

Received: 2011.05.05
Accepted: 2011.07.07
Published: 2011.08.05

Immunoregulacja poprzez interferencyjny RNA – mechanizmy, rola, perspektywy*

Immunoregulation by interference RNA (iRNA) – mechanisms, role, perspective

Emilia Sikora, Włodzimierz Ptak, Krzysztof Bryniarski

Katedra Immunologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum

Streszczenie

Utrzymanie homeostazy organizmu zależne jest od prawidłowego funkcjonowania poszczególnych układów czynnościowych, co z kolei jest wynikiem sprawnej komunikacji pomiędzy elementami każdego z systemów, a nierzadko również pomiędzy układami. Komunikacja ta realizować się może między sąsiadującymi komórkami, jak również na odległość, drogą endokrynną. Jako przekaźniki informacji funkcjonują cząsteczki białkowe, takie jak hormony, neuroprzekaźniki i cytokiny. Obecnie wiadomo też, że regulacja funkcjonowania komórki odbywać się może ponadto za pośrednictwem krótkich odcinków RNA. Mechanizm odkryty relatywnie niedawno, zdążył już doczekać się tysięcy publikacji opisujących jego rolę zarówno w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, jak i w patogenezie m.in. nowotworów i schorzeń autoimmunizacyjnych.

Krótkie regulacyjne RNA (srRNA) mogą powstawać na bazie genomu (zarówno eksonów jak i intronów) danej komórki, bądź być do niej wprowadzane z zewnątrz. U ssaków, dzięki swej komplementarności do docelowych mRNA i kooperacji z białkami rodziny Ago/PIWI, z którymi tworzą efektorowe kompleksy rybonukleoproteinowe, srRNA kontrolują ekspresję genów na poziomie potranskrypcyjnym, poprzez zahamowanie translacji mRNA bądź degradację transkryptu.

SrRNA kontrolują wszystkie etapy rozwoju i funkcjonowania komórek układu immunologicznego, począwszy od komórek pnia układu hematopoetycznego po aktywowane komórki efektorowe, tak odpowiedzi wrodzonej jak i adocytywnej. Ponadto pewne populacje komórek regulatorowych wpływają na funkcje innych komórek endokrynnie, poprzez uwalnianie cząstek interferującego RNA.

Słowa kluczowe:

interferencja RNA • miRNA • immunoregulacja • limfocyty regulatorowe

Summary

The functioning of an organism depends on the precise control mechanisms, constantly adjusted to the actual state. Therefore, there is a need for efficient communication between both adjacent and distant cells, which may be executed by proteins such as hormones, neurotransmitters and cytokines. Recently another means of regulation has emerged – short regulatory RNAs (srRNAs). Although discovered only a couple of years ago, the mechanism of RNA interference has already become a topic of thousands of publications, defining its roles in both physiological and pathological processes, such as cancerogenesis and autoimmunization.

* Praca powstała dzięki wsparciu finansowemu ze środków MNiSW nr N N401 09231/2076 dla KB, a także ze środków na badania statutowe K/ZDS/001429 dla KB oraz stypendium doktoranckiego dla Emilii Sikory.



RNAs regulating cell function may be coded in its genome (both exons and introns) or be introduced from the external environment. In mammals microRNAs (miRNAs) cooperate with proteins from the Ago/PIWI family to form effector ribonucleoprotein complexes, and owing to their complementarity to the target mRNA, control genes' expression at the posttranscriptional level, either through the suppression of mRNA translation or through mRNA degradation.

SrRNAs are crucial regulators throughout the development of immune cells, starting from hematopoietic stem cells, up to the effector cells of the adaptive immune response. Moreover, some of the regulatory cells perform their function by releasing miRNAs, which are then transported to the target cells, possibly enclosed in the exosomes.

Key words: RNA interference • miRNA • immunoregulation • regulatory lymphocytes

Full-text PDF: <http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=954790>

Word count: 6589

Tables: 1

Figures: 3

References: 92

Adres autora: dr hab. n. med. Krzysztof Bryniarski, Katedra Immunologii, Uniwersytet Jagielloński, Collegium Medicum, ul. Czysza 18, 31-121 Kraków, e-mail: mmbrynia@cyf-kr.edu.pl

1. WSTĘP

Wiedza na temat budowy i funkcji RNA w komórce ciągle ulega pogłębieniu. Dotychczasowy repertuar funkcji – mRNA jako transkryptu genu, tRNA – transportera aminokwasów w cytoplazmie czy budulcowej roli rybosomalnych RNA (rRNA) nie obejmuje całości funkcji sprawowanych przez RNA. Elementy transkrybowane na bazie eksonów, a także niekodujących odcinków DNA (intronów, dawniej uważanych za śmieciową postać RNA), obecnie stanowią przedmiot przełomowych badań nad regulacyjną funkcją kwasów rybonukleinowych.

Od czasu odkrycia zjawiska hamowania ekspresji genów przez dwuniciowy RNA (dsRNA) – interferencji RNA (RNAi) i przyznania Nagrody Nobla uczonym amerykańskim Andrewowi Z. Firemu i Craigowi C. Melli (2006), obserwujemy lawinowy wzrost publikacji podejmujących tematykę regulacji z udziałem krótkich, niekodujących RNA.

Nadal poszerzana jest wiedza na temat sposobu realizowania funkcji RNAi. Zaproponowany początkowo stosunkowo prosty mechanizm regulacyjny polegający na komplementarnym przyłączeniu interferującego RNA do odpowiedniej nici mRNA, co prowadzi do enzymatycznej degradacji transkryptu i w konsekwencji zahamowania translacji białka, nie jest już jedynym. Publikowane są doniesienia o coraz to nowych funkcjach niekodujących RNA: w regulacji ekspresji genów (a więc wpływających na metabolizm, wzrost i różnicowanie komórek), udziale w obronie przeciwirusowej czy w hamowaniu rozprzestrzeniania się ruchomych elementów genetycznych, takich jak transpozony [72].

W pracy omówiono problematykę niekodujących RNA, będących fizjologicznymi regulatorami ekspresji genów. W większości należą one do klasy microRNA (miRNA), a geny je kodujące stanowią około 1% ludzkiego genomu [12]. U człowieka opisano dotąd 1424 różnych miRNA [53]. Ocenia się, że regulacji tej podlega nawet 30%

mRNA kodujących białka [45]. Dlatego, w związku z szerokim zakresem działania regulacyjnych RNA, poszukuje się ich wpływu na procesy chorobowe, nowotworzenie i schorzenia autoimmunizacyjne.

Artykuł jest próbą podsumowania aktualnego stanu wiedzy na temat regulacji funkcjonowania układu immunologicznego przez interferencyjny, dwuniciowy RNA

2. SZLAKI REGULACYJNE WYKORZYSTUJĄCE SRRNA

Małe, regulacyjne RNA (small regulatory RNA – srRNA) podzielono na wiele klas, różniących się biogenezą, długością i strukturą, modyfikacjami chemicznymi łańcucha (obecność urydyny bądź fosforylacja końca 5', O-metylacja końca 3'), czy w końcu sposobem w jaki realizują swą funkcję.

Obecnie rozróżnia się dwa główne szlaki regulacyjne wykorzystujące krótkie RNA – miRNA i interferencji RNA (RNAi) [22]. Szlak miRNA, realizowany z udziałem miRNA, odpowiada za regulację ekspresji genów podczas rozwoju i funkcjonowania organizmu. Funkcja ta zwykle realizowana jest przez miRNA o niecałkowitej komplementarności do docelowych mRNA. Efektem oddziaływania między tymi cząstkami jest najczęściej supresja translacji mRNA, choć w pewnych warunkach oddziaływanie z miRNA prowadzić może do wzmożenia translacji [78]. Interferencja RNA natomiast powstała w toku ewolucji jako mechanizm obrony przeciwirusowej i kontroli ekspresji materiału genetycznego zawartego w transpozonach. Cząstką regulującą jest tu siRNA (small interfering RNA), a czynnikiem decydującym o uruchomieniu tego szlaku jest całkowita komplementarność interferującego RNA do wyciskanego mRNA. Zahamowanie ekspresji białka wynika w tym przypadku z degradacji transkryptu mRNA.

Oprócz wyżej opisanej regulacji na poziomie potranskrypcyjnym (post-transcriptional gene silencing – PTGS),

RNA może kontrolować ekspresję genów na poziomie transkrypcji (transcriptional gene silencing – TGS) – przez epigenetyczne modyfikacje materiału genetycznego. Interferujący RNA oddziałując z RNA-polimerazą zależną od RNA i z metylotransferazą histonową promuje metylację histonów, co prowadzi do wyciszenia centromerowego DNA i/lub formowania heterochromatyny, która nie podlega transkrypcji [58]. Mechanizm ten zaobserwowano u drożdży, roślin i muszek owocowych, lecz do tej pory brak jednoznacznych doniesień na temat jego roli u ssaków. Wprawdzie opublikowano wyniki [36] opisujące regulację transkrypcji genów (dokładnie podjednostki RNA polimerazy III) przez miR-320 w hodowlach ludzkich komórek, jednak możliwość realizacji TGS za pośrednictwem endogennych RNA u ludzi pozostaje nadal kwestią sporną.

Wspomniane wyżej różne mechanizmy wyciszenia docelowego mRNA, polegające na zahamowaniu translacji, degradacji transkrypty czy zmianie struktury chromatyny, determinowane są rodzajem efektorowego kompleksu białkowo-rybonukleinowego (RNP), z którym dana klasa srRNA oddziałuje. I tak rozcięcie docelowej nici RNA odbywa się z udziałem kompleksu RISC (RNA-induced silencing complex), zahamowanie translacji wymaga kompleksu miRNP (microribonucleoprotein), a regulacja ekspresji genu przez wpływ na strukturę chromatyny jest realizowana w kooperacji z kompleksem RITS (RNA-induced transcriptional gene silencing) [52].

Głównym komponentem RNP jest białko z rodziny Argonaute/Piwi (Ago/Piwi). Ma ono budowę domenową, a poszczególne domeny pełnią istotne funkcje w realizacji interferencji RNA. Sąsiadująca z domeną N-końcową domena PAZ oraz środkowa MID, odpowiadają za wiązanie odpowiednio 3' i 5' końca interferującego RNA. Domena C-końcowa, Piwi, wykazuje aktywność RNazy H [75], a więc jest endonukleazą swoistą dla dsRNA [68]. Poszczególne białka z rodziny Argonaute wykazują nieco odmienne funkcje. W badaniach na *Drosophila* wykazano, że miRNA są preferencyjnie związane przez Ago1, co hamuje translację, natomiast siRNA uruchamiają degradację mRNA dzięki oddziałującemu z nimi Ago2 [21]. U ssaków rodzina Argonaute obejmuje osiem białek, podzielonych na dwie podrodziny: Ago oraz Piwi (występujące w komórkach zarodka) [26,48]. SiRNA są preferencyjnie związane przez Ago1 lub Ago2, natomiast miRNA wykorzystywać może każde z czterech Ago [70].

3. STRUKTURA I BIOGENEZA SRRNA

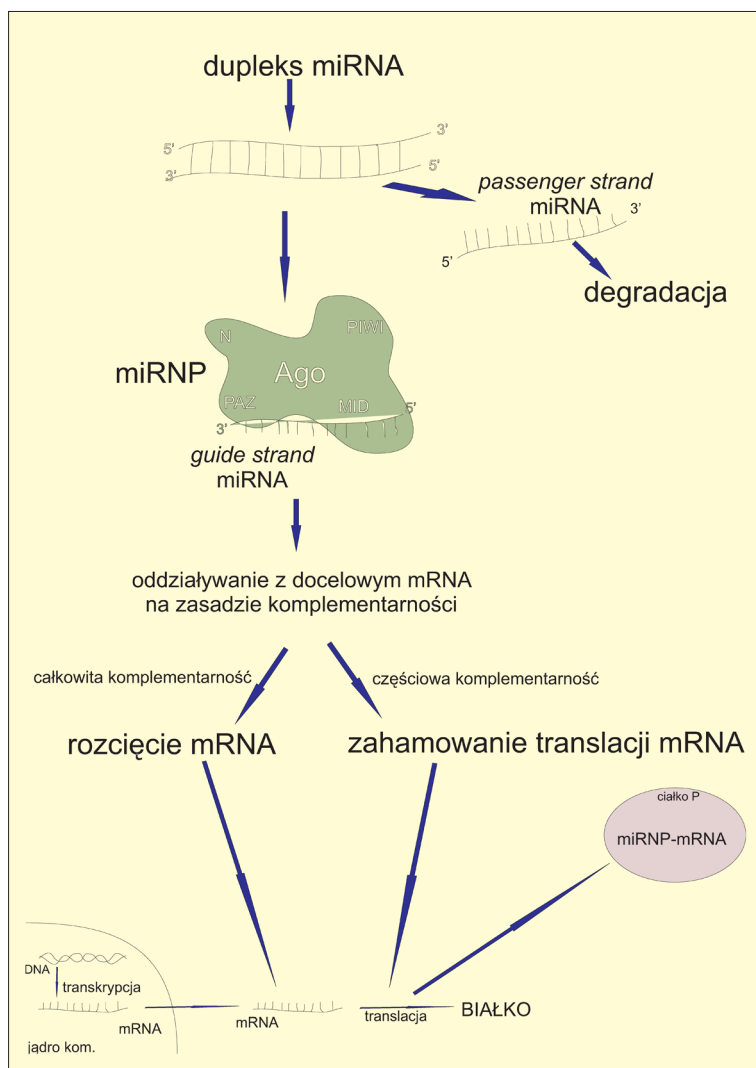
Oprócz wspomnianych wcześniej kryteriów podziału srRNA na klasy, jako dodatkowe wymienić można strukturę odcinka prekursorowego. W zależności od niej wyróżniamy dwie główne kategorie. Pierwsza, obejmująca miRNA (micro RNA) i siRNA (small interfering RNA), to RNA wywodzące się z odcinków dwuniciowego RNA. Do drugiej należą m.in. piRNA (Piwi-interacting small RNA) i niektóre rasiRNA (repeat-associated-siRNA), a ich prekursorem są transkrypty prawdopodobnie inne niż dwuniciowe [18]. Ze względu na przypuszczalnie niewielkie znaczenie u ssaków dwóch ostatnich klas, poniższy artykuł dotyczyć będzie miRNA oraz w mniejszym stopniu siRNA.

3.1 miRNA

miRNA charakteryzują się długością między 20 a 23nt, a ich formy prekursorowe (pri-miRNA) zakodowane są w genomie. Geny je kodujące mogą stanowić odrębne jednostki transkrypcyjne, ale najczęściej są elementem intronów genów kodujących białka. Od kilku lat wskazuje się ponadto na dodatkowe źródło miRNA, tzw. mirtony. Są to krótkie introny, z których miRNA generowane jest w sposób charakterystyczny dla mRNA, a więc w wyniku splicingu, niezależnego od enzymów katalizujących syntezę pozostałych miRNA [56]. Pierwotny transkrypt miRNA (pri-miRNA), o długości mogącej przekraczać 1000nt [12], generowany jest przez RNA polimerazę II w jądrze, a następnie podlega katalitycznej obróbce przez enzymy z klasy RNaz III. Na pierwszym etapie, katalizowanym przez rybonukleazę Drosha, powstaje 60–70-nukleotydowy pre-miRNA, o strukturze spinki do włosów, a więc zawierającej fragment dwuniciowy. Jest on transportowany do cytoplazmy w sposób aktywny (w obecności GTP) [4] z udziałem kompleksu białkowego o aktywności GTP-azy i zawierającego receptor dsRNA. U ssaków białkiem tym jest eksportyna 5 (Xpo5) [86]. W cytoplazmie rybonukleaza Dicer generuje dwuniciowy RNA, zawierający na końcu 3' dwa niesparowane nukleotydy. Jest on 19–23-nukleotydowym dupleksem, od którego jedna z nici (tzw. miRNA*) jest następnie uwalniana i zwykle degradowana przez białko ze wspomnianej wyżej rodziny Ago/Piwi, Ago2 [por. ryc. 3]. Druga nić, czyli dojrzały miRNA, tworzy hybrydę z kompleksem efektorowym RNP, która skanuje nić mRNA w poszukiwaniu docelowej sekwencji, przynajmniej częściowo komplementarnej do miRNA, w czym uczestniczy importyna P [54]. Częściowa komplementarność warunkuje możliwość wielokierunkowego działania jednego odcinka miRNA. Do prawidłowego połączenia między miRNA a mRNA niezbędna jest tylko komplementarność tzw. seed regionu, odcinka o długości 6–7 nukleotydów na 5' końcu miRNA do elementów rozpoznających miRNA (miRNA recognition elements – MREs) na 3' końcu mRNA [37]. Wiązanie to zależy jednak od wielu innych czynników, takich jak obecność i interakcje między wieloma MREs, drugorzędowa struktura docelowego mRNA, sekwencje AU czy bliskość kodonu "STOP" [47]. W zależności od stopnia dopasowania miRNA do mRNA różne są mechanizmy jego działania. Oddziaływanie miRNA-mRNA na zasadzie częściowej komplementarności prowadzi do zmniejszenia ekspresji białka przez zahamowanie translacji, po czym może dochodzić do degradacji mRNA, niezależnej od sekwencji nukleotydów, w ciałkach P (processing bodies) [15]. Proponowane są różne hipotezy dotyczące mechanizmu samej supresji translacji. Może ona być skutkiem bezpośredniego wiązania zabezpieczki m7G mRNA przez miRNP, co przez kompetycję z czynnikiem inicjującym eIF4E zmniejsza efektywność syntezy białka lub blokuje połączenie podjednostek rybosomów [15]. Inne możliwości inhibicji to destabilizacja mRNA przez jego deadenyllację, zahamowanie translacji już po jej rozpoczęciu bądź przedwczesna dysocjacja rybosomów [52]. Rzadziej, w przypadku całkowitej komplementarności miRNA do docelowego RNA, następuje swoiste względem sekwencji rozcięcie oraz degradacja mRNA, w którym to procesie, jak już wspomniano, udział bierze katalityczny komponent RNP, Ago2 [48] (ryc. 1).

Trzeba zaznaczyć, że miRNA może kontrolować ekspresję zarówno pojedynczych, kardynalnych dla danego procesu





Ryc. 1. Mechanizmy supresji ekspresji białka przez miRNA. Efektorowy kompleks białkowo-rybonukleinowy (miRNP) oddziałuje na określone sekwencje docelowe dzięki komplementarności miRNA do mRNA. W zależności od stopnia komplementarności dochodzić może do degradacji transkryptu, bądź supresji translacji. MRNA, których translacja została zahamowana, mogą być transportowane do ciałek P, gdzie są magazynowane lub podlegają nieswoistej degradacji

białek, jak i całych grup białek (np. zbędnych na danym etapie rozwoju organizmu). Może też oddziaływać na ekspresję pośrednio, przez kontrolę czynników transkrypcyjnych, a także przez wpływ na regulatory alternatywnego splicingu pre-mRNA.

3.2. siRNA

Drugą znaczącą klasą krótkich regulacyjnych RNA są siRNA. Przeważnie są one dostarczane do komórki z zewnątrz (jako cząstki wirusowe lub syntetyczne, wprowadzane eksperymentalnie) i włączane do szlaku aktywacji supresji na etapie katalizowanym przez rybonukleazę Dicer w cytoplazmie. siRNA pochodzenia endogennego charakteryzowano jako typowe dla roślin i *Caenorhabditis elegans*, aczkolwiek pojawiły się doniesienia o ich występowaniu i funkcjonowaniu w mysich oocytach [81]. Powstały z udziałem Dicer duplex siRNA składa się z nici antysensownej, tzw. guide strand, która odpowiada za jego supresyjną aktywność oraz nici sensownej, passenger strand.

3.3. tsRNA

Niedawno odkryto istnienie nowej klasy niekodujących RNA, są to tzw. tsRNA (tRNA-derived small RNA) [27].

Wywodzą się one z transkryptów tRNA, a w ich powstawaniu nie bierze udziału rybonukleaza Drosha. Generowany przez polimerazę III transkrypt tRNA podlega obróbce przez RNazy P i Z, tnące odpowiednio jego koniec 5' i 3'. tsRNA dzielą się na dwie klasy. tsRNA II jest produktem uwalnianym w wyniku cięcia przez RNazę Z, a tsRNA I powstają w cytoplazmie, w wyniku obróbki dojrzałego tRNA przez rybonukleazę Dicer. Obie klasy występują w cytoplazmie, gdzie mogą wchodzić w interakcje z białkami Argonaute. Wskazuje to na złożoność szlaków wyciszania przez RNA oraz możliwość kompetycji między poszczególnymi klasami krótkich RNA o komponenty tych szlaków, co implikuje nowe możliwości regulacji ich działania [27].

4. NOMENKLATURA miRNA

Ze względu na ciągły postęp badań nad microRNA – u człowieka opisano już ponad tysiąc miRNA – zaistniała potrzeba wprowadzenia ujednoliconego systemu nazewnictwa tych cząstek, a także utworzenia wiarygodnej bazy, katalogującej już opisane microRNA. Zapewnia to dynamicznie rozwijająca się miRBase, dostępna za pośrednictwem sieci internetowej (<http://microrna.sanger.ac.uk/>). Została podzielona na trzy działy, skrótoowo opisane niżej [23].

MiRBase Registry służy nadawaniu nazw nowym miRNA, po przyjęciu do druku publikacji po raz pierwszy je opisujących. Nowo odkryte miRNA podlega weryfikacji poprzez klonowanie genów je kodujących lub na podstawie doświadczalnych dowodów ich ekspresji i funkcjonowania. Zgodnie z oficjalną nomenklaturą nazwę konkretnego miRNA poprzedza trzyliterowy przedrostek, oznaczający gatunek, u którego opisuje się dany miRNA (np. hsa – *Homo sapiens* – dla ludzkich, mmu – *Mus musculus* – dla mysich miRNA). Sekwencje dojrzałego microRNA oznaczane są jako 'miR', jego prekursora zaś (pre-miRNA) – „mir”, po czym następuje oznaczenie liczbowe (np. miR-150), przy czym numer tego samego miRNA pozostaje niezmienny bez względu na gatunek, u którego występuje. Niewielkie różnice w budowie miRNA mogą być zaznaczone np. dodaniem na końcu litery lub liczby (np. miR-13a, miR-13b). W przypadku powstawania dwóch różnych miRNA z jednego odcinka dsRNA wprowadza się dodatkowe oznaczenia – np. miR-17-5p dla miRNA powstającego na bazie nici 5', a miR-17-3p dla powstającego na bazie nici 3'. Ponadto zarówno dojrzałym odcinkom miRNA jak i ich prekursorom – pre-miRNA w MiRBase nadawane są niezmiennie numery (np. odpowiednio: MIMAT0000029 i MI0000015), co umożliwia poprawną identyfikację w przypadku zmiany nazwy samego miRNA, spowodowanej nowymi odkryciami.

Baza **miRBase Sequence** stanowi zbiór sekwencji wszystkich opisanych dojrzałych miRNA, zawiera także prawdopodobną sekwencję odpowiedniego pre-miRNA i informacje dotyczące jego odkrycia, struktury i funkcji. Baza kataloguje zarówno dojrzałe miRNA, doświadczalnie zbadane i opisane (z odnośnikami do prac źródłowych), jak i miRNA homologiczne do tych opisanych doświadczalnie u innych gatunków (na podstawie m.in. podobieństwa sekwencji, cech pre-miRNA, konserwatywności dojrzałego miRNA). W przypadku organizmów o zsekwencjonowanych genomach dostarczane są również informacje na temat pozycji badanego miRNA w genomie (dokładne położenie w zakresie intronu bądź eksonu). Często też uzyskujemy odnośnik do informacji na temat sekwencji docelowych dla interesującej nas cząstki miRNA.

Trzecią składową MiRBase jest **microCosm**, platforma umożliwiająca określenie sekwencji docelowych dla badanych miRNA. Dopasowywanie miRNA-mRNA odbywa się z użyciem algorytmu miRanda [23].

5. MIĘDZYKOMÓRKOWY TRANSPORT SRNA

Kolejnym przedmiotem zainteresowania są sposoby międzykomórkowego przekazywania informacji zawartych w kwasie rybonukleinowym [3]. U *C. elegans* odkryto gen Sid-1, kodujący białko przezbłonowe, tworzące por transportujący dsRNA [82]. Homologi tego genu opisano także u ludzi i innych ssaków, brak ich jednak u *Drosophila melanogaster*. Jednocześnie opisano działanie pozakomórkowego dsRNA u tej muszki, co może sugerować, że transportujące białko przezbłonowe nie jest jedynym sposobem międzykomórkowego przenoszenia informacji zawartej w RNA [11]. Możliwa jest komunikacja przez nanorurki, łączące cytoplazmy sąsiadujących komórek. Rurki te mogłyby hipotetycznie transportować pęcherzyki endosomalne zawierające kwasy nukleinowe.

5.1. Transport za pośrednictwem pęcherzyków błonowych

Egzosomy i mikropęcherzyki wydzielane przez, jak się wydaje, wszystkie komórki są uznawane za ważny komponent komunikacji międzykomórkowej. Ich źródłem mogą być prawdopodobnie wszystkie komórki, w tym zarówno komórki macierzyste i leukocyty, jak i płytki krwi oraz komórki guza nowotworowego [3]. Realizują one swoją funkcję przez transport bioaktywnych lipidów, białek oraz mRNA. Zaczęto je nawet nazywać „fizjologicznymi liposomami”, o możliwym wykorzystaniu w celach terapeutycznych. Komunikacja poprzez wydzielanie kwasów rybonukleinowych upakowanych w pęcherzykach błonowych (egzosomach) została już opisana m.in. dla zarodkowych komórek macierzystych, mastocytów i komórek z tkanki guza. Zarodkowa komórka macierzysta wydzielala egzosomy zawierające swoiste mRNA, transportowane następnie do komórek progenitorowych układu hematopoetycznego i stymulujące w nich określone zmiany fenotypowe [62]. Opisano też mikropęcherzyki wydzielane przez tkankę guza, transportujące mRNA do monocytów w bezpośrednim sąsiedztwie guza, aktywujące je do wydzielania cytokin nasilających wzrost guza i tłumiących odpowiedź immunologiczną [1]. Odkryto również, że mRNA zawarte w egzosomach wydzielanych przez mastocyty stanowi określony, wyselekcjonowany zestaw rybonukleotydów. Ten materiał genetyczny ulega ekspresji nawet w znacznie oddalonych komórkach-biorcach, wywołując w nich określone zmiany fenotypowe. Co więcej, egzosomy te zawierają też cząstki miRNA [77]. Postawiono hipotezę, że mikropęcherzyki obecne we krwi obwodowej w warunkach fizjologicznych zawierają miRNA, co związane jest z ich funkcją w komunikacji pomiędzy komórkami różnych tkanek i indukcji w nich zmian ekspresji genów [30]. Mikropęcherzyki izolowane z osoka ludzkiej krwi pochodziły głównie z płytek krwi, ale też z fagocytów jednojądrowych, a w mniejszym stopniu z limfocytów T, neutrofilii i komórek endotelialnych. Przeprowadzone profilowanie miRNA wyizolowanego z mikropęcherzyków w porównaniu do tego izolowanego z jednojądrowych komórek krwi obwodowej (peripheral blood mononuclear cells – PBMC) wykazało pewne różnice w poziomie ekspresji poszczególnych cząstek miRNA. Główne miRNA wykryte w mikropęcherzykach krwi obwodowej to: miR-223, -484, -191, -146a, -16, -26a, -222, -24, -126, i -32, natomiast w PBMCs: miR-150, -146b, -19b i -20a. Oprócz tych różnic zauważono, że pewne miRNA (miR-223, -484, -191, -146a, -16 i -26a) są wspólne dla mikropęcherzyków i PBMC. Możliwe, że miRNA w mikropęcherzykach jest transportowane do ściśle określonych tkanek. miRNA przeważające w mikropęcherzykach pod względem swej funkcji związane były z regulacją hematopoezy i różnicowania komórek [30]. Nie do końca poznane są jeszcze mechanizmy kontrolujące tworzenie i wydzielanie egzosomów. Istnieją sugestie, że pęcherzyk tworząc się „porywa” przypadkową część cytoplazmy; inne mówią o regulacji tworzenia pęcherzyków przez sam proces kolejności tworzenia endosomów (endosomal trafficking). Selekcja miRNA do mikropęcherzyka może się odbywać z udziałem ciałek P (P-bodies), które w cytoplazmie komórki są umiejscowione w sąsiedztwie miRNA [30]. Dostarczono też dowodów na możliwość międzykomórkowego transportu miRNA za pośrednictwem mikropęcherzyków. Inkubowano egzosomy



Tabela 1. Wpływ interferencji RNA na funkcjonowanie układu immunologicznego; przykłady różnych punktów uchwytu miRNA

miRNA	Komórki	Cząstka docelowa	Funkcja cząstki docelowej	Znaczenie interferencji
miR17~92	limfocyty T i B	BIAŁKO PROAPOPTOTYCZNE Bim	stymulacja apoptozy	regulacja rozwoju limfocytów T i B
miR17-5p, miR20a, miR106	monocyty	Podjednostka CZYNNIKA TRANSKRYPCYJNEGO AML1	wzrost ekspresji receptora dla M-CSF	regulacja dojrzewania i różnicowania monocytów
miR181a	limfocyty T	ENZYMY fosfatazy (f. tyrozynowe: SHP-2, PTPN22, DUSP5, DUSP6)	negatywna regulacja szlaku aktywacji TCR przez defosforylację białek	regulacja aktywności limfocytów T
miR146a, miR146b	makrofagi	CZĄSTKI ZWIĄZANE Z RECEPTORAMI CYTOKIN IRAK1, IRAK2, TRAF6	transdukcja sygnału aktywacji zapalnej	regulacja nieswoistej odpowiedzi immunologicznej po stymulacji TLR-2,4,5
miR16	monocyty neutrofile limfocyty T limfocyty B	CYTOKINY bogate w sekwencje AU TNF- α , IL-8, IL6	odpowiedź zapalna	kontrola wydzielania cytokin prozapalnych

AML-1 – acute myeloid leukaemia-1 (znany też jako RUNX1); M-CSF – macrophage colony-stimulating factor; IRAK-1 – interleukin-1 receptor-associated kinase 1; TRAF-6 – TNF receptor-associated factor 6.

wydzielane przez zarodkowe komórki macierzyste (ESMV) z tymi zarodkowymi fibroblastami (MEFs), uprzednio poddany napromieniowaniu γ (zahamowanie rozwoju). Porównanie poziomu miRNA w MEFs z tym w MEFs inkubowanych z ESMVs wykazało wzrost stężenia miR-290, miR-291-3p, miR-292-3p, miR-294 i miR-295, co sugerowało ich międzykomórkowy transfer. Trzeba jednak dodać, że nie wszystkie badane miRNA były przenoszone z tą samą efektywnością, najbardziej znaczące efekty obserwowane były dla miRNA występujących obficie w zarodkowych komórkach macierzystych, ale nie w MEFs. Prawdopodobnie więc transfer miRNA jest procesem aktywnym, podlegającym regulacji przez białka obecne w mikropęcherzykach bądź przez receptory na powierzchni komórek-biorców. Kontrola może być również realizowana przez swoje komórkowo nukleazy – tak więc stężenie „wszędobylskiego” miR-16, w przeciwnieństwie do miRNA charakterystycznego dla zarodkowych komórek macierzystych, w mysich zarodkowych fibroblastach jest utrzymywane na określonym poziomie [87].

Ostatnie badania sugerują ponadto, że miRNA transportowany między komórkami w mikropęcherzykach jest aktywny biologicznie [88]. Testowano mikropęcherzyki wydzielane przez komórki ludzkiej linii MON/Mf (THP-1). W odpowiedzi na bodźce zapalne komórki te selektywnie upakowywały i wydzielały w pęcherzykach miR-150. MikroRNA to pełni swą funkcję poprzez supresję czynnika transkrypcyjnego c-Myb, odgrywającego rolę w regulacji proliferacji, różnicowania i migracji komórek [83]. Celem zdefiniowania wpływu miR-150 przekazywanego w pęcherzykach, inkubowano THP-1 z ludzkimi komórkami śródbłonka (HMEC-1). W komórkach tych zaobserwowano znaczny wzrost miR-150, który nie korelował ze wzrostem pre-miR150, z czego wnioskować można, że jest to skutkiem internalizacji pęcherzyków, a nie pobudzenia ekspresji endogennego miR-150. Egzogenny miR-150 zmniejszał ekspresję c-Myb w komórkach-biorcach,

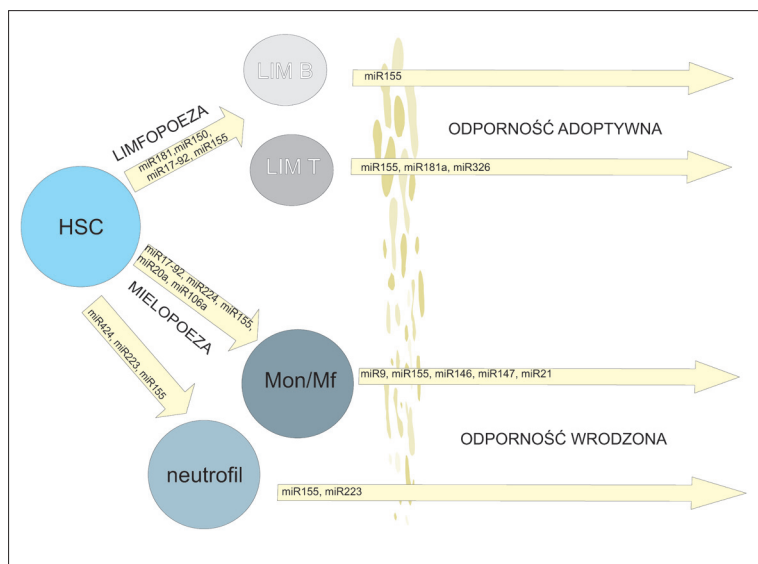
wymiernym wynikiem tego było zwiększenie zdolności migracji HMEC-1.

6. ROLA miRNA W REGULACJI FUNKCJONOWANIA UKŁADU IMMUNOLOGICZNEGO

Supresja (za pośrednictwem syntetycznych antagomirów – sekwencji antysensownych dla miRNA, swoistych inhibitorów działania miRNA) lub nadekspresja (przez transfekcję syntetycznego miRNA bądź ekspresję pre-miRNA z plazmidów lub wektorów wirusowych) określonych miRNA oraz badania na organizmach knock-outowych (pozbawionych genów dla danych miRNA) umożliwiają scharakteryzowanie funkcji poszczególnych cząstek regulacyjnego RNA, a w konsekwencji poznawane są sekwencje dla nich docelowe, mechanizm aktywacji supresji, sposób jej realizacji. Dostrzegane są związki między zaburzeniami działaniem immunoregulacji przez RNA a procesami nowotworzenia i autoimmunizacji. W przyszłości planuje się szerokie terapeutyczne wykorzystanie sztucznie syntetyzowanych, swoistych siRNA.

W ostatnim czasie opisywane jest wielopłaszczyznowe oddziaływanie miRNA na elementy układu odpornościowego człowieka. MiRNA jest ważnym regulatorem rozwoju, różnicowania i apoptozy poszczególnych linii komórek układu immunologicznego, bierze udział w kontroli zarówno odporności wrodzonej jak i nabytej. Dotychczas opisano ponad 100 odrębnych miRNA regulujących ekspresję genów w komórkach układu immunologicznego [54].

Funkcja miRNA w układzie immunologicznym realizuje się głównie przez wpływ na czynniki transkrypcyjne, białka proapoptotyczne, elementy szlaków związanych z transdukcją sygnału, a w mniejszym zakresie na kofaktory i modulatory chromatyny (tab. 1). Białka pozostające pod kontrolą miRNA są najważniejszymi dla procesów komórkowych, stąd nawet niewielka zmiana ich poziomu



Ryc. 2. Wpływ miRNA na rozwój i funkcjonowanie komórek układu immunologicznego. Na podstawie [2,47] zmodyfikowano

powoduje znaczące skutki biologiczne. Ponadto jeden miRNA może kontrolować wiele różnych mRNA (najczęściej biorących udział w jednym szlaku regulacyjnym), a jedno mRNA może mieć miejsca wiążące kilka różnych miRNA [84], co wskazuje na plejotropizm jako cechę regulacji przez miRNA. Istnieje więc możliwość kompensacji zaburzeń działania jednego z miRNA kontrolujących ekspresję danego odcinka mRNA przez inne o tym samym punkcie uchwytu. Kontrola przez miRNA charakteryzowana jest także tzw. „efektem dawki”. Zgodnie z tym efektem, skutki nieprawidłowości w funkcjonowaniu poszczególnych miRNA kontrolujących dany proces mają różne nasilenie, a w przypadku defektu więcej niż jednego miRNA mogą się kumulować. miRNA często są też ze sobą powiązane w funkcjonalne grupy (klastery), kontrolujące wiele składowych jednego procesu bądź pojedyncze składowe kilku powiązanych ze sobą szlaków. Odrębne miRNA mogą także ulegać koekspresji i kontrolować dany proces w sposób kooperacyjny [84].

Niżej pokrótce scharakteryzowano główne obszary aktywności miRNA w układzie immunologicznym [47].

6.1. Wpływ miRNA na rozwój komórek układu immunologicznego

MiRNA pełnią istotną funkcję w regulacji rozwoju, różnicowania i apoptozy komórek układu immunologicznego [2] (ryc. 2). Do cząstek odgrywających znaczną rolę w rozwoju limfocytów T i B należą takie miRNA jak miR-150, miR-181a i klaster miR17~92. MiRNA biorą udział w regulacji rozwoju komórek immunologicznych wykazując zróżnicowaną ekspresję w grasicy i szpiku. Mechanizm ich działania często opiera się na wpływie na czynniki transkrypcyjne lub białka proapoptotyczne. Ich ekspresja aktywuje przeżywalność komórek, co w przypadku somatycznych mutacji i amplifikacji miRNA może prowadzić do ekspansji określonej populacji komórek, wzrostu prawdopodobieństwa akumulacji mutacji i transformacji nowotworowej (białaczki i chłoniaki) [85].

Należące do policistronowego klasteru miR-17~92 cząstki, takie jak miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1,

miR-92-1, biorą udział w regulacji rozwoju limfocytów B. Limfocyty pre-B wykazują wysoką ekspresję miR-17~92, co nasila ich proliferację przez inhibicję cząstki supresorowej Pten oraz hamuje ich apoptozę przez zmniejszenie stężenia proapoptycznego białka Bim [79,85]. Zaobserwowano, że region chromosomu 13, w którym znajdują się geny kodujące te miRNA ulega zwielokrotnieniu w chłoniakach z limfocytów B [57], a nadekspresja tych genów u myszy wywołuje ten nowotwór [28]. Badania na organizmach KO z usuniętymi genami klasteru miR-17~92 i rybonukleazy Dicer pozwoliły stwierdzić, że nieprawidłowości w rozwoju limfocytów B pojawiają się na etapie przejścia z fazy pro-B do pre-B [39,79]. Organizmy z tym defektem wykazują zmniejszoną przeżywalność, związaną z hipoplazją płuc i wadą zastawki międzykomorowej [79].

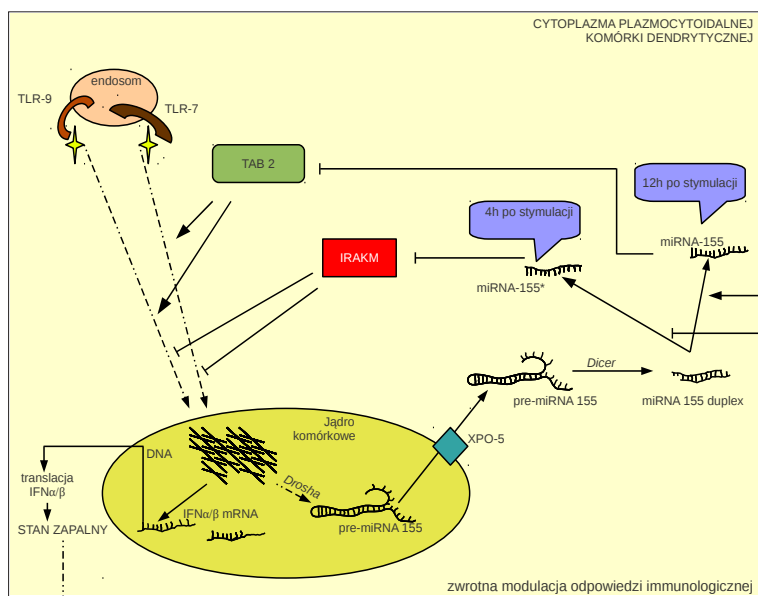
Rolę pozytywnego regulatora rozwoju limfocytów B odgrywa również miR-181. Stymuluje on różnicowanie komórki prekursorowej szeregu limfoidalnego w kierunku limfocyta pro-B [10]. Dodatkowo miR-181 wpływa na odporność nabytą [46], wywierając aktywujący wpływ na funkcję limfocytów T (por. 6.2.1).

Na rozwój limfocytów B znaczący wpływ ma ponadto miR-150, regulujący poziom czynnika transkrypcyjnego *c-Myb*. Jego zwiększona ekspresja blokuje rozwój tych komórek na etapie pro-B, zmniejszona zaś wiąże się z rozwojem przewlekłej białaczki limfocytarnej [89].

Uzyskano również dowody na udział miR-17~92 w rozwoju limfocytów T. Stymulacja tego klasteru, tak w przypadku wspomnianych wcześniej limfocytów B, jak i T, prowadzi do rozwoju chorób limfoproliferacyjnych i autoimmunizacji, przy czym wykazuje się nie tylko wzrost liczby aktywowanych limfocytów B, lecz także – nawet bardziej znaczny – wzrost liczby aktywowanych limfocytów T CD4⁺ i w mniejszym stopniu T CD8⁺ [85]. Promocja różnicowania na etapie pre- do pro- zarówno w linii B jak i T jest wynikiem nasilonej proliferacji oraz przeżywalności (przez supresję białek proapoptotycznych) komórek.

Głównym miRNA kontrolującym rozwój, różnicowanie i funkcję komórek mieloidalnych jest miR-223. Jego małe





Ryc. 3. Regulacja wydzielania cytokin prozapalnych przez miR155 jest wypadkową kooperacji obu nici powstających z cząstki prekursorowej, miRNA-155 i miRNA155*. W odpowiedzi na stymulację receptorów TLR-7 i TLR-9 w jądrze komórkowym stymulowana jest transkrypcja mRNA cytokin prozapalnych oraz prekursora regulatorowego RNA – pre-miRNA 155. Na pierwszym etapie przeważa ekspresja miR-155*, który poprzez supresję IRAKM aktywuje wydzielanie IFN- α/β . W miarę upływu czasu stosunek miR155*/miR155 wzrasta, osiągając najwyższy poziom około 12 h od aktywacji, kiedy to miR155 poprzez inhibicję Tab2 hamuje syntezę IFN- α/β ; strzałkami nieciągłymi zaznaczono procesy wieloetapowe, których przebiegu nie uwzględniono na schemacie

stężenie obserwowane jest w komórkach zarodkowych i progenitorowych układu hematopoetycznego, a nasiloną ekspresja w komórkach progenitorowych linii mieloidalnej, ze wzrostem stężenia w miarę różnicowania się komórek. Wskazuje to, że miR-223 jest regulatorem granulopoezy [10,34]. U myszy pozbawionych genu miR-223 spodziewano się więc braku granulocytów. Wykazano u nich jednak dwukrotny wzrost liczby granulocytów (w stosunku do zwierząt wild type), przy czym komórki te wykazywały zwiększoną reaktywność, co powodowało zmiany zapalne, prowadzące do uszkodzenia tkanki płuc oraz rozwoju ostrego stanu zapalnego w obrębie wątroby, mięśni i nerek [34]. Działanie miR-223 realizowane jest przez supresję czynnika transkrypcyjnego mef2c, promującego proliferację prekursorów linii mieloidalnej lub receptora IGF [34]. Zablockowana translacja mef2c prowadzi do rozregulowania mielopoezy.

MiR-17-5p, miR-20a, miR-106a, należące do klasteru miR-17~92, są aktywnymi regulatorami różnicowania i dojrzewania monocytów. Pozostają one w pętli ujemnego sprzężenia zwrotnego z białkiem AML-1. Białko to jest wiążącą DNA podjednostką czynnika transkrypcyjnego, zwiększającego na monocytach ekspresję receptora M-CSF, a także innych cytokin (IL-3, GM-CSF) [19].

6.2. Wpływ miRNA na funkcjonowanie komórek układu immunologicznego

Opisany wyżej wpływ miRNA na rozwój komórek układu immunologicznego jest pośrednim czynnikiem regulującym immunologiczną odpowiedź wrodzoną jak i nabytą. Ponadto istnieją inne poziomy kontroli odpowiedzi odpornościowej organizmu przez miRNA [2] (ryc.2).

6.2.1. Wpływ miRNA na odporność wrodzoną

Za regulację odporności wrodzonej odpowiadają m.in. miR-146 i miR-155. Aktywacja nieswoistej odpowiedzi immunologicznej prowadzi do gwałtownych zmian ich ekspresji. Funkcją tych mikroRNA jest regulacja ostrej odpowiedzi zapalnej (uwalniania IL-8 i RANTES). Dzieje się

to na skutek zahamowania ekspresji białek związanych z przekazywaniem sygnału w toku odpowiedzi immunologicznej po aktywacji TLR, bądź poprzez bezpośredni wpływ na translację białek mediatorów zapalenia (np. IL-8, TNF- α , RANTES).

Wykazano, że aktywacja TLR-2, -4, -5 przez fragmenty ścian komórkowych bakterii lub grzybów, bądź ekspozycja komórki na cytokiny prozapalne (IL-1 β , TNF- α) powoduje wzrost ekspresji miR-146a i b. Jako punkty uchwytu dla tych miRNA zaproponowano białka powiązane z receptorami IL-1 (IRAK1, IRAK2) i TNF (TRAF6). Wnioskować można, że wzrost ekspresji miR-146 prowadzi będzie do spadku ekspresji tych molekuł, a więc na skutek ujemnego sprzężenia zwrotnego hamować aktywację TLR. Zwiększenie ekspresji miR-146a obserwuje się jednak tylko przy znacznym stężeniu IL-1, kiedy jest to niezbędne dla zapobieżenia nadmiernemu rozprzestrzenianiu ostrego stanu zapalnego [60]. MiR-146a pełni więc rolę w rozwoju tolerancji na endotoksyny; ekspozycja na LPS prowadzi do spadku wrażliwości komórek immunologicznych i obniżenia sekrecji cytokin prozapalnych przy kolejnym z nim kontakcie.

Stymulacja TLR-2 bądź TLR-4 ich odpowiednimi ligandami: lipoproteiną i lipopolisacharydem powoduje też wzrost ekspresji miR-155 w monocytach i makrofagach. Poziom miR-155 w tych komórkach wzrasta również po rozpoznaniu nukleotydów bakteryjnych lub wirusowych przez TLR-3 i TLR-9. W przeciwieństwie do miR-146a, miR-155 nasila (por. niżej) wydzielanie cytokin prozapalnych i podatność na szok septyczny [74]. Cząstka ta jest też stymulatorem proliferacji granulocytów i monocytów. Utrzymujące się podwyższone stężenie tego miRNA w komórkach szpiku kostnego po stymulacji LPSEM może prowadzić do ekspansji komórek typu granulocyt/monocyt i rozwoju ostrej białaczki szpikowej. Może to sugerować, że istotny związek między stanem zapalnym a nowotworzeniem ma swoją przyczynę w chronicznie nasilonej ekspresji miR-155 [55].

Dodać należy, że choć pewne miRNA mogą mieć działanie onkogenów (miR17~92, miR155), inne (miR15a, miR16, miR29ab, miR181b), poprzez supresję onkogenów i białek

ułatwiających przeżywanie komórek nowotworowych, działającą jak supresory nowotworów [12,54].

Jak wcześniej wspomniano, w trakcie biogenezy miRNA jego komplementarna nić jest najczęściej degradowana. Wykazano jednak, że regulacja stężenia cytokin prozapalnych po stymulacji TLR-7 plazmocytoidalnych komórek dendrytycznych jest wynikiem kooperacji między miR155 a jego partnerem, miR155* (ryc. 3). Zaobserwowano, że poziom miR155* jest najwyższy w czwartej godzinie od stymulacji, co koreluje ze wzrostem wydzielania IFN- α/β . Jest to spowodowane supresją kinazy hamującej szlak aktywacji TLR, IRAKM, przez miR155*. Ekspresja miR155 natomiast nasila się znacznie wolniej, osiągając maksimum po dwunastu godzinach od stymulacji, w chwili ograniczania toczącej się odpowiedzi zapalnej. MiR155 hamując translację cząstki adaptorowej TAB2, niezbędnego elementu szlaku aktywacji TLR, przyczynia się do zmniejszenia wytwarzania IFN- α/β [90]. Trzeba również zaznaczyć, że w badanym modelu na 174 wykrytych miRNA przypadło 33 miRNA*, z czego w 9 przypadkach nie towarzyszyły im odpowiednie cząstki RNA, co wskazuje, że chociaż miRNA występuje w przewodzie, to miRNA* może uniknąć degradacji i brać istotny udział w regulacji syntezy białek, często w kooperacji z komplementarnym miRNA.

Ponadto opisano także miRNA będące konstytutywnym regulatorem stanu zapalnego – miR-16. Duże stężenie tego mikroRNA obserwowany jest w wielu tkankach i komórkach zaangażowanych w stan zapalny: monocytach, neutrofilach, a także limfocytach B, limfocytach T CD4⁺, jak i T CD8⁺. Jego działanie realizuje się przez szybką degradację białek mediujących stan zapalny, takich jak IL-6, IL-8, TNF- α . Jest to możliwe dzięki podobieństwu budowy tych cytokin: bogatych w sekwencje AU struktur na ich końcu 3', komplementarnych do sekwencji na 5' końcu miR-16 [33].

6.2.2. Wpływ miRNA na odporność adocytną

Regulacja immunologicznej odpowiedzi nabytej przez RNA realizuje się m.in. przez wspomniane wyżej miR-155 i miR-181a. Wpływają one na wytwarzanie przeciwciał, uwalnianie mediatorów zapalenia, a w końcu odgrywają rolę w rozwoju i różnicowaniu komórek immunologicznych (por. 6.1). W przeciwieństwie jednak do odporności wrodzonej nie ma dowodów na to, że aktywacja szlaków TCR i BCR wpływa na odpowiedź limfocytów T i B poprzez zmiany ekspresji odpowiednich miRNA.

Oprócz wspomnianej wcześniej roli miR-155 w regulacji odpowiedzi wrodzonej, pełni on również główną rolę w regulacji odpowiedzi limfocytów T i B. Jego nadekspresję obserwuje się w chłoniakach pochodzenia B limfocytarnego, co nasunęło przypuszczenia, że miR-155 jest regulatorem rozwoju tych komórek [17]. Badania na myszach knock-out dla tego miRNA wykazały znaczne niedobory odpornościowe, ujawniające się obniżoną ochroną przeciwbakteryjną. Ma to związek z wpływem miR-155 na funkcje limfocytów B: wytwarzanie IgG1 o dużym powinowactwie oraz na rozwój pamięci immunologicznej komórek B [73,80]. Ponadto miR-155 wpływa na różnicowanie limfocytów T. Jego punktem uchwytu jest czynnik transkrypcyjny IL-2, cytokiny podstawowej dla różnicowania

w kierunku Th1. Brak miR-155 promuje rozwój naiwnych komórek T w kierunku typu Th2 i związane z tym wytwarzanie takich cytokin jak IL-4, IL-5, IL-10. Następnym jest nieprawidłowe działanie limfocytów T w ostrej odpowiedzi zapalnej, wyrażające się zmniejszoną sekrecją IL-2 i IFN- α w odpowiedzi na antygen [64].

Aktywujący wpływ na funkcję limfocytów T wywiera miR-181a. Poprzez zahamowanie aktywności fosfataz, w tym tych będących negatywnymi regulatorami szlaku aktywacji TCR, nasila sygnał aktywacji TCR i obniża próg aktywacji limfocytów T [46].

6.2.3. Udział miRNA w realizacji funkcji komórek supresyjnych

Integralność mechanizmów generujących miRNA w limfocytach regulacyjnych (supresyjnych) warunkuje ich skuteczność w kontrolowaniu odpowiedzi immunologicznej. Wykazano, że selektywny knock-out rybonukleazy Dicer w komórkach Treg Foxp3⁺ prowadzi do ich dysfunkcji, co ujawnia się odblokowaniem kontroli limfocytów efektorowych i systemową aktywacją reakcji autoimmunologicznych [91]. Badania te wskazują, że funkcja limfocytów supresyjnych jest związana z miRNA, nie dają jednak odpowiedzi, jaki jest jej mechanizm – czy miRNA wytworzone w danej komórce działają w jej obrębie, regulując aktywność supresyjną, czy też są eksportowane poza komórkę i na zasadzie parakrynej lub endokrynej wpływają hamująco na komórki docelowe. Odpowiedź na to pytanie dać mogą ostatnie badania Bryniarskiego i wsp.

Zespół ten prowadzi badania nad supresją komórkowej odpowiedzi immunologicznej przez interferencyjny, niskocząsteczkowy RNA. Przedmiotem zainteresowania jest nadwrażliwość kontaktowa (CS), będąca postacią nadwrażliwości typu późnego (DTH).

Mechanizm CS, jak każdy inny mechanizm immunologiczny, niesie ze sobą ryzyko uszkodzenia zdrowych tkanek organizmu, a więc musi pozostawać pod kontrolą obwodów regulacyjnych. Początkowo uznawano, że funkcję tę realizuje specjalna klasa limfocytów T, tzw. limfocyty supresyjne (Ts) o fenotypie CD8⁺. Obecnie wiadomo, że jako komórki supresyjne mogą działać także limfocyty CD8⁺CD28⁻, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻, komórki NKT, a także monocyty i makrofagi. Mogą one działać zarówno w procesie sekrecji cytokin o charakterze hamującym (np. TGF- β), cytotosycyzności względem komórek docelowych, jak i poprzez indukcję ich apoptozy [59,76].

Stosując mysi model nadwrażliwości kontaktowej na hapteny Bryniarski i wsp. wykazali, że limfocyty węzłów chłonnych i śledzion zwierząt poddanych dożylnemu oraz następującemu po nim naskórnemu uczuleniu określonym haptentem uwalniają tzw. czynnik supresyjny limfocytów T (TsF) [5]. Ma on zdolność hamowania funkcji efektorowych limfocytów reakcji CS – supresji reakcji alergicznej. Kompletny TsF składa się z dwóch komponentów [61]. Składowa powstająca po naskórnej immunizacji myszy haptentem ma swoistość antygenową, a wytwarzana jest przez limfocyty B1 i jest przeciwciałem IgM lub jego fragmentem [71]. Druga składowa, odpowiadająca za właściwe działanie regulacyjne, indukowana jest dożylnym



podaniem znakowanych haptenu syngenicznego erytrocytów. Metodą enzymatycznej degradacji stwierdzono, że supresyjny komponent TsF stanowi RNA. TsF inkubowany *in vitro* z haptenuoswoistymi uczulonymi limfocytami efektorowymi powoduje, przy transferze tych komórek do naiwnych myszy [5], zmniejszenie reakcji nadwrażliwości kontaktowej o 50–90%. Przez zastosowanie chromatografii na kolumnach Qiagen uzyskano czysty, aktywny RNA czynnika, TsF QRNA. Czynniki supresyjne wrażliwe jest na trawienie RNazą A, traktowany DNazą natomiast zachowuje swe działanie, a izolat DNA nie wykazuje żadnych właściwości supresyjnych [5]. Kolejnym krokiem było poznanie struktury RNA w TsFQRNA. Jego aktywność znoszona jest przez RNazę III, co świadczy o tym, że jest to dwuniciowy kwas rybonukleinowy. Rozdział elektroforetyczny TsFQRNA na sekwencyjnym żelu poliakrylamidowym doprowadził do uzyskania pięciu prążków, z których dwa (stanowiące faktycznie jeden duży), wykazują aktywność immunosupresyjną. Szczegółowe badania wykazały, że ten supresyjny odcinek RNA ma 75–80 zasad [6], a analiza bioinformatyczna wskazuje, że badaną cząstką może być miR150 lub jego prekursor [Askenase i wsp., dane nieopublikowane]. Wykazaliśmy, że egzozomy wyizolowane z supernatantów komórek wytwarzających TsF mają właściwości supresyjne. Podsumowując, badany przez nas TsF może być cząstką krótkiego, regulacyjnego RNA (miR150), transportowanego z komórki supresyjnej do efektorowej w postaci egzosomów [7].

6.3. Transfer factor

Mimo że większość prac charakteryzujących miRNA została opublikowana w ostatnich latach, przesłanki o możliwości regulacji odpowiedzi immunologicznej przez RNA pojawiły się już w latach pięćdziesiątych XX w. Opisano wtedy tzw. transfer factor (TF), czynnik izolowany z leukocytów zwierząt uczulonych, zdolny do przenoszenia informacji immunologicznej (w tym wypadku nadwrażliwości kontaktowej) na osobniki naiwne. Oznacza to, że już pierwszy kontakt z antygenem osobnika, który uprzednio otrzymał TF umożliwia wywołanie u niego wtórnej odpowiedzi immunologicznej. Zjawisko to było odtwarzalne w wielu reakcjach typu komórkowego, np. w uczuleniu białkami bakteryjnymi czy haptenuami [32,41]. Wykazano, że transfer factor jest odporny na trawienie DNazą, trzustkową RNazą (rozkładającą jednoniciowy RNA) i trypsyną [42], a także że jest cząstką na tyle małą, że przechodzi przez błonę dializacyjną, nie może więc być ani białkiem, ani cząstką je kodującą [43]. Kolejnym krokiem były prace Dresslera i Rosenfelda z lat siedemdziesiątych. Badali oni transfer factor uzyskiwany w systemie podwójnego naskórnego uczulenia świnek morskich haptenuami: DNCB (dinitrochlorobenzen) i OCBC (ortodichlorobenzen). Czynniki te wykazywały aktywność w przenoszeniu nadwrażliwości kontaktowej na naiwnych biorców, wywołując u nich odpowiedź wtórną już po pierwszym kontakcie z antygenem. Co ważne, nie wykazano reaktywności krzyżowej – transfer factor od zwierząt uczulonych DNCB przekazywał wrażliwość na DNCB, ale nie na OCBC i na odwrót – reakcja ta była więc swoista antygenowo. Ponadto nasilenie wtórnej reakcji immunologicznej u biorców TF było zależne od dawki tego czynnika [65]. W kolejnych testach badacze starali się ustalić budowę chemiczną TF [16]. Ustalili, że jego aktywność nie jest znoszona przez DNazę,

trzustkową RNazę i T1 RNazę (oba te enzymy rozkładają jednoniciowy RNA) oraz proteazę. Natomiast trawienie RNazą III (swoistą dla dwuniciowych RNA) powodowało brak oczekiwanej aktywności TF, co nasunęło wniosek, że przynajmniej w części, TF składa się z niskocząsteczkowego, dwuniciowego RNA. Badania termowrażliwości czynnika przyniosły tego potwierdzenie; TF ulegał inaktywacji w temperaturze 90°C, a więc charakterystycznej dla rozkładu dwuniciowego RNA. Już wtedy sugerowano, że działanie kwasu rybonukleinowego może się realizować przez jego komplementarność do represorów transkrypcji białka bądź do określonego odcinka DNA, aktywując jego transkrypcję.

W latach 70. i 80. ub.w. przeprowadzono wiele badań nad możliwością terapeutycznego działania TF. Czynniki te, o odpowiedniej swoistości antygenowej, wykorzystywano do leczenia schorzeń, w patogenezie których zasadnicze znaczenie ma nieprawidłowa funkcja limfocytów T, m.in. chorób grzybiczych (kandydozy), wirusowych (HSV, *Varicella zoster*), pasożytność (leiszmanioza), a w końcu nowotworów (melanoma, osteosarkoma) [20]. Niemniej jednak, na skutek niedostatecznego rozwoju immunologii w tamtym okresie badania te nie wywołały większego oddźwięku, a w związku z niemożnością sprecyzowania mechanizmu działania TF były traktowane jako swego rodzaju ciekawostka i nie doczekały się gruntownego zbadania ani kontynuacji [66].

6.4. Rola w infekcjach wirusowych

Cząstki miRNA odgrywają też znaczną rolę w interakcjach wirus–gospodarz. Istnieją hipotezy zakładające, że interferencja RNA wykształciła się jako mechanizm obronny komórki przed wirusami o genomie w postaci dwuniciowego RNA. Opublikowano wiele prac dowodzących wpływu miRNA gospodarza na cykl życiowy wirusa, jego tropizm i patogenność chorób wirusowych. Przykładem może być miR-32, który zmniejszając stężenie białek wirusa PFV-1 (primate foamy virus type 1) niezbędnych mu do replikacji skutecznie ją hamuje [44]. Niestety w toku ewolucji wiele wirusów wykształciło mechanizmy chroniące je przed działaniem interferujących RNA gospodarza [25] (np. przez wytwarzanie białek zaburzających funkcję czynników zaangażowanych w dojrzewanie miRNA), bądź wręcz zaczęło wykorzystywać je na swoją korzyść (np. wirus HCV, wykorzystując interakcje z miR-122 propaguje swoją replikację [35]). Ponadto wirusy wytwarzają własne miRNA, które są istotnym czynnikiem umożliwiającym im uniknięcie odpowiedzi immunologicznej organizmu. Na przykład ludzki wirus cytomegalii (HCMV) wytwarza cząstkę miR-UL112, która zmniejsza ekspresję liganda (MICB) receptora aktywującego komórkę NK (NKG2D), co pozwala na uniknięcie eliminacji komórek zainfekowanych CMV przez komórki NK [69].

7. POTENCJALNE ZASTOSOWANIE TERAPEUTYCZNE

Opisana wyżej fizjologiczna rola miRNA w regulacji ekspresji genów to jednak nie jedyny sposób ujawniania regulacyjnego działania RNA. Zjawisko to szeroko wykorzystywane jest jako narzędzie badawcze, umożliwiające poznanie funkcji genów. Określenie sekwencji genu pozwala na skonstruowanie komplementarnego do niego

odcinka siRNA, a interakcja tych cząstek prowadzi do wyłączenia działania genu, co ma określone i możliwe do zaobserwowania skutki. W znacznej mierze przyczyniło się to do poszerzenia stanu wiedzy m.in. na temat funkcjonowania układu immunologicznego, zarówno jego komponentu wrodzonego jak i swoistego (szczegółowy przegląd odkryć w tej dziedzinie por. [50]).

7.1. Terapeutyczne wykorzystanie srRNA

RNAi może mieć potencjalnie nieograniczone zastosowanie w terapii, zarówno chorób metabolicznych, genetycznych, infekcyjnych (w tym wirusowych), jak i alergicznych, autoimmunizacyjnych oraz nowotworowych. Wymaga to jednak m.in. polepszenia własności farmakodynamicznych RNA i zmniejszenia działań niepożądanych jego podania [8,40].

7.2. Ograniczenia metodyczne

7.2.1. Stabilność i selektywne dostarczenie

RNA jest wyjątkowo niestabilny w płynach ustrojowych, podatny na degradację przez wszechobecne rybonukleazy i fagocytozę w układzie RES, podlega filtracji i wydalaniu przez nerki. Znaczny problem stanowi ponadto efektywne dostarczenie siRNA do komórki docelowej. Zarówno rozmiar jak i ujemny ładunek tej cząstki stanowią przeszkodę w pokonywaniu błony komórkowej. Kolejne wyzwanie stawia konieczność działania RNAi w ściśle określonych komórkach. Ważny jest też odpowiednio długi czas zahamowania ekspresji genu. Do tej pory zaproponowano wiele rozwiązań, od bezpośredniego dostarczenia siRNA do komórki, przez propozycje upakowania tego RNA w nanocząstki przypominające liposomy, po dalsze chemiczne i biologiczne modyfikacje, a w końcu użycie wektorów wirusowych [13]. Podejmowane próby chemicznych modyfikacji siRNA [40] mają na celu głównie zwiększenie jego stabilności, odporności na działanie rybonukleaz (np. przez wprowadzenie podstawień fosforotiolowych lub syntetycznych analogów kwasów nukleinowych, LNA – locked nucleic acids), ale również ułatwienie przechodzenia przez błony komórkowe (dodanie grup lipofilowych, np. kwasów litocholowych, pochodnych cholesterolu [49]), bądź też umożliwienie obserwacji ich dystrybucji w komórce (wyznakowanie markerami fluorescencyjnymi). Należy oczywiście pamiętać, że wprowadzane modyfikacje nie mogą wpływać na aktywność supresyjną danego siRNA. Jednym z pryncypiów jest zachowanie fosforylacji grupy hydroksylowej na końcu 5' guide strand, co jest niezbędne do wejścia siRNA na szlak RNAi [51]. Wektory wirusowe stosuje się wtedy, gdy istotne jest utrzymanie efektu wyciszenia danego genu, np. w chorobach metabolicznych bądź przewlekłych infekcjach. Obecnie stosuje się trzy ich typy: wektory retrowirusowe, adenowirusowe i wirusy adenosatelitarne [40]. Geny kodujące strukturę spinkową siRNA, po uprzednim ich zaopatrzeniu w odpowiednie promotory, wprowadzane są do odpowiednio zmodyfikowanych genetycznie, niepatogennych cząstek wirusów i za ich pośrednictwem wprowadzane do komórki. Takie rozwiązanie oprócz zalet ma też oczywiście wady, wśród nich potencjalną immunogenność, stymulowanie mutacji w genomie wirusa przez wprowadzenie do niego obcych genów, czy cytotoksyczność [8].

7.2.2. Działania niepożądane

Oprócz problemów z samym dostarczeniem interferującego RNA, należy stawić czoła interferencji – zarówno guide jak i passenger strand – z genami innymi niż docelowy (tzw. off-target effects). Jest to skutkiem wysokiej komplementarności seed region siRNA do fragmentów 3' mRNA różnych genów (zjawisko plejotropizmu, por. 3.1). Zjawisku temu zapobiegać można wprowadzając chemicznie zmodyfikowane rybonukleotydy do siRNA. Jak już wspomniano, manipulacje te nie mogą znieść jego aktywności regulacyjnej, stąd też łatwiej jest znieść efekty off-target nici sensownej, która nie odpowiada za właściwe działanie siRNA. W przypadku nici antysensownej rozwiązaniem może być metylacja rybozy drugiego nukleotydu, co wystarcza do zapobieżenia nieoczekiwanej interferencji i pozostaje bez wpływu na zamierzone działanie siRNA [31].

7.2.3. Interferencja ze szlakami fizjologicznymi

Dodatkowo wprowadzone do komórki sztuczne interferujące RNA może zakłócać działanie fizjologicznych miRNA. Tor RNAi, jak każdy inny szlak metaboliczny czy regulacyjny, charakteryzuje wysycalność. siRNA współzawodniczy z miRNA o wiązanie do eksportyny 5 oraz do RNP [9]. Ma to poważne implikacje; wywołuje zaburzenie fizjologicznej regulacji ekspresji genów, a także może doprowadzić do śmierci organizmu [24].

7.2.4. Stymulacja odpowiedzi interferonowej

Początkowo zakładano, że tylko dwuniciowe RNA (dsRNA) o długości powyżej 30 nukleotydów może poprzez receptory TLR pobudzać odpowiedź interferonową komórki. Udowodniono jednak, że siRNA stymuluje reakcję immunologiczną za pośrednictwem kinazy białkowej R [67], a prawdopodobnie także po rozpoznaniu przez TLR-3 i TLR-7. Trzeba zaznaczyć, że rozpoznaniu przez TLR podlegają siRNA zawierające określone motywy, co umożliwi odpowiednio ich projektowanie, by nie pobudzić odpowiedzi interferonowej. Wykazano, że 2'-O-metylacja sensownej nici siRNA wystarcza do uniknięcia tego efektu, nie zniżając przy tym supresyjnej aktywności danego RNA [63].

7.3. Próby kliniczne

Pomimo tych nie do końca jeszcze pokonanych trudności, w znacznym tempie rośnie liczba projektów zmierzających do terapeutycznego wykorzystania RNAi, spośród których kilkanaście znajduje się na etapie testów klinicznych [29,40].

Najbardziej zaawansowane (III faza badań klinicznych) są prace nad wykorzystaniem siRNA w leczeniu zwyrodnienia plamki żółtej (AMD). W chorobie tej dochodzi do przerostu naczyń krwionośnych za siatkówką, co prowadzi do utraty wzroku. Czynnikiem ułatwiającym wykorzystanie RNAi w przypadku chorób gałki ocznej są ograniczona przeszeń oka, mała aktywność nukleaz oraz możliwość bezpośredniego dostarczenia terapeutycznego do ciała szklistego. Celem jest zablokowanie genu czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego – VEGF, co powinno zahamować angiogenezę. Inną strategią leczenia tej choroby jest chemicznie zmodyfikowany siRNA, blokujący ekspresję genu receptora



VEGF (II faza testów klinicznych). Jednakże oparty na RNAi mechanizm działania ww siRNA został poddany w wątpliwość [40]. Uważa się, że ich efekty nie są spowodowane interferencją RNA, ale prawdopodobnie nieswoistą aktywnością TLR-3 przez RNA, prowadzącą do indukcji IFN- γ i IL-12, co skutkuje zmniejszeniem ekspresji VEGF [38].

Duże nadzieje pokłada się także w możliwości wykorzystania siRNA w terapii chorób wirusowych (por. 6.4). W kręgu zainteresowań badaczy pozostają m.in. infekcje wirusami RSV, HIV-1, HBV, HCV, SARS-koronawirus, czy wirusami grypy i polio [40]. Ze względu na unikanie przez wirusy odpowiedzi immunologicznej organizmu, w tym również RNAi, należy wykorzystywać siRNA skierowane przeciw białkom niezbędnym wirusom (np. cis-acting replication element – CRE), których mutacja byłaby dla wirusa zębna. Można również stosować RNA blokujące białka gospodarza potrzebne wirusowi. W drugiej fazie badań klinicznych znajduje się siRNA skierowany przeciw genowi białka nukleokapsydu RSV, niezbędnego wirusowi do replikacji. Łatwość donosowego, selektywnego dla układu oddechowego podania siRNA przy braku działań niepożądanych [14] oraz aktywność antywirusowa (II faza badań) sugerują zasadność tego rozwiązania.

W terapii nowotworów wskazuje się na kilka potencjalnych punktów działania RNAi [40]. Odpowiednio

zaprojektowane siRNA mogą wyciszać onkogeny (zahamowanie proliferacji komórek nowotworowych), geny odpowiedzialne za angiogenezę i przerzutowanie czy za oporność wielolekową MDR (zwiększenie podatności na chemioterapię). W badaniach klinicznych testowany jest siRNA przeciw antygenowi glejaka wielopostaciowego, tenascin-C. Zastosowanie tego RNA zapobiegało wznowie po operacyjnym usunięciu guza u chorych z tym nowotworem [92].

Innym podejściem jest supresja fizjologicznych miRNA. Na przykład blokada miR-122, zaangażowanego w replikację HCV w wątrobie za pomocą anti-miRNA (w postaci LNA), stanowi nową możliwość terapii infekcji tym wirusem [8]. Co ciekawe, miR-122 wpływa również na stężenie cholesterolu w surowicy i potencjalnie jego supresja może obniżać hipercholesterolemię. Ta wielokierunkowość działania regulacyjnych RNA skłania jednakże do rozważenia ich stosowania.

Opisane w pracy mechanizmy regulacyjne wykorzystujące krótkie odcinki RNA stanowią coraz częściej zauważany element kontroli funkcjonowania układu immunologicznego. Poznanie mechanizmów rządzących interferencją RNA oraz możliwością przekazywania rybonukleinowych sygnałów regulacyjnych między komórkami jest istotne zarówno z naukowej, jak i klinicznej perspektywy.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Baj-Krzyworzeka M., Szatanek R., Węglarczyk K., Baran J., Zembala M.: Tumour-derived microvesicles modulate biological activity of human monocytes. *Immunol. Lett.*, 2007; 113: 76–82
- [2] Baltimore D., Boldin M.P., O'Connell R.M., Rao D.S., Taganov K.D.: MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat. Immunol.*, 2008; 9: 839–845
- [3] Belting M., Wittrop A.: Nanotubes, exosomes, and nucleic acid-binding peptides provide novel mechanisms of intercellular communication in eukaryotic cells: implications in health and disease. *J. Cell Biol.*, 2008; 183: 1187–1191
- [4] Bohsack 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
- [5] Bryniarski K., Ptak M., Sikora E., Szczepanik M., Guerrier-Takada C., Altman S., Askenase P.W., Ptak W.: Role of low molecular weight RNA in contact sensitivity response. *Proceedings of the 2nd European Congress of Immunology*, Berlin Sept. 2009; 183–186
- [6] Bryniarski K., Ptak M., Szczepanik M., Askenase P.W., Ptak W.: Role of low molecular weight RNA in contact sensitivity response – preliminary results. *Centr. Eur. J. Immunol.*, 2005; 30(Suppl.1): 6
- [7] Bryniarski K., Ptak M., Szczepanik M., Guerrier-Takada C., Altman S., Askenase P.W., Ptak W.: Role of low molecular weight RNA in suppression of contact sensitivity response. *Eur. J. Immunol.*, 2009; 39(Suppl.1), S436
- [8] Castanotto D., Rossi J.: The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature*, 2009; 457: 426–433
- [9] Castanotto D., Sakurai K., Lingeman R., Li H., Shively L., Aagaard L., Soifer H., Gagnon A., Riggs A., Rossi J.J.: Combinatorial delivery of small interfering RNAs reduces RNAi efficacy by selective incorporation into RISC. *Nucleic Acids Res.*, 2007; 35: 5154–5164
- [10] Chen C.Z., Li L., Lodish H.F., Bartel D.P.: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 2004; 303: 83–86
- [11] Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E.: Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000; 97: 6499–6503
- [12] Davidson-Moncada J., Papavasiliou F.N., Tam W.: MicroRNAs of the immune system: roles in inflammation and cancer. *Ann. NY Acad. Sci.*, 2010; 1183: 183–194
- [13] de Fougerolles A.R.: Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*. *Hum. Gene Ther.*, 2008; 19:125–132
- [14] DeVincenzo J., Cehelsky J.E., Alvarez R., Elbashir S., Harborth J., Toudjarska I., Nechev L., Murugaiiah V., Van Vliet A., Vaishnav A.K., Meyers R.: Evaluation of the safety, tolerability and pharmacokinetics of ALN-RSV01, a novel RNAi antiviral therapeutic directed against respiratory syncytial virus (RSV). *Antiviral Res.*, 2008; 77: 225–231
- [15] Djuranovic S., Nahvi A., Green R.: A parsimonious model for gene regulation by miRNAs. *Science*, 2011; 331: 550–553
- [16] Dressler D., Rosenfeld S.: On the chemical nature of transfer factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974; 71: 4429–4434
- [17] Eis P.S., Tam W., Sun L., Chadburn A., Li Z., Gomez M.F., Lund E., Dahlberg J.E.: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005; 102: 3627–3632
- [18] Farazi T.A., Juranek S.A., Tuschl T.: The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Development*, 2008; 135: 1201–1214
- [19] Fontana L., Pelosi E., Greco P., Racanicchi S., Testa U., Liuzzi F., Croce C.M., Brunetti E., Grignani F., Peschle C.: MicroRNAs 17-5p-20a-106a control monocytopenia through AML1 targeting and M-CSF receptor upregulation. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 775–787
- [20] Fudenberg H.H., Fudenberg H.H.: Transfer factor: past, present and future. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 1989; 29: 475–516
- [21] Ghildiyal M., Xu J., Seitz H., Weng Z., Zamore P.D.: Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA*, 2010; 16: 43–56
- [22] Ghildiyal M., Zamore P.: Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.*, 2009; 10: 94–108
- [23] Griffiths-Jones S., Grocock R.J., van Dongen S., Bateman A., Enright A.J.: miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 2006; 34 (Database issue): D140–D144
- [24] Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., Storm T.A., Pandey K., Davis C.R., Marion P., Salazar F., Kay M.A.: Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature*, 2006; 441: 537–541
- [25] Haasnoot J., de Vries W., Geutjes E.J., Prins M., de Haan P., Berkhout B.: The Ebola virus VP30 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog.*, 2007; 3: e86

- [26] Hall T.M.: Structure and function of argonaute proteins. *Structure*, 2005; 13: 1403–1408
- [27] Haussecker D., Huang Y., Lau A., Parameswaran P., Fire A.Z., Kay M.A.: Human tRNA-derived small RNAs in the global regulation of RNA silencing. *RNA*, 2010; 16: 673–695
- [28] He L., Thomson J.M., Hemann M.T., Hernando-Monge E., Mu D., Goodson S., Powers S., Cordon-Cardo C., Lowe S.W., Hannon G.J., Hammond S.M.: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005; 435: 828–833
- [29] Higuchi Y., Kawakami S., Hashida M.: Strategies for *in vivo* delivery of siRNAs: recent progress. *BioDrugs*, 2010; 24: 195–205
- [30] Hunter M.P., Ismail N., Zhang X., Aguda B.D., Lee M.L., Schmittgen T.D., Nana-Sinkam S.P., Jarjoura D., Marsh C.B.: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 2008; 3: e3694
- [31] Jackson A.L., Burchard J., Leake D., Reynolds A., Schelter J., Guo J., Johnson J.M., Lim L., Karpilow J., Nichols K., Marshall W., Khvorova A., Linsley P.S.: Position-specific chemical modification of siRNAs reduces “off-target” transcript silencing. *RNA*, 2006; 12: 1197–1205
- [32] Jeter W.S., Tremaine M.M., Seeborn P.M.: Passive transfer of delayed hypersensitivity to 2,4-dinitrochlorobenzene in guinea pigs with leukocytic extracts. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1954; 86: 251–253
- [33] Jing Q., Huang S., Guth S., Zarubin T., Motoyama A., Chen J., Di Padova F., Lin S.C., Gram H., Han J.: Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. *Cell*, 2005; 120: 623–634
- [34] Johnnidis J.B., Harris M.H., Wheeler R.T., Stehling-Sun S., Lam M.H., Kirak O., Brummelkamp T.R., Fleming M.D., Camargo F.D.: Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature*, 2008; 451: 1125–1129
- [35] Jopling C.L., Yi M., Lancaster A.M., Lemon S.M., Sarnow P.: Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific microRNA. *Science*, 2005; 309: 1577–1581
- [36] Kim D.H., Saetrom P., Snove O.Jr., Rossi J.: MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2008; 105: 16230–16235
- [37] Kim V.N.: MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005; 6: 376–385
- [38] Kleinman M.E., Yamada K., Takeda A., Chandrasekaran V., Nozaki M., Baffi J.Z., Albuquerque R.J., Yamasaki S., Itaya M., Pan Y., Appukkuttan B., Gibbs D., Yang Z., Karikó K., Ambati B.K., Wilgus T.A., DiPietro L.A., Sakurai E., Zhang K., Smith J.R., Taylor E.W., Ambati J.: Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR-3. *Nature*, 2008; 452: 591–597
- [39] Koralov S.B., Muljo S.A., Galler G.R., Krek A., Chakraborty T., Kanellopoulou C., Jensen K., Cobb B.S., Merkenschlager M., Rajewsky N., Rajewsky K.: Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage. *Cell*, 2008; 132: 860–874
- [40] Kurreck J.: RNA interference: from basic research to therapeutic applications. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2009; 48: 1378–1398
- [41] Lawrence H.S.: The transfer of generalized cutaneous hypersensitivity of the delayed tuberculin type in man by means of constituents of disrupted leukocytes. *J. Clin. Invest.*, 1954; 33: 951–952
- [42] Lawrence H.S.: The transfer of hypersensitivity of the delayed type in man. Cellular and humoral aspects of hypersensitivity states. Red.: H.S. Lawrence (Paul B. Hoeber, Inc., New York), 1959: 279–319
- [43] Lawrence H.S., Al-Askari S., David J., Franklin E., Zweiman B.: Transfer of immunological information in humans with dialysates of leukocyte extracts. *Trans. Ass. Amer. Physicians*, 1963; 76: 84–89
- [44] Lecellier C.H., Dunoyer P., Arar K., Lehmann-Che J., Eyquem S., Himber C., Saib A., Voinnet O.: A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells. *Science*, 2005; 308: 557–560
- [45] Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P.: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 2005; 120: 15–20
- [46] Li Q.J., Chau J., Ebert P.J., Sylvester G., Min H., Liu G., Braich R., Manoharan M., Soutschek J., Skare P., Klein L.O., Davis M.M., Chen C.Z.: miR-181a is an intrinsic modulator of T cell sensitivity and selection. *Cell*, 2007; 129: 147–161
- [47] Lindsay M.A.: microRNAs and the immune response. *Trends Immunol.*, 2008; 29: 343–351
- [48] Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J.: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 2004; 305: 1437–1441
- [49] Lorenz C., Hadwiger P., John M., Vornlocher H.P., Unverzagt C.: Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2004; 14: 4975–4977
- [50] Mao C.P., Lin Y.Y., Hung C.F., Wu T.C.: Immunological research using RNA interference technology. *Immunology*, 2007; 121: 295–307
- [51] Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Lührmann R., Tuschl T.: Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*, 2002; 110: 563–574
- [52] Meister G., Tuschl T.: Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*, 2004; 431: 343–349
- [53] miRBase Release 17. <http://www.mirbase.org> (28.04.2011)
- [54] O’Connell R.M., Rao D.S., Chaudhuri A.A., Baltimore D.: Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010; 10: 111–122
- [55] O’Connell R.M., Rao D.S., Chaudhuri A.A., Boldin M.P., Taganov K.D., Nicoll J., Paquette R.L., Baltimore D.: Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 585–594
- [56] Okamura K., Hagen J.W., Duan H., Tyler D.M., Lai E.C.: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 2007; 130: 89–100
- [57] Ota A., Tagawa H., Karnan S., Tsuzuki S., Karpas A., Kira S., Yoshida Y., Seto M.: Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res.*, 2004; 64: 3087–3095
- [58] Paddison P.J., Vogt P.K.: RNA interference. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2008; 216–220
- [59] Palomares O., Yaman G., Azkur A.K., Akkoc T., Akdis M., Akdis C.A.: Role of Treg in immune regulation of allergic diseases. *Eur. J. Immunol.*, 2010; 40: 1232–1240
- [60] Perry M.M., Moschos S.A., Williams A.E., Shepherd N.J., Larner-Svensson H.M., Lindsay M.A.: Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells. *J. Immunol.*, 2008; 180: 5689–5698
- [61] Ptak W., Rosenstein R.W., Gershon R.K.: Interactions between molecules (subfactors) released by different T cell sets that yield a complete factor with biological (suppressive) activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982; 79: 2375–2378
- [62] Ratajczak J., Miekus K., Kucia M., Zhang J., Reca R., Dvorak P., Ratajczak M.Z.: Embryonic stem cell-derived microvesicles reprogram hematopoietic progenitors: evidence for horizontal transfer of mRNA and protein delivery. *Leukemia*, 2006; 20: 847–856
- [63] Robbins M., Judge A., Liang L., McClintock K., Yaworski E., MacLachlan I.: 2'-O-methyl-modified RNAs act as TLR7 antagonists. *Mol. Ther.*, 2007; 15: 1663–1669
- [64] Rodriguez A., Vigorito E., Clare S., Warren M.V., Couttet P., Soond D.R., van Dongen S., Grocock R.J., Das P.P., Miska E.A., Vetrie D., Okkenhaug K., Enright A.J., Dougan G., Turner M., Bradley A.: Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science*, 2007; 316: 608–611
- [65] Rosenfeld S., Dressler D.: Transfer factor: a subcellular component that transmits information for specific immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1974; 71: 2473–2477
- [66] Silverstein A.M.: A history of immunology. Academic Press, Inc., 1989, 140–141
- [67] Sledz C.A., Holko M., de Veer M.J., Silverman R.H., Williams B.R.: Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.*, 2003; 5: 834–839
- [68] Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L.: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 2004; 305: 1434–1437
- [69] Stern-Ginossar N., Elefant N., Zimmermann A., Wolf D.G., Saleh N., Biton M., Horwitz E., Prokocimer Z., Prichard M., Hahn G., Goldman-Wohl D., Greenfield C., Yagel S., Hengel H., Altuvia Y., Margalit H., Mandelboim O.: Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science*, 2007; 317: 376–381
- [70] Su H., Trombly M.L., Chen J., Wang X.: Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes Dev.*, 2009; 23: 304–317
- [71] Szczepanik M., Akahira-Azuma M., Bryniarski K., Tsuji R.F., Kawikowa I., Ptak W., Kiener C., Campos R.A., Askenase P.W.: B-1 B cells mediate required early T cell recruitment to elicit protein-induced delayed-type hypersensitivity. *J. Immunol.*, 2003; 171: 6225–6235



- [72] Taganov K.D., Boldin M.P., Baltimore D.: MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*, 2007; 26: 133–137
- [73] Thai T.H., Calado D.P., Casola S., Ansel K.M., Xiao C., Xue Y., Murphy A., Frenthewey D., Valenzuela D., Kutok J.L., Schmidt-Supprian M., Rajewsky N., Yancopoulos G., Rao A., Rajewsky K.: Regulation of germinal center response by microRNA-155. *Science*, 2007; 316: 604–608
- [74] Tili E., Michaille J.J., Cimino A., Costeanu S., Dumitru C.D., Adair B., Fabbri M., Alder H., Liu C.G., Calin G.A., Croce C.M.: Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF- α stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J. Immunol.*, 2007; 179: 5082–5089
- [75] Tolia N.H., Joshua-Tor L.: Slicer and the Argonautes. *Nat. Chem. Biol.*, 2007; 3: 36–43
- [76] Tsai Y.G., Yang K.D., Niu D.M., Chien J.W., Lin C.Y.: TLR2 agonists enhance CD8⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and suppress Th2 immune responses during allergen immunotherapy. *J. Immunol.*, 2010; 184: 7229–7237
- [77] Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O.: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat. Cell Biol.*, 2007; 9: 654–659
- [78] Vasudevan S., Tong Y., Steitz J.A.: Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 2007; 318: 1931–1934
- [79] Ventura A., Young A.G., Winslow M.M., Lintault L., Meissner A., Erkeland S.J., Newman J., Bronson R.T., Crowley D., Stone J.R., Jaenisch R., Sharp P.A., Jacks T.: Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 2008; 132: 875–886
- [80] Vigorito E., Perks K.L., Abreu-Goodger C., Bunting S., Xiang Z., Kohlhaas S., Das P.P., Miska E.A., Rodriguez A., Bradley A., Smith K.G., Rada C., Enright A.J., Toellner K.M., MacLennan I.C., Turner M.: microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells. *Immunity*, 2007; 27: 847–859
- [81] Watanabe T., Totoki Y., Toyoda A., Kaneda M., Kuramochi-Miyagawa S., Obata Y., Chiba H., Kohara Y., Kono T., Nakano T., Surami M.A., Sakaki Y., Sasaki H.: Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 2008; 453: 539–543
- [82] Winston W.M., Molodowitch C., Hunter C.P.: Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*, 2002; 295: 2456–2459
- [83] Xiao C., Calado D.P., Galler G., Thai T.H., Patterson H.C., Wang J., Rajewsky N., Bender T.P., Rajewsky K.: MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. *Cell*, 2007; 131: 146–159
- [84] Xiao C., Rajewsky K.: MicroRNA control in the immune system: basic principles. *Cell*, 2009; 136: 26–36
- [85] Xiao C., Srinivasan L., Calado D.P., Patterson H.C., Zhang B., Wang J., Henderson J.M., Kutok J.L., Rajewsky K.: Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.*, 2008; 9: 405–414
- [86] Yi R., Qin Y., Macara I.G., Cullen B.R.: Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, 2003; 17: 3011–3016
- [87] Yuan A., Farber E.L., Rapoport A.L., Tejada D., Deniskin R., Akhmedov N.B., Farber D.B.: Transfer of microRNAs by embryonic stem cell microvesicles. *PLoS One*, 2009; 4: e4722
- [88] Zhang Y., Liu D., Chen X., Li J., Li L., Bian Z., Sun F., Lu J., Yin Y., Cai X., Sun Q., Wang K., Ba Y., Wang Q., Wang D., Yang J., Liu P., Xu T., Yan Q., Zhang J., Zen K., Zhang C.Y.: Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration. *Mol. Cell*, 2010; 39: 133–144
- [89] Zhou B., Wang S., Mayr C., Bartel D.P., Lodish H.F.: miR-150, a microRNA expressed in mature B and T cells, blocks early B cell development when expressed prematurely. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007; 104: 7080–7085
- [90] Zhou H., Huang X., Cui H., Luo X., Tang Y., Chen S., Wu L., Shen N.: miR-155 and its star-form partner miR-155* cooperatively regulate type I interferon production by human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 2010; 116: 5885–5894
- [91] Zhou X., Jeker L.T., Fife B.T., Zhu S., Anderson M.S., McManus M.T., Bluestone J.A.: Selective miRNA disruption in T reg cells leads to uncontrolled autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2008; 205: 1983–1991
- [92] Zukiel R., Nowak S., Wyszko E., Rolle K., Gawronska I., Barciszewska M.Z., Barciszewski J.: Suppression of human brain tumor with interference RNA specific for tenascin-C. *Cancer Biol. Ther.*, 2006; 5: 1002–1007

Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.