterifikaci) a trimer U4, U5 a U6 pak spojuje celý spliceosom). Výsledkem je přiblížení jednotlivých domén intronu k sobě. Samotný sestřih probíhá ve dvou transesterifikačních reakcích iniciovaných nukleofilním útokem hydroxylů na ribose¹⁸. Bylo zjištěno, že se některé podjednotky účastní i dalších buněčných procesů. Např. U1 snRNA se prostřednictvím interakce s iniciačním faktorem TFIIF podílí na iniciaci transkripce RNA-polymerasou II (cit.¹⁹).

Později byl objeven další, minoritní typ intronů s jinými konsensus sekvencemi v donorovém a akceptorovém místě sestřihu; 5'-AU-AC-3' místo 5'-GU-AG-3' mo-

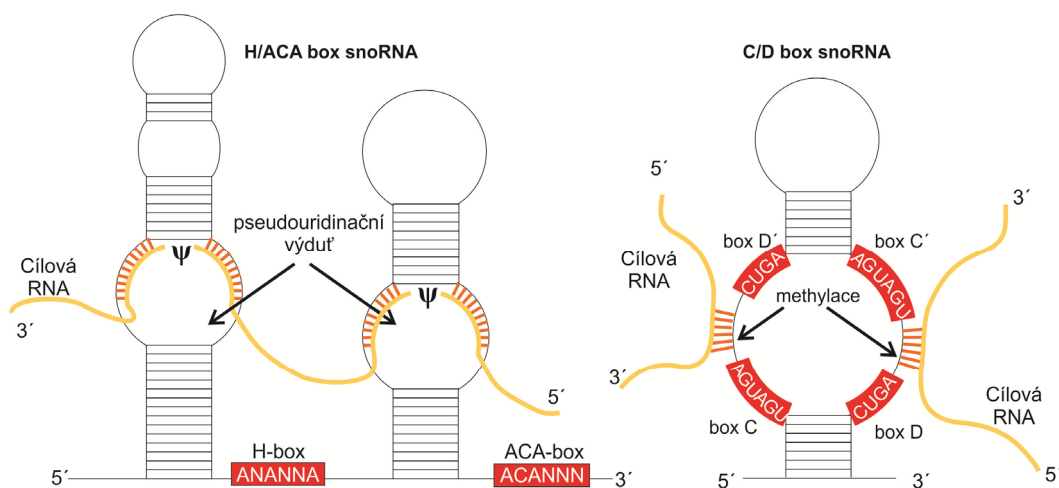
tivu běžného u většiny intronů. Díky tomuto motivu získaly původní název ATAC introny. Později byly zjištěny minoritní introny s jinými konsensus sekvencemi, které jsou nazývány introny typu U12. Poněkud se liší také vzdálenost mezi 3' místem sestřihu a místem větvení. Spliceosomy tohoto typu se skládají ze čtyř specifických snRNP: U11, U12, U4atac a U6atac, obsahujících snRNA stejných názvů. Jediný snRNP společný oběma typům sestřihu je U5 (cit.¹⁸).

U7 snRNP patří mezi vzácně se vyskytující malé ribonukleoproteinové komplexy Sm třídy. V jedné savčí buňce se těchto komplexů vyskytuje zhruba 10^3 kopií na rozdíl od cca 10^6 kopií ostatních ribonukleoproteinových částic¹⁸. U7 snRNP může mít délku od 57 do 74 nt. Po transkripci je U7 snRNP exportován do cytoplasmy, kde jeho RNA podléhá posttranskripčním úpravám, a následně je transportován zpět do jádra. U7 v komplexu s polyadenylačními faktory reguluje posttranskripční modifikaci histonové mRNA, konkrétně štěpení 3' konce^{19,20}.

2.3.2. *snoRNA*

Malé jadérové RNA (*snoRNA*) tvoří skupinu netranslatovaných RNA molekul variabilní délky. Jejich lokalizace v jadérku předurčuje jejich funkci. Většina *snoRNA* se totiž podílí na posttranskripční modifikaci ribosomální RNA (cit.²¹). Jsou známy dva evolučně konzervované typy označované jako C/D box *snoRNA* a H/ACA box *snoRNA* (cit.¹⁷).

C/D box *snoRNA* obsahuje C a D sekvence (C box: R-UGAUGA a D box: CUGA) poblíž 3' a 5' konců a stejné sekvence označované jako C' a D' (viz obr. 2). *snoRNA* se komplementárně váže poblíž methylačních míst na pre-rRNA a umísťuje do nich methyltransferasu a tím reguluje specifickou metylaci rRNA (cit.¹⁷).



Obr. 2. Krátké jadérové RNA zodpovědné za zrání a posttranskripční modifikace rRNA. (vlevo) H/ACA box *snoRNA* obsahuje ACA triplet na 3.–6. nt od 3' konce a H-box ve střední části, která spojuje dvě funkčně podobné vlásečkové domény. Každá vlásečka tvoří dva 4–10 nt dlouhé duplexy s rRNA. (vpravo) C/D box *snoRNA* je tvořen jedním až dvěma sety krátkých konzervativních sekvencí nazývanými boxy C a D, a boxy C' a D'. Tyto boxy se nalézají blízko sebe a tvoří motiv C/D boxu. Tyto RNA vytvářejí 10–21 nt dlouhé duplexy s rRNA. (Upraveno dle³⁶)

H/ACA box snoRNA se podobně váže poblíž místa určeného k pseudouridylaci, tj. isomeraci uridinu na pseudouridin (Ψ). Název je odvozen od konsensus sekvencí; H boxu (ANANNA) a jednořetězcové sekvence (ACA box) umístěné pouze tři nukleotidy před 3' koncem. Tato RNA zaujímá typickou sekundární strukturu sestávající ze dvou vlásenek, jedné smyčky a dvou výdutí (viz obr. 2, cit.¹⁷).

2.3.3. *scaRNA*

scaRNA (z angl. small Cajal body-specific RNA) jsou specifickou skupinou malých RNA obsažených v jaderných sub-organelách (Cajalových těliscích), která hrají různé role při transkripci a posttranskripčních modifikacích RNA (cit.¹⁷). *scaRNA* zpravidla obsahují C/D i H/ACA box. Účastní se biogeneze snRNP modifikací, zejména methyloci a pseudouridylaci, spliceosomálních snRNA U1, U2, U4, U5 a U12 (cit.²²).

2.3.4. *7SK RNA*

Lidská *7SK RNA* je hojný 331 nt dlouhý nukleární transkript generovaný RNA-polymerasou-III (cit.²³). *7SK RNA* je evolučně konzervovaná u obratlovců a homologi sekvence mohou být nalezeny také u kroužkoců, měkkýšů a hmyzu. Tato RNA se skládá do několika vlásenek, které slouží jako specifické platformy pro navázání proteinů, s nimiž tvoří snRNP, který interaguje s transkripčním elongačním faktorem P-TEFb. Navázání *7SK RNA* k proteinovému komplexu HEXIM1/2 způsobí přeměnu tohoto komplexu v inhibitor elongačního faktoru P-TEFb, čímž dojde k zastavení elongace transkriptu²³.

2.3.5. *gRNA*

Řídící RNA (*gRNA*; z angl. guide RNA) jsou malé asi 60 nt dlouhé RNA, které slouží jako templáty pro editaci, tj. řízenou posttranskripční modifikaci tRNA, rRNA, mRNA i miRNA eukaryot, archeí a prokaryot. Přesný mechanismus role *gRNA* v editaci mRNA není dopodrobna popsán²⁴. Předpokládá se, že část 5' konce *gRNA* vytvoří krátký intermolekulární duplex s pre-mRNA. Následně editování pre-mRNA zvyšuje komplementaritu dvojvlákna. Nadbytečné puriny v sekvenci *gRNA* tedy slouží jako templát, který specifikuje inzerci uracilu(ů), zatímco nadbytečné uracily v pre-mRNA sekvenci jsou z duplexu odstraněny. K editaci může docházet v jádře, mitochondriích i plastidech²⁴.

2.3.6. *piRNA*

piRNA jsou největší třídou živočišných malých ncRNA s délkou 24–30 nt. Od miRNA a siRNA se *piRNA* liší jak svou velikostí, tak i sekundární strukturou a původem. *piRNA* vznikají z jednovláknových prekurzorů, které pocházejí především z repetitivních sekvencí v genomu²⁵. Jejich komplexy s proteiny Piwi (název odvozen od angl. P-element induced wimpy testis, pozn. P-element je transposon) mají roli jak v epigenetické, tak v posttranskripční kontrole genové exprese²⁵. Piwi proteiny patří do skupiny

Argonaut proteinů, které jsou součástí RISC komplexu, klíčového u různých typů genové interference²⁵. *piRNA* specificky navádí komplexy Piwi proteinů při regulaci exprese genů kódujících retrotransposony, genů regulujících spermatogenezi a genů účastnících se regenerace orgánů²⁵.

asiRNA (z angl. repeat associated small interfering RNA) tvoří podskupinu *piRNA* (cit.²⁶). Jsou odvozeny z různých repetitivních elementů genomu (např. z centromerového nebo telomerového heterochromatinu) a podílejí se na vytváření a udržování struktury heterochromatinu a kontrolují transkripci repetitivních sekvencí a umlčování transposonů včetně retrotransposonů²⁶.

2.3.7. *vault RNA*

vault RNA jsou ncRNA, které spolu se třemi typy proteinů tvoří soudkovité *vault* částice, v nichž *vault RNA* představují asi 5 % celkové hmoty²⁷. Částice *vault* jsou největšími ribonukleoproteinovými komplexy, které byly dosud objeveny. Počet a délka (80–150 nt) *vault RNA* se liší v různých organismech²⁷. Jejich role sice není zatím objasněna, ale je zřejmé, že regulují např. buněčnou pohyblivost a diferenciaci. Existují rovněž důkazy, že se podílejí na rezistenci nádorových buněk k lékům. V souladu s tím byly nalezeny vysoké hladiny MVP (z angl. major *vault* protein) v tkáních organismů chronicky vystavených působení xenobiotik²⁷.

2.3.8. *SRP RNA*

SRP RNA (někdy též nazývaná *7SL*) je součástí částice *SRP* (z angl. signal recognition particle) a napomáhá její interakci s ribosomem při blokování elongace translace do doby, než dojde k interakci s receptorem *SRP* na povrchu endoplasmatického retikula. Další funkcí spojenou s GTPasovou aktivitou je následné uvolnění *SRP* od jejího receptoru na povrchu ER. U savců je syntetizována RNA-polymerasou III jako cca 300 nt dlouhý transkript, který spolu s několika proteiny tvoří *SRP* částici. Počet *SRP* proteinů se liší podle druhu organismu. U savců je *SRP* složena ze šesti proteinů *SRP9*, *SRP14*, *SRP19*, *SRP68*, *SRP54*, *SRP72* a molekuly *SRP RNA* (cit.²⁸).

2.3.9. *tiRNA*

tiRNA (z angl. tRNA-derived stress-induced small RNA) jsou malé RNA (30–40 nt) odvozené od tRNA. Vznikají v důsledku působení stresem aktivované ribonukleasy angiogeninu, který štěpí zralé tRNA v antikodonové smyčce na 5'- a 3'-*tiRNA* (cit.²⁹). Nejprve byly objeveny v bakterii *Escherichia coli*, kterou chrání před bakteriofágovou infekcí. Později byly další *tiRNA* identifikovány v řadě organismů³⁰. *tiRNA* se podílejí na indukci apoptosy u buněk, v nichž byla stresem poškozena DNA více, než dokážou zvládnout opravné mechanismy. Vnesená 5'-*tiRNA* inhibuje translaci proteinů v nádorových buňkách kostí vytěsněním eukaryotních iniciačních faktorů (eIF) 4B, 4E a 4G z m⁷G konce mRNA (cit.²⁹).

2.3.10. Y RNA

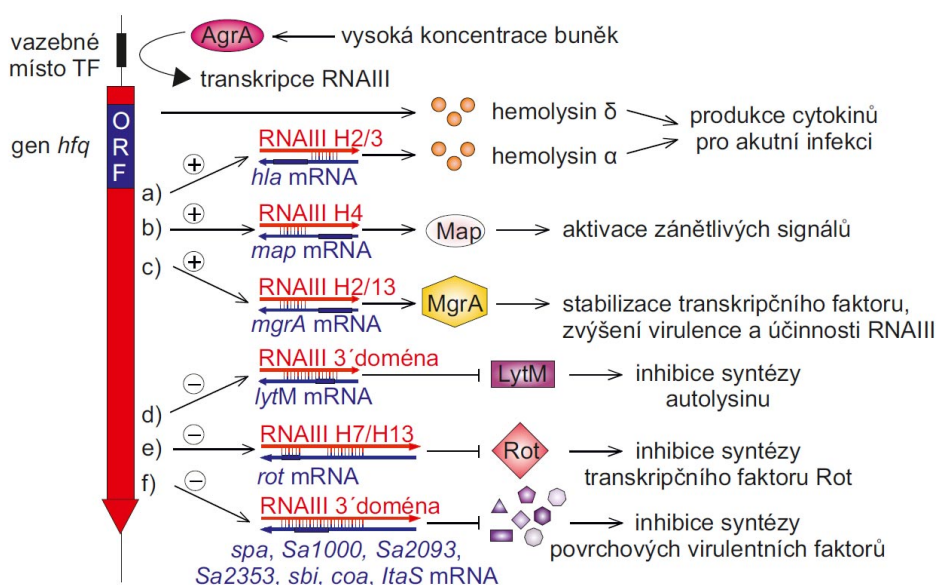
Y RNA je další krátkou ncRNA. Různé varianty (hY1, hY3, hY4 a hY5) cca sta těchto lidských ncRNA byly na základě *in vitro* studií navrženy jako faktory regulující replikaci chromosomální DNA. V bezbuněčném systému jsou zásadní při tvorbě replikační vidlice³¹. Y RNA jsou součástí Ro ribonukleoproteinové částice (Ro RNP), kde spolu s proteiny Ro60 (60 kDa), Ro52 (52 kDa) a La proteinem kontrolují kvalitu a zajišťují stabilitu malých ncRNA. Výzkumy také ukazují, že Ro hraje roli při ochraně proti UV záření a její snížená hladina např. vazbou anti-Ro60 protilátek má souvislost se vznikem systémového autoimunitního onemocnění lupus erythematoses³¹.

2.4. Bakteriální ncRNA s duální funkcí

Současné znalosti ukazují, že u mikroorganismů převládají z 80–95 % sekvence kódující proteiny a ncRNA jsou minoritní. Přesto bylo zjištěno³², že v řadě bakterií mají ncRNA důležitou regulační roli. Průměrný bakteriální genom kóduje přibližně 100–300 malých RNA. Jejich zastoupení se může značně lišit nejen u různých rodů, ale dokonce i mezi příbuznými kmeny. Kromě ncRNA s pouze regulační funkcí byly identifikovány i takové, které

obsahují malé otevřené čtecí rámce (ORF) translatovatelné do funkčních peptidů. Tyto malé RNA s „dvojitou funkcí“ mohou působit zároveň jako komplementární, antisense RNA i jako mRNA (cit.³²). Jednou z nejprostudovanějších RNA s dvojitou funkcí je RNAIII patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*, jejíž funkce je blíže znázorněna na obr. 3.

Studie posledních let ukázaly, že malé RNA hrají klíčovou roli v bakteriální odpovědi na stres a regulaci faktorů důležitých pro virulenci³¹. Dohromady s regulačními proteiny a signálními drahami spolupůsobí ncRNA na zvládnutí změn environmentálních podmínek a regulaci nepřebírného množství stresových odpovědí³². Hlavní typy bakteriálních ncRNA zahrnují pravou antisense RNA syntetizovanou z templátového vlákna komplementárního k mRNA, kterou regulují. Dále jsou to ncRNA, které pro svoji regulační funkci využívají také párování s cílovou RNA, ale mají s ní pouze částečnou komplementaritu a malé RNA, které vazbou na proteiny mění jejich aktivitu např. tvorbou RNP (cit.^{32,33}). V mnoha druzích bakterií je k párování mezi ncRNA a jejich cílovou mRNA potřeba chaperon Hfq homologický s centrální doménou eukaryotního spliceosomu spíše než s proteiny účastnicími se RNA interference u eukaryot³⁴.



Obr. 3. Regulační aktivita 514 nt dlouhé RNAIII, hlavního virulentního faktoru lidské patogenní bakterie *Staphylococcus aureus*. Tato sRNA s duální funkcí je tvořena 14 smyčkami (značeny H1–H14), které jsou odpovědné za regulaci 12 různých mRNA, a zároveň obsahuje ORF kódující cytotoxický peptid hemolysin δ , který lyzuje hostitelské buňky. RNAIII potlačuje expresi genů časně virulence a povrchových proteinů a zároveň usnadňuje produkci toxinů důležitých pro pozdní infekci. Aktivační funkce RNAIII je zaměřena na a) mRNA pro hemolysin α (hla mRNA), b) mRNA pro hlavní histokompatibilní komplex třídy II (Map protein), c) mRNA pro transkripční regulátor MgrA. Inhibice translace a následná degradace mRNA je cílena na d) mRNA pro autolysin, e) mRNA pro represor mnoha toxinů (transkripční faktor Rot), f) mRNA pro povrchové virulentní faktory (*spa* – povrchové proteiny, *Sa* – sekreční antigeny a proteiny vázající fibrinogen, *sbi* – protein vázající imunoglobulin, *coa* – koagulasa, *ltaS* – synthasa lipoteichové kyseliny). (Upraveno dle³⁷)

3. Závěr

Přes poměrně krátký výzkum v této oblasti je zřejmé, že ncRNA hrají velkou roli při regulaci buněčných procesů a ovlivnění jejich hladiny či mechanismu působení může být mocným nástrojem k ovlivnění fyziologického stavu různých typů organismů. Navíc se ukazuje, že zejména miRNA mohou sloužit jako prostředek k diagnóze některých onemocnění. V následujícím čísle Chemických Listů bude uveřejněn článek popisující význam těchto molekul s vybranými příklady.

Práce byla zhotovena za podpory projektu OPPK CZ 2.16/3.1.00/24503 a NPU ILO1601.

Seznam použitých zkratk

ARF	Auxin Response Factor
circRNA	circular RNA
dsRNA	double-stranded RNA
easiRNA	epigenetically activated-siRNAs
eIF	eukaryotní iniciační faktor
gRNA	guide RNA
hc-siRNA	heterochromatic siRNA
hpRNA	hairpin derived
lincRNA	dlouhé mezigenové ncRNA
lncRNA	long non-coding RNA
lsiRNA	long siRNA
miRNA	microRNA
MVP	major vault protein
NAT	nature antisense transcripts
ncRNA	non-coding RNA
nt	nucleotides
nro-RNA	nuclear run on RNA
ORF	otevřený čtecí rámeček
phasiRNA	phased siRNAs
piRNA	Piwi interacting RNA
Piwi	P-element induced wimpy testis
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primary transcripts of miRNA
qisRNA	quelling-defective interacting small RNA
rasiRNA	repeat associated small interfering RNA
RISC	RNA-induced silencing complex
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particles
scaRNA	small Cajal body-specific RNA
scnsRNA	small scan RNA
siRNA	small interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
snRNA	small nuclear RNA
SRP	signal recognition particle
T-UCR	transkribované ultrakonzervované regiony
tasiRNA	trans-acting siRNA
tiRNA	tRNA-derived stress-induced small RNA
TSSaRNA	transcription start site associated RNA

LITERATURA

- Munshi A. M. V., Ahuja Y. R.: *J. Pharmacogenomics Pharmacoproteomics* 7, 3 (2016).
- Kung J. T. Y., Colognori D., Lee J. T.: *Genetics* 193, 651 (2013).
- Geisler S., Collier J.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 699 (2013).
- Quinn J. J., Chang H. Y.: *Nat. Rev. Genet.* 17, 47 (2016).
- Ranganathan K., Sivasankar V.: *Int. J. Oral Maxillofac. Pathol.* 18, 229 (2014).
- Axtell M. J.: *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 137 (2013).
- Khraiwesh B., Zhu J. K., Zhu J.: *Biochim. Biophys. Acta, Gene Regul. Mech.* 1819, 137 (2012).
- Bayer J., Kuenne C., Preussner J., Looso M.: *BMC Bioinf.* 17, (2016). doi: 10.1186/s12859-016-1070-1.
- Dweep H., Sticht C., Pandey P., Gretz N.: *J. Biomed. Inf.* 44, 839 (2011).
- Sayed D., Abdellatif M.: *Physiol. Rev.* 91, 827 (2011).
- Thomson D. W., Bracken C. P., Goodall G. J.: *Nucleic Acids Res.* 39, 6845 (2011).
- Garofalo M., Quintavalle C., Romano G., Croce M. C., Condorelli G.: *Curr. Mol. Med.* 12, 27 (2012).
- Ling H., Fabbri M., Calin G. A.: *Nat. Rev. Drug Discovery* 12, 847 (2013).
- Zaramela L. S., Vencio R. Z., ten-Caten F., Baliga N. S., Koide T.: *PLoS One* 9, (2014). doi:10.1371/journal.pone.0107680.
- Costa F. F.: *BioEssays* 32, 599 (2010).
- Guil S., Esteller M.: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1068 (2012).
- Matera A. G., Terns R. M., Terns M. P.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 209 (2007).
- Tarn W. Y., Steitz J. A.: *Trends Biochem. Sci.* 22, 132 (1997).
- Grimm C., Stefanovic B., Schümperli D.: *EMBO J.* 12, 1223 (1993).
- Dreyfuss G., Philipson L., Mattaj J. W.: *J. Cell Biol.* 106, 1419 (1988).
- Williams G. T., Farzaneh F.: *Nat. Rev. Cancer* 12, 84 (2012).
- Staněk D., Neugebauer K. M.: *Chromosoma* 115, 343 (2006).
- Diribarne G., Bensaude O.: *RNA Biol.* 6, 122 (2009).
- Kable M. L., Seiwert S. D., Heidmann S., Stuart K.: *Science* 273, 1189 (1996).
- Bamezai S., Rawat V. P. S., Buske C.: *Stem Cells* 30, 2603 (2012).
- Choudhuri S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 388, 177 (2009).
- van Zon A., Mossink M. H., Scheper R. J., Sonneveld P., Wiemer E. A. C.: *Cell. Mol. Life Sci.* 60, 1828 (2003).
- Luirink J., Sinning I.: *Biochim. Biophys. Acta, Mol. Cell Res.* 1694, 17 (2004).
- Ivanov P., Emara M. M., Villen J., Gygi S. P., Anderson P.: *Mol. Cell* 43, 613 (2011).

30. Levitz R., Chapman D., Amitsur M., Green R., Snyder L., Kaufmann G.: *EMBO J.* 9, 1383 (1990).
31. Hall A. E., Turnbull C., Dalmay T.: *Biomol. Concepts* 4, 103 (2013).
32. Hoe C. H., Raabe C. A., Rozhdestvensky T. S., Tang T. H.: *Int. J. Med. Microbiol.* 303, 217 (2013).
33. Gottesman S.: *Trends Genet.* 21, 399 (2005).
34. Gottesman S., Storz G.: *Cold Spring Harb Perspect. Biol.* 3, (2011). doi: 10.1101/cshperspect.a003798.
35. Filipowicz W., Bhattacharyya S. N., Sonenberg N.: *Nat. Rev. Genet.* 9, 102 (2008).
36. Thorenoor N., Slaby O.: *Tumor Biol.* 36, 41 (2015).
37. Gimpel M., Brantl S.: *Mol. Microbiol.* 103, 387 (2016).

K. Spurná, J. Viktorová, and T. Ruml (*Department of Biochemistry and Microbiology, University of Chemistry and Technology Prague*): **An Overview of Small Non-coding RNAs**

Although the existence of small molecules of RNA that do not encode any amino acid chain has been proven two decades ago, their significance and extensive effect on cellular processes is still amazing. Many new studies focused on finding new non-coding RNAs and the clarification of their functions in the organism are continuously published. This paper summarizes the current knowledge of small non-coding RNAs and their functions, both in prokaryotic and eukaryotic organisms.

Keywords: miRNA, short interfering RNA, regulation of transcription