

## STRESZCZENIE

Kwasy rybonukleinowe występują w różnych formach, między innymi w kolistej (circRNA). Forma kolista RNA jest znacznie bardziej rozpowszechniona niż pierwotnie sądzono. U wirusa HDV, wiroidów oraz wiroidopodobnych satelitarnych RNA pełni funkcję genomu. Koliste RNA zaobserwowano w związku z dojrzewaniem prekursorów rRNA i tRNA niektórych archeonów. Może występować jako produkt końcowy (introny) lub stadium przejściowe. U archeonów odnotowano również formy koliste kilku snoRNA oraz innych RNA pełniących funkcje regulacyjne. Zauważono powstawanie circRNA w związku z dojrzewaniem pre-mRNA zawierających introny spliceosomalne, grupy I oraz grupy II. Zaobserwowane cząsteczki składały się z sekwencji samych intronów, samych eksonów lub obu rodzajów na raz. Intronowe circRNA mogą być powiązane z mobilnością tychże elementów genetycznych. Eksonowe (występują u eukariontów) często są tkankowo specyficzne lub charakterystyczne dla określonego etapu rozwoju organizmu; niektóre są zdolne do modulacji działania miRNA. Przypuszcza się też, że są powiązane z kilkoma chorobami neurodegeneracyjnymi. Koliste RNA są potencjalnie użyteczne terapeutycznie i w diagnostyce.

## WPROWADZENIE

Wraz z upływem lat oraz postępem badań nad kwasami rybonukleinowymi rośnie wachlarz form, w jakich zaobserwowano te cząsteczki. Jedną z nich, odkrytą stosunkowo niedawno, są koliste RNA – zamknięte wiązaniami kowalencyjnymi okręgi (circRNA). Na przestrzeni ostatnich lat miały miejsce ogromny wzrost zainteresowania badaczy tą grupą cząsteczek. Pociągnął on za sobą znaczące poszerzenie stanu wiedzy na ich temat, co z kolei spowodowało drastyczną zmianę ich postrzegania. Zamiast widzieć koliste RNA jako ciekawostki stanowiące mało istotny szum informacyjny obecny w komórce lub efekt błędnego przetwarzania RNA, zaczęto uważać je za powszechnie występującą, istotną i potencjalnie niezwykle użyteczną grupę cząsteczek. Mimo tego obecny stan wiedzy na temat circRNA zawiera mnóstwo białych kart. Dzięki wysokoprępowym metodom badania całych transkryptomów uzyskano dużo cennych informacji, ale wiele kwestii związanych z kolistymi RNA wciąż domaga się wyjaśnienia. Przypuszczalnie każda odpowiedź, którą uda się uzyskać, zrodzi szereg nowych pytań. Tym niemniej circRNA niosą ze sobą ogrom potencjalnych zastosowań, między innymi terapeutycznych.

## ZNANE TYPY KOLISTYCH CZĄSTECZEK RNA

Obecność circRNA zaobserwowano w związku z wieloma procesami zachodzącymi w organizmach żywych, należących nieraz do skrajnie różnych grup taksonomicznych [1]. Cząsteczki te są niezmiernie zróżnicowane zarówno pod względem sposobu powstawania, struktury, właściwości, jak i pełnionej funkcji (Tab. 1).

## KOLISTY RNA W ROLI GENOMU

Kolista, jednoniciowy RNA może pełnić rolę genomu. Taki stan rzeczy zaobserwowano dla kilku patogenów: wirusa HDV (ang. *hepatitis delta virus*, wirus zapalenia wątroby typu D), wiroidów oraz wiroidopodobnych satelitarnych RNA [3]. Materiał genetyczny omawianych patogenów tworzy rozbudowane i bardzo stabilne struktury drugorzędowe w kształcie pręta, z dużym udziałem fragmentów dwuniciowych [3]. W niektórych przypadkach struktura drugorzędowa jest rozgałęziona (wiroidy z rodziny *Avsunviroidae* [6]). Genomy circRNA charakteryzują się replikacją przebiegającą zgodnie z modelem toczącego się koła (replikacja typu sigma, ang. *rolling circle replication*). Zaobserwowano dwa warianty przebiegu tego procesu: symetryczny oraz asymetryczny, właściwe różnym grupom omawianych patogenów. Pierwszym etapem replikacji jest synteza nici o polarności antygenomowej. W przypadku opcji symetrycznej kolejnym kro-

Daria Zganiacz\*

Rafał Milanowski✉

Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Instytut Botaniki, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski

✉Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Instytut Botaniki, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa; e-mail: milan@biol.uw.edu.pl

\*Studentka Kolegium Międzywydziałowych Indywidualnych Studiów Matematyczno-Przyrodniczych, Uniwersytet Warszawski

Artykuł otrzymano 19 października 2017 r.  
Artykuł zaakceptowano 7 listopada 2017 r.

**Słowa kluczowe:** koliste RNA, genom RNA, intron, ekson, dojrzewanie RNA

**Podziękowanie:** Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego 2016/21/B/NZ2/01759 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

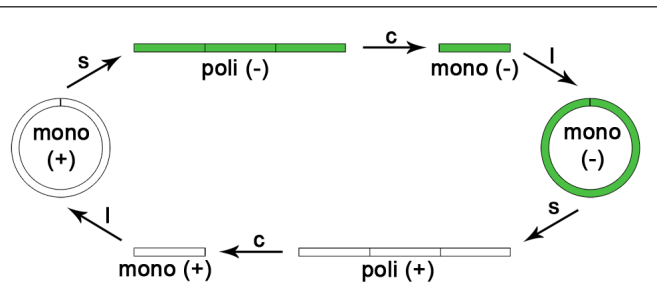
**Tabela 1.** Wykaz znanych typów kolistych RNA (za [2] ze zmianami; rozmiar wiroidów i wiroidopodobnych satelitarnych RNA za [3]; informacje o CDR1as/ciRS-7 za [4,5]).

Koliste RNA	Obserwowane koliste cząsteczki	Powiązane organizmy	Powstawanie	Rozmiar
<b>stanowiące genom</b>				
wirusa HDV	nici obu polarności	ludzki patogen		1,7 kb
wiroidów i wiroidopodobnych satelitarnych RNA	w trakcie cyklu rozwojowego	patogeny roślin	ligacja 3'-5'	220 do 400 nt
<b>intronowe, występujące w związku z obróbką intronów:</b>				
tRNA i rRNA	introny pełnej długości	niektóre archeony	ligacja 3'-5'	
grupy I	introny: przycięte, pełnej długości, pełnej długości z dodatkową G	niektóre bakterie niektóre eukarionty niektóre wirusy	działanie rybozomu grupy I (wiązania 3'-5')	250 do 500 nt
grupy II	lariaty, introny: pełnej długości, pełnej długości z dodatkowymi nukleotydami	bakterie niektóre eukarionty ( <i>w genomach organellarnych</i> ) niektóre wirusy	kanoniczne wycinanie, wycinanie przez cyrkularyzację, błędy rozpoznawania granic intronów (wiązania 2'-5')	do 3 kb
spliceosomalnych (ciRNA)	lariaty, powtarzalne fragmenty intronów	eukarionty	splicing, degradacja 3' ogona lariaty do rozwidlenia (wiązania 2'-5')	<200 nt do >3 kb
<b>zawierające eksony</b>				
eksonowo-intronowe (ELciRNA)	fragmenty pre-mRNA	eukarionty	backsplicing lub pomijanie eksonów (wiązania 3'-5')	<100 nt do >4 kb
<b>stadia przejściowe</b>				
obróbki transkryptów kolistych permutowanych genów tRNA	powtarzalne fragmenty transkryptów	niektóre archeony niektóre glony	ligacja 3'-5'	
obróbki prekursorów rRNA	powtarzalne fragmenty transkryptów operonu rRNA	niektóre archeony	ligacja 3'-5'	
degradacji RNA	różnorodne fragmenty 5S rRNA i mRNA	niektóre archeony	ligacja 3'-5'	
<b>niekodujące</b>				
snoRNA	C/D i H/ACA	niektóre archeony	ligacja 3'-5'	
7S RNA, RNaza P		niektóre archeony	ligacja 3'-5'	
<b>inne</b>				
antysensowne wobec mRNA	CDR1as/ciRS-7	człowiek mysz	zapewne ligacja 3'-5' z udziałem spliceosomu	

kiem jest cięcie powstającego konkatameru do monomerów oraz ligacja końców, efektem zaś są koliste cząsteczki RNA o polarności antygenomowej, zawierające pojedynczą kopię informacji genetycznej patogenu. Następnie ma miejsce synteza nici o polarności genomowej (wariant symetryczny; Ryc. 1.). W przypadku opcji asymetrycznej liniowy konkatamer o polarności antygenomowej nie jest cięty, lecz służy za matrycę w syntezie liniowego konkatameru o polarności genomowej. Powstająca nić podlega cięciu do monomerów,

które następnie zostają zamknięte podczas intramolekularnej ligacji (wariant asymetryczny; Ryc. 2).

Wiroidy oraz satelitarne RNA podobne wiroidom to patogeny roślin, których materiał genetyczny nie koduje żadnego białka [6,7]. Składają się odpowiednio z nagich RNA oraz RNA osłoniętych kapsydem właściwych im wirusów pomocniczych. Powodują istotne straty w rolnictwie [8]. Namnażanie wiroidów ma miejsce w jądrze komórkowym

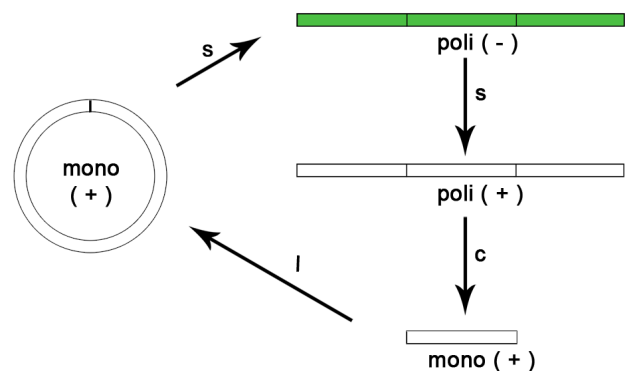


**Rycina 1.** Replikacja zgodnie z modelem tocącego się koła. Opcja symetryczna. + i - odpowiadają odpowiednio niciom o polarności genomowej i antygenomowej. s - synteza nowej nici o przeciwnej polarności, c - cięcie, l - ligacja.

zainfekowanej komórki (rodzina *Pospiviroidae*) lub w chloroplastach (*Avsunviroidae*) [9]. Replikacja wiroidopodobnych satelitarnych RNA przypuszczalnie zachodzi w cytoplazmie, kolokalizując z replikacją ich wirusów pomocniczych [3].

Wiroidy jądrowe stanowią rodzinę *Pospiviroidae*. Posiadają centralny region konserwowany (CCR, ang. *central conserved region*). Gatunek typowy tej rodziny to wiroid wrzcionowatości bulw ziemniaka (PSTVd, ang. *Potato spindle tuber viroid*) [8]. Replikacja *Pospiviroidae* zachodzi według asymetrycznego wariantu replikacji tocącego się koła [9] (Ryc. 2). Syntezy nowych nici dokonują DNA-zależne polimerazy RNA gospodarza, wykorzystując RNA wiroidu w roli matrycy [3]. CCR odgrywa ważną rolę w cięciu oraz ligacji syntetyzowanej nici RNA o polarności genomowej. To właśnie obecność tej sekwencji pozwala konkatamero- wi (ale nie monomerowi [9,10]) na przyjęcie odpowiedniej struktury drugorzędowej. Umożliwia ona działanie RNA- zie III lub podobnemu enzymowi, który najprawdopodobniej katalizuje cięcie do monomerów [9,11]. Nowopowstałe cząsteczki cechują się obecnością fosforanu na końcu 5' oraz grupy hydroksylowej na końcu 3' [11]. Przypuszcza się, że w cyrkularyzacji monomeru bierze udział ligaza gospodarza, zdolna do łączenia końców 5'P oraz 3'OH [3].

Wiroidy należące do rodziny *Avsunviroidae* są też znane jako wiroidy chloroplastowe. Gatunek typowy tejże rodziny to wiroid skazy słonecznej awokado (ASBVd, ang. *Avocado sunblotch viroid*). Nie posiadają one, w przeciwieństwie do *Pospiviroidae*, regionu zachowanego w ewolucji. Ich genomy przybierają rozgałęzioną strukturę drugorzędową [3].



**Rycina 2.** Replikacja zgodnie z modelem tocącego się koła. Opcja asymetryczna. s - synteza nowej nici o przeciwnej polarności, c - cięcie, l - ligacja.

Dla genomu ASBVd potwierdzono występowanie kolistych monomerów o polarności antygenomowej. Flores i wsp. [3] przytoczyli tę obserwację jako jeden z argumentów uzasadniających założenie, że *Avsunviroidae* są namnażane na drodze replikacji typu sigma w wariantcie symetrycznym (Ryc. 1). Za syntezę nowo powstających nici przypuszczalnie odpowiada kodowana przez gen jądrowy obecna w chloroplastach polimeraza RNA gospodarza lub enzym jej podobny (dane wspierające tę hipotezę również uzyskano dla ASBVd [8]). *In vivo* cięcie potomnych konkatamerów jest autokatalityczne i prawdopodobnie zachodzi w trakcie replikacji. Kluczową rolę odgrywa rybozym HHR (ang. *hammerhead ribozyme*). Zaobserwowano, że nici obu polarności przyjmują jego strukturę drugorzędową, czego skutkiem jest ich cięcie [8,12]. Powstające monomery mają końce z grupą hydroksylową na końcu 5' oraz 2'-3' cyklicznym fosforanem [12]. W ich cyrkularyzacji najprawdopodobniej bierze udział ligaza tRNA gospodarza (odnajdywana w chloroplastach, ale kodowana jądrowo [13]).

Wiroidopodobne satelitarne RNA w przeciwieństwie do wiroidów nie są zdolne do namnażania w komórce bez wsparcia wirusów pomocniczych. Ze względu na właściwe im wirusy pomocnicze dzieli się je na trzy grupy: wiroidopodobne satelitarne RNA nepowirusów, sobemowirusów oraz luteowirusów [3,14]. Zaobserwowano duże zróżnicowanie przebiegu replikacji w obrębie tej grupy patogenów. Dwa satelitarne RNA sobemowirusów ulegają namnażaniu w wariantcie asymetrycznym. W ich przypadku za cięcie konkatamery o polarności genomowej odpowiada rybozym HPR (ang. *hairpin ribozyme*). Jedyne satelitarne RNA luteowirusów charakteryzuje się replikacją symetryczną, z udziałem HHR w obydwu cięciach. W przypadku trzech RNA zależnych od nepowirusów zaobserwowano wariant symetryczny z HHR w nici o polarności genomowej oraz HPR w antygenomowej [3].

Cyrkularyzacja wiroidopodobnych satelitarnych RNA nie została dotąd dobrze poznana. Zaproponowano między innymi mechanizm zakładający zaangażowanie ligazy tRNA gospodarza, ale większość badań dotyczących tej kwestii była wykonywana *in vitro* [3].

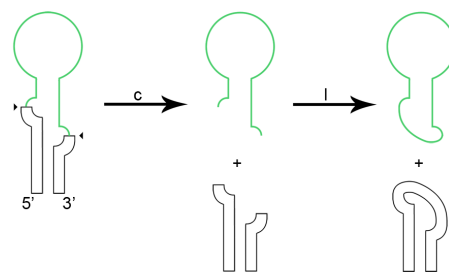
Każdy z wiroidopodobnych satelitarnych RNA przechodzi swoim cyklu rozwojowym przez formę kolistą. Tym niemniej nie wszystkie zostają w tym stadium zamknięte w kapsydach odpowiednich wirusów pomocniczych. W przypadku satelitarnych RNA sobemowirusów dominuje forma kolista genomu, podczas gdy u pozostałych stwierdzano głównie obecność liniowego RNA [3].

HDV (ang. *hepatitis delta virus*, wirus zapalenia wątroby typu D) to ludzki patogen, zależny od wirusa zapalenia wątroby typu B. Wirion składa się z pojedynczej kopii genomu związanej z cząsteczkami antygeny delta (HDAg; jedyne białko kodowane przez HDV) zamkniętej w kapsydie złożonym z białek otoczki wirusa HBV. Powoduje znacznie cięższy przebieg wirusowego zapalenia wątroby typu B. Namnażanie HDV przebiega zgodnie z symetrycznym wariantem replikacji typu sigma w jądrze zainfekowanego hepatocytu (Ryc. 1). Syntezy powstających nici dokonują za-

leżne od DNA polimerazy RNA gospodarza [3]. Przypuszcza się, że akceptują one materiał genetyczny wirusa w roli matrycy, ponieważ znaczna jego część (74% sekwencji) tworzy struktury dwuniciowe; nagi RNA przybiera nierozgałęzioną strukturę drugorzędową w kształcie pręta [15]. Cięcie syntetyzowanego RNA odbywa się z udziałem obecnego w niciach obu polarności nietypowego rybozemu. Jego działanie skutkuje powstaniem monomeru z wolną grupą hydroksylową na końcu 5' oraz 2'-3' cyklicznym fosforanem [16]. W genomie HDV wykryto także odcinek częściowo komplementarny do sekwencji rybozemu. Fragment ten (dzięki klasycznemu parowaniu zasad) może odgrywać rolę jego atenuatora. Dzięki jego istnieniu jedynie cząsteczka zawierająca więcej niż jedną kopię materiału genetycznego HDV przyjmuje strukturę drugorzędową pozwalającą na działanie rybozemu. Odnotowano, że czynniki właściwe dla gospodarza, oraz HDAg stymulują cięcie konkatameru. Zaproponowany mechanizm tłumaczy tę obserwację zakładając, że czasowo zaburzają one parowanie zasad między rybozmem a atenuatorem, zwiększając szanse na przyjęcie przez ten pierwszy aktywnej konformacji. Wysłunięto również przypuszczenie, że antygen delta może wpływać na trwałość kolistego monomeru poprzez tworzenie z nim ryboproteiny. Pociągałoby to za sobą utrwalenie struktury zawierającej atenuowany rybozemu - postulowane czynniki czasowo „uwalniające” rybozemu miałyby utrudniony dostęp do nici RNA [17,18]. *In vitro* rybozemu HDV jest zdolny również do katalizy cyrkularyzacji powstających monomerów, ale dzieje się to w warunkach dalekich od fizjologicznych [17], a około połowy tworzonych wówczas wiązań łączy węgle 5' oraz 2' [19]. Wyniki późniejszych badań wskazują na zaangażowanie maszynerii enzymatycznej komórki gospodarza, zdolnej do katalizy ligacji końców z 5' grupą hydroksylową oraz 2'-3' cyklicznym fosforanem. Możliwe, że wirus wykorzystuje w tym celu ligazę tRNA [19].

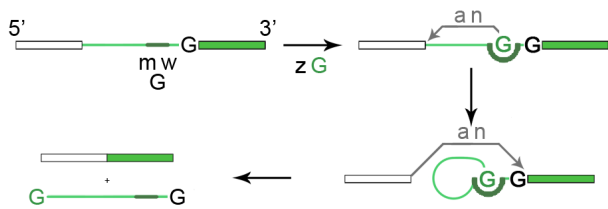
#### INTRONOWE circRNA (ciRNA)

Kolista RNA jest wynikiem usuwania intronów rRNA oraz tRNA u niektórych archeonów [2,20]. Ciąg reakcji prowadzących do powstania circRNA rozpoczyna się wycięciem intronu z cząsteczki prekursora. Odpowiada za nie splicingowa endonukleaza archeonów (ang. *archaeal splicing endonuclease*). Enzym ten rozpoznaje tak zwany motyw BHB (ang. *bulge-helix-bulge*), znaczący punkty wycinania intronów. Właściwa mu struktura drugorzędowa obejmuje dwa wybrzuszenia połączone dwuniciowym łącznikiem długości kilku nukleotydów. W miejscu cięcia wspomniana endonukleaza pozostawia grupę hydroksylową na końcu 5' oraz 2'-3' cykliczny fosforan. Usunięty z prekursora intron jest cząsteczką liniową. Ulega ona cyrkularyzacji z udziałem ligazy RNA (Ryc. 3; potwierdzono to dla intronów tRNA oraz tych spośród intronów rRNA, które zawierają otwarte ramki odczytu). W wyniku tejże reakcji powstaje kolista intron pełnej długości [20,21]. Danan i wsp. [22] przypuszczają, że wszystkie koliste introny tRNA są zamknięte wiązaniami 3'-5'. Postulują też powszechność występowania tego ciągu reakcji wśród archeonów. Koliste introny tRNA mogą zawierać elementy charakterystyczne dla małych jąderkowych RNA (snoRNA) z rodziny C/D.



Rycina 3. Wycinanie intronów rRNA i tRNA. Zieloną linią oznaczono intron, białą prostokąt odpowiada sekwencji obecnej w dojrzałej cząsteczce rRNA lub tRNA. Trójkąty oznaczają miejsca cięcia. c – cięcie, l – ligacja.

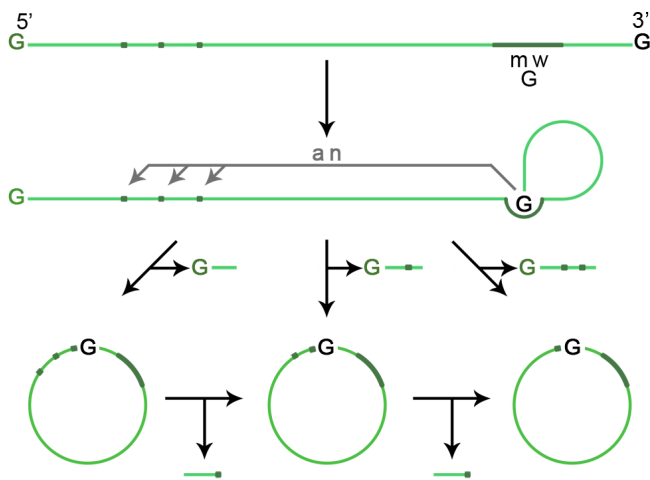
Introny grupy I katalizują wycinanie siebie samych z cząsteczki prekursora mRNA. Część wymaga wsparcia maszynerii białkowej komórki w wyniku utraty pełnej aktywności rybozemu [23]. Cechą charakterystyczną tej grupy intronów jest tzw. miejsce wiążące guanozynę (ang. *G-binding site*) oraz guanozyna stanowiąca ich ostatni nukleotyd [24,25]. Introny grupy I wykryto u eukariontów oraz niektórych bakterii, pojedyncze przypadki również w genomach wirusów. Dla organizmów eukariotycznych odnotowano ich obecność w genach jądrowych (jedynie rRNA), mitochondrialnych oraz plastydowych [26]. Omawiane introny cechuje zachowana w ewolucji struktura drugorzędowa z dość dobrze zbadanymi funkcjami poszczególnych jej części. Koniec eksonu poprzedzającego znajduje się blisko początku eksonu następnego, między innymi dzięki komplementarności skrajnych części tychże do IGS (ang. *internal guide sequence*), stanowiącej fragment intronu. Na poziomie struktury pierwszorzędowej odnotowano bardzo niewiele elementów zachowanych w ewolucji. Introny grupy I mogą zawierać znacznej długości wstawki we fragmentach nie wchodzących w skład centrum katalitycznego. Mogą być to geny kodujące np. endonukleazy nakierowane na konkretne sekwencje (ang. *homing endonuclease*). Odgrywają one rolę w mobilności intronów, a ich istnienie jest często przytaczanym argumentem, że introny grupy I są samolubnymi elementami genetycznymi. Zaobserwowano również geny kodujące maturazy, które pomagają intronowi w przyjęciu konformacji pozwalającej na zadziałanie rybozemu [27]. Koliste RNA powstałe w związku z przetwarzaniem prekursorów zawierających introny grupy I zawierają wyłącznie wiązania 3'-5'. Mogą zawierać pełną sekwencję intronu, jej fragment lub pełną sekwencję z dodatkiem niekodowanej guanozyny. Wycinanie intronów grupy I przebiega w następujący sposób: najpierw miejsce wiązania guanozyny łączy się z tym nukleotydem, pochodzącym spoza cząsteczki. Kolejny etap stanowi atak nukleofilowy grupy hydroksylowej przy węglu 3' kofaktora na wiązanie fosfodiestrowe łączące ekson poprzedzający intron z tymże. Następuje kowalencyjne przyłączenie zewnętrznej guanozyny do początku intronu oraz zwolnienie końca eksonu. Kolejny etap stanowi atak nukleofilowy właśnie uwolnionej grupy 3'OH z końca eksonu poprzedzającego na wiązanie łączące intron z eksonem następnym. Efektem są zligowane eksony oraz liniowy intron z niekodowaną guanozyną na końcu 5' (Ryc. 4).



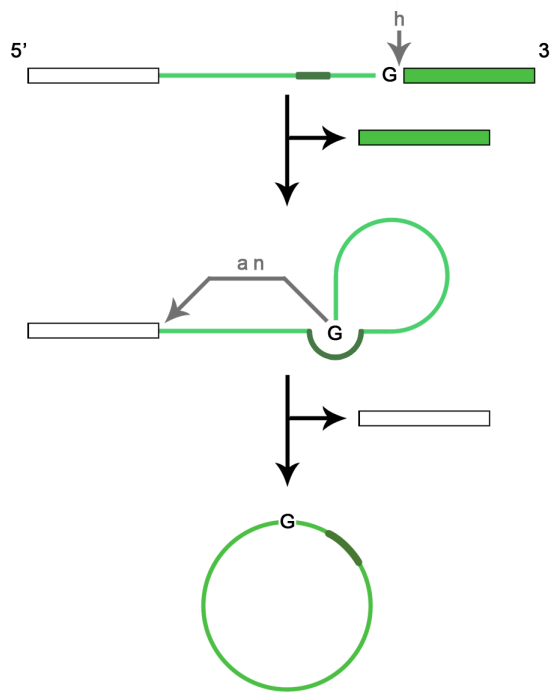
**Rycina 4.** Kanoniczne wycinanie intronów grupy I. Prostokątami oznaczono eksony, a zielone linie oraz czarne G odpowiadają elementom wchodzącym w skład intronu. G – guanozyna, mwG – miejsce wiązania guanozyny, zG – zewnętrzna guanozyna, an – atak nukleofilowy.

Po wycięciu z cząsteczki prekursora uzyskany liniowy intron grupy I z dodatkową guanozyną może ulec cyrkularyzacji na dwa sposoby. Pierwsza opcja rozpoczyna się przyłączeniem końcowej guanozyny do miejsca wiązania. Następuje atak nukleofilowy jej wolnej grupy 3'OH na wiązanie w jednym z możliwych miejsc cyrkularyzacji. W rezultacie powstaje koliste RNA (zawierające większość sekwencji intronu) oraz oligonukleotyd będący jego fragmentem od strony 5', z przyłączoną na początku niekodowaną guanozyną (pełniła rolę kofaktora przy wycinaniu). Kolista cząsteczka może zostać otwarta i ponownie ulec zamknięciu z wykorzystaniem alternatywnego miejsca cyrkularyzacji. Ma wówczas miejsce utrata kolejnego fragmentu od strony końca 5' (Ryc. 5). Lokalizacja miejsc cyrkularyzacji jest związana z lokalną strukturą drugorzędową RNA, odległością od IGS i sekwencją bezpośrednio takie miejsce poprzedzającą. Warto zauważyć, że w wyborze punktu cięcia zaobserwowano parowanie zasad z fragmentem IGS innym, niż istotny przy definiowaniu początku intronu w trakcie wycinania [28].

Druga możliwość jest znacznie mniej dokładnie poznana. Rezultatem jest wówczas kolisty intron grupy I pełnej długości, zawierający oprócz tego dołączony, niekodowany kofaktor wycinania. Powstawanie takiej cząsteczki zaobserwowano podczas eksperymentów wykonywanych w układzie *in vitro* z wykorzystaniem znakowanego radioak-



**Rycina 5.** Cyrkularyzacja wyciętego intronu grupy I. Zieloną linią oznaczono intron, ciemnozielone kropki odpowiadają miejscem cyrkularyzacji. G – guanozyna, mwG – miejsce wiązania guanozyny, an – atak nukleofilowy.

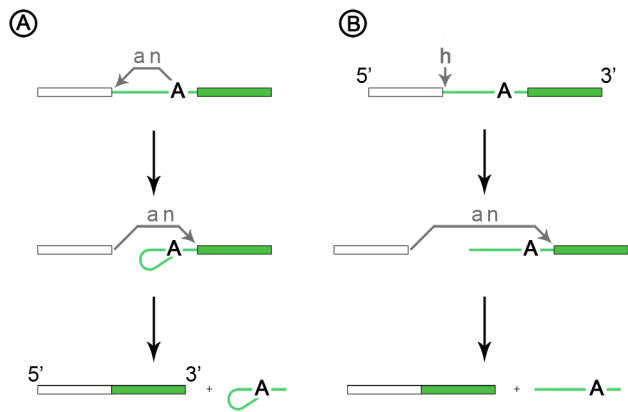


**Rycina 6.** Alternatywne przetwarzanie transkryptu zawierającego intron grupy I. Prostokątami oznaczono eksony, a zielone linie oraz czarne G odpowiadają elementom wchodzącym w skład intronu. G – guanozyna, h – miejsce hydrolizy, an – atak nukleofilowy.

tywnie trifosforanu guanozyny. Vicens i Cech [29] skupili się na przytoczeniu faktów, na których oparli swoje wnioski dotyczące tożsamości cząsteczki oraz chemicznej strony jej powstawania; mechanizm reakcji pozostaje nieznan.

Koliste RNA mogą również powstać w wyniku alternatywnego przetwarzania prekursora zawierającego intron grupy I. Rozpoczyna się on hydrolizą na złączu intronu oraz następującego po nim eksonu. W jej wyniku kończąca intron guanozyna staje się ostatnim ogniwem łańcucha nukleotydów. Łączy się ona z miejscem wiązania guanozyny. Kolejnym etapem jest atak nukleofilowy grupy 3'OH tegoż nukleotydu na wiązanie łączące ekson poprzedzający i intron. Rezultat tej ścieżki przetwarzania stanowią niezligowane eksony oraz koliste intron pełnej długości (Ryc. 6). Warto odnotować, że omawiany ciąg reakcji nie wymaga obecności zewnętrznego kofaktora. Tak przebiegająca obróbka prekursora nie skutkuje też powstaniem funkcjonalnego RNA zawierającego eksony. Zdolność tworzenia kolistych RNA pełnej długości jest właściwa wszystkim jądrowym intronom grupy I [30].

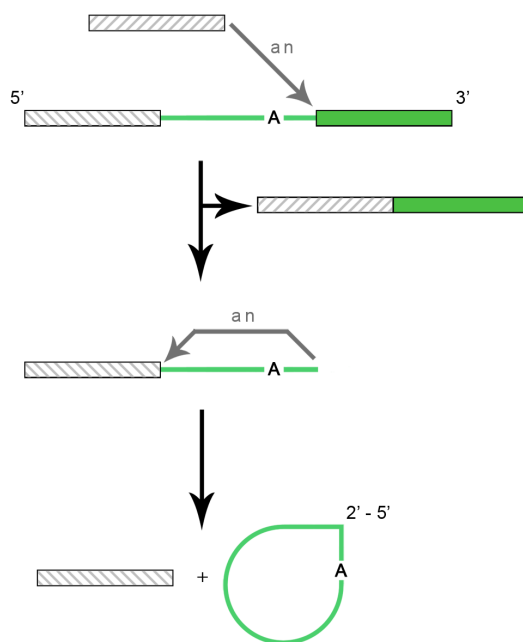
Introny grupy II stanowią rybozomy odmienne od grupy I. Występują u bakterii, niektórych archeonów i części eukariontów w genomach organellarnych [31]. Wprawdzie centrum katalityczne intronów grupy II jest uformowane z RNA, ale wiele z nich *in vitro* nie jest zdolnych do katalizy wycinania siebie samych z cząsteczki prekursora. *In vivo* większość wymaga pomocy czynników białkowych [31]. Niewiele elementów sekwencji intronów grupy II jest konserwowanych ewolucyjnie. Należą do nich między innymi odległa o 7-8 nukleotydów od końca intronu eksponowa-



**Rycina 7.** Kanoniczne wycinanie intronów grupy II (A) z powstaniem lariatu (B) inicjowane hydrolizą. Prostokątami oznaczono eksony, a zielone linie oraz czarne A odpowiadają elementom wchodzącym w skład intronu. A – adenozyina, an – atak nukleofilowy, h – miejsce hydrolizy.

na adenozyina, leżąca w tak zwanym punkcie rozgałęzienia (ang. *branchpoint adenosine*), która może inicjować kanoniczne wycinanie intronu oraz kilka krótkich odcinków uczestniczących w działaniu centrum aktywnego. Wiele intronów grupy II zawiera otwarte ramki odczytu. Kodowane w nich białka często pełnią funkcję maturaz (umożliwiają przyjęcie przez centrum aktywne rybozomu odpowiedniej konformacji) lub odgrywają istotną rolę w przemieszczaniu się intronów (tzw. *homing* oraz transpozycja – odpowiednio integracja w pozbawiony intronu allel genu oraz wstawienie w zupełnie nowe miejsce w genomie). Kanoniczne wycinanie intronów grupy II rozpoczyna się atakiem nukleofilowym grupy 2'OH należącej do eksponowanej adenozyiny na wiązanie łączące ekson poprzedzający z intronem. Rolę nukleofila może też pełnić cząsteczka wody. Kolejny krok stanowi atak 3'OH z końca eksonu poprzedzającego na granicę między intronem a kolejnym eksonem. Efekt stanowią zligowane eksony oraz intron, odpowiednio w formie lariat (Ryc. 7A) lub liniowej (Ryc. 7B).

Przetwarzanie intronów grupy II może również owocować kolistym intronem pełnej długości, któremu towarzyszą zligowane eksony (w przeciwieństwie do grupy I – tam powstanie pełnego kolistego intronu skutkuje niepołączonymi eksonami). Prowadzący do tego ciąg reakcji rozpoczyna się atakiem nukleofilowym grupy 3'OH należącej do wolnego eksonu poprzedzającego (powstałego na skutek obróbki innej cząsteczki prekursora) na wiązanie łączące intron z następnym eksonem. Atak grupy 2'OH ostatniego nukleotydu intronu na złącze eksonu wcześniejszego i intronu stanowi kolejny etap (Ryc. 8). Pierwotnie badano tę ścieżkę *in vitro* [31]. Monat i wsp. [32] potwierdzili, że część cząsteczek pre-mRNA zawierających bakteryjny intron grupy II (LI.LtrB u *Lactococcus lactis*) jest *in vivo* przetwarzanych właśnie w ten sposób, aczkolwiek klasyczne wycinanie pozostaje dominującym sposobem obróbki prekursora. Monat i Cousineau [33] sugerują, że cyrkularyzacja jest dostępna szerszej gamie intronów grupy II. W niektórych przypadkach zaobserwowano również koliste introny grupy II zawierające dodatkowe nukleotydy. Jest to związane z niedokładną identyfikacją granicy między intronem a następują-



**Rycina 8.** Alternatywne przetwarzanie pre-mRNA zawierających introny grupy II (cyrkularyzacja). Prostokątami oznaczono eksony, a zielone linie oraz czarne A odpowiadają elementom wchodzącym w skład intronu. A – adenozyina, an – atak nukleofilowy.

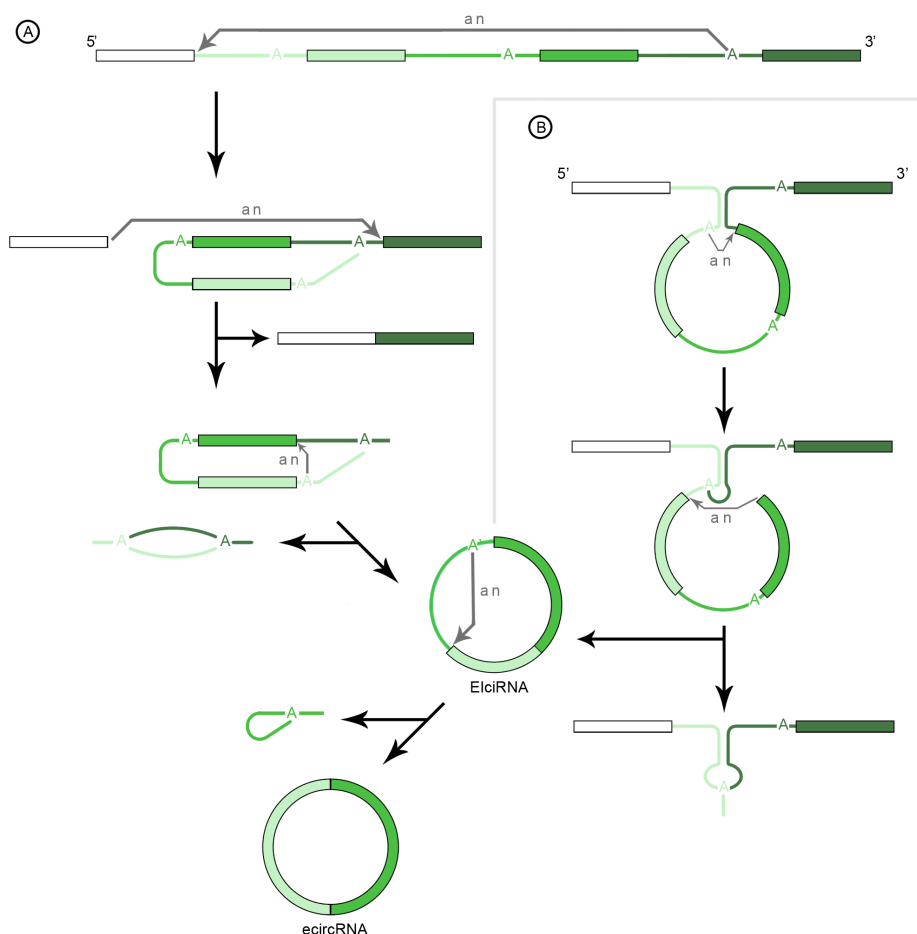
cym po nim eksonem w pierwszym kroku opisanej powyżej ścieżki przetwarzania [33]. Wolny ekson poprzedzający może pochodzić z tak zwanej reakcji SER (ang. *spliced exon reopening*). Polega ona na katalizowanym przez lariat lub liniowy wycięty intron rozdzieleniu zligowanych eksonów. Jak dotąd zaobserwowano ją *in vitro* [32]. Warto zauważyć, że wycinanie intronu poprzez cyrkularyzację wprawdzie wymaga obecności wolnego eksonu poprzedzającego, ale też skutkuje uwolnieniem takiej cząsteczki.

Introny spliceosomalne występują u eukariontów. W ich wycinaniu kluczową rolę odgrywa kompleks rybonukleoproteinowy – spliceosom. Podobnie jak autokatalityczne introny grupy II posiadają punkt rozgałęzienia, w którym znajduje się w większości przypadków adenozyina. Oprócz niej posiadają konserwowane ewolucyjnie miejsca wycinania, o konsensusowej sekwencji AG|GU na końcu 5' intronu oraz AG| na końcu 3' (| oznacza miejsce cięcia) [34]. Omawiane introny są wycinane w formie lariat, który następnie w większości przypadków jest pozbawiany rozgałęzienia (ang. *debranching*), co umożliwia stanowiącą kolejny etap degradację liniowego RNA. Część cząsteczek unika tego losu. Ich ogon 3', aż do punktu rozwidlenia, jest trawiony przez egzonukleazy. Tak powstałe cząsteczki kolistego RNA są określane mianem ciRNA (ang. *circular intronic RNA* [2]). W ciągu ostatnich lat pojawiło się wiele opracowań na ich temat. Duża ich część dotyczy występowania ciRNA w organizmie człowieka. Zhang i wsp. [35] wysunęli przypuszczenie, że obecność określonych sekwencji w bezpośrednim sąsiedztwie początku intronu oraz punktu rozwidlenia jest niezbędna i wystarczająca, by przetwarzanie go skutkowało powstaniem ciRNA. Dla ludzkich komórek zaobserwowano jądrową lokalizację tych cząsteczek [35].

Obróbka eukariotycznych pre-mRNA zawierających introny spliceosomalne może skutkować powstaniem kolistych RNA odmiennych od opisanych powyżej. Określane są jako eksonowe (ecircRNA) oraz eksonowo-intronowe (EliciRNA) koliste RNA. W skład tych pierwszych wchodzi wycięte z prekursora i zcykularyzowane eksony, podczas gdy te drugie oprócz eksonów zawierają również introny [2,36]. Zauważono też koliste RNA utworzone z transkryptów antysensownych względem znanych pre-mRNA (CDR1as/ciRS-7) [2]. Eksonowe koliste RNA występują powszechnie u eukariontów. Część badaczy przypuszcza, że ich produkcja może być uniwersalną cechą splicingu mRNA organizmów z tej domeny. Ich powstawanie zaobserwowano dla wielu różnorodnych genów. Występują w bardzo szerokim zakresie stężeń – niektóre dominują nad liniową formą odpowiadających im transkryptów, a inne odnajduje się jedynie w śladowych ilościach. Część eksonowych circRNA jest konserwowanych ewolucyjnie [37]. Sformułowano szereg kryteriów mających umożliwić ocenę, czy wykryty RNA faktycznie należy do omawianej grupy cząsteczek. Mimo tego raportowane przez poszczególne zespoły zbiory eksonowych circRNA znacznie różnią się między sobą. Zapewne jest to związane ze zróżnicowanymi wagami przyporządkowywanymi poszczególnym kryteriom

oraz przyjętymi przez różne grupy badaczy wartościami progowymi [2]. Nie potwierdzono jednoznacznie mechanizmu powstawania eksonowych kolistych RNA, aczkolwiek dostępne dane sugerują udział spliceosomu w tym procesie [38]. Najszerzej dyskutowane teorie obejmują pomijanie eksonów oraz backsplicing [12]. Przypuszczalnie przynajmniej niektóre spośród circRNA występujących w małych ilościach powstają w wyniku błędów w przebiegu splicingu [2]. Część pre-mRNA może ulegać składaniu na kilka różnych sposobów – nie wszystkie odcinki kodujące pierwotnie zawarte w prekursorze muszą znaleźć się w końcowym mRNA. Ma to miejsce, gdy w trakcie wycinania usunięciu ulegają dwa lub więcej intronów na raz – wraz z zawartymi pomiędzy nimi eksonami. W takiej sytuacji splicing rozpoczyna się atakiem nukleofilowym grupy 2'OH adenozyiny położonej w punkcie rozwidlenia ostatniego z usuwanych łącznie intronów. Celem ataku jest wiązanie łączące ekson poprzedzający pierwszy z wycinanych intronów z tymże (Ryc. 9A). Tak przebiegający proces jest określanej pomijaniem eksonów (ang. *exon skipping*). Z powstałego lariatu usuwane są zawarte w nim introny. Jeśli nie wszystkie uległy wycięciu powstaje EliciRNA; jeśli otrzymana cząsteczka zawiera wyłącznie eksony jest określana jako ecircRNA. Zauważono, że wystąpienie wzajemnie komplementarnych, odwróconych powtórzeń w obrębie różnych intronów nale-

żących do pojedynczego transkryptu zwiększa szansę na powstawanie ecircRNA w związku z obróbką tegoż. Zapewne ma to miejsce dzięki hybrydyzacji takich odcinków, skutkującej zbliżeniem do siebie punktu rozwidlenia oraz złącza ekson-intron należących do różnych intronów. Takie ułożenie zwiększa szansę na wystąpienie ataku nukleofilowego grupy 2'OH adenozyiny z punktu rozwidlenia na wspomniane złącze. Jeśli powstała cząsteczka zawiera introny jest to EliciRNA; mogą one z niej zostać usunięte – efektem jest ecircRNA (Ryc. 9B). Tak przebiegający proces jest określanej jako *backsplicing* [37]. Przypuszcza się, że jest to częściej występujący mechanizm [12]. Zdaniem Ebbesen i wsp. [38] oba powyższe mechanizmy najprawdopodobniej są wykorzystywane, ale żaden z nich nie tłumaczy występowania kompletnie ecircRNA obserwowanych u poszczególnych organizmów. Eksonowe koliste RNA mogą zawierać jeden ekson lub wiele. Odnotowano, że duża długość eksonów lub przylegających intronów



**Rycina 9.** Powstawanie kolistych RNA zawierających eksony (z zaznaczeniem możliwych mechanizmów powstawania EliciRNA) poprzez (A) pomijanie eksonów (B) backsplicing (na podstawie [38]). Prostokątami oznaczono eksony, a zielone linie oraz litery A odpowiadają elementom wchodzącym w skład intronów. A – adenozyina, an – atak nukleofilowy.

większą szansę na powstanie ecircRNA. Również odwrotne powtórzenia flankujące ekson sprzyjają jego cyrkularyzacji. Ich wzajemna komplementarność zbliża do siebie odpowiednie miejsca wycinania. Większość ecircRNA ma lokalizację cytoplazmatyczną [38]. Li i wsp. [36] odnotowali istnienie kolistych RNA, które oprócz sekwencji eksonów zawierają również introny. Ich wyniki wskazują na przeważnie jądrową lokalizację tych cząsteczek. Odnotowali również, że omawiane ElciRNA wchodzą w interakcje z U1 snRNP (małą jądrową rybonukleoproteiną), znaną z odgrywanej roli w regulacji dojrzewania mRNA.

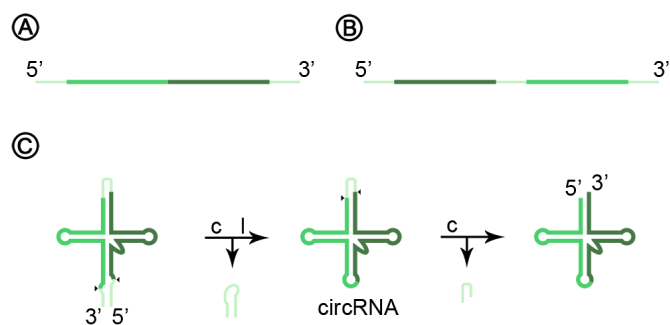
## INNE TYPY KOLISTYCH RNA

Występowanie circRNA zostało zaobserwowane jako etap pośredni w procesie dojrzewania tRNA oraz rRNA archeonów (tRNA również u niektórych glonów). Takie stadia przejściowe najprawdopodobniej są zamknięte wiązaniami 3'-5' [2,22]. Część genów tRNA archeonów oraz niektórych glonów to tak zwane geny kółście permutowane. Oznacza to, że odcinek, na podstawie którego powstanie początek tRNA znajduje się bliżej końca 3' genu, niż fragment zawierający informację o końcówce dojrzałej cząsteczki. W trakcie przetwarzania transkryptu takiego genu niezbędna jest zmiana kolejności wzmiankowanych sekwencji. Najprawdopodobniej ma to miejsce dzięki udziałowi kolistego produktu pośredniego w dojrzewaniu takich pre-tRNA. U niektórych glonów zaobserwowano występowanie cząsteczek circRNA, które mogłyby pełnić tę funkcję [39]. Zawierają one obie części dojrzałego tRNA wraz z łącznikiem występującym pomiędzy nimi w prekursorze. Zapewne powstają dzięki cięciu tworzonego przez końce transkryptu motywu BHB i następującej po nim ligacji. W ramach kolejnych przeobrażeń z takiego kolistego stadium pośredniego usuwane są ewentualne introny tRNA (również z udziałem motywów BHB; Ryc. 3). Po ich wycięciu z circRNA eliminowany jest odcinek łączący dojrzałe końce tRNA (Ryc. 10).

Przypuszczalnie produkcja tRNA z genów permutowanych archeonów przebiega w podobny sposób, aczkolwiek nie uzyskano na to bezpośredniego potwierdzenia eksperymentalnego [40].

U archeonów odcinki, z których powstają 16S oraz 23S rRNA wchodzą w skład wspólnej cząsteczki prekursora. Powstaje ona dzięki transkrypcji operonu rRNA. Oprócz tychże rybonukleinowych składników rybosomu wspomniany operon może zawierać także sekwencje, których przetwarzanie skutkuje powstaniem tRNA lub innych rRNA [41]. Kluczową rolę w obróbce transkryptu tegoż również odgrywają motywy BHB. Są umiejscowione w pewnej odległości od dojrzałych końców rRNA, więc cięcie w ich obrębie stanowi jeden ze wstępnych etapów przetwarzania transkryptu. Po wycięciu, jak w przypadku intronów, następuje cyrkularyzacja tak powstałego produktu pośredniego oraz dalsze cięcia, prowadzące do powstania dojrzałych rRNA [42].

Danan i wsp. [22] odnotowali także obecność kolistych RNA o różnorodnych końcach dla 5S rRNA oraz szeregu mRNA. Poczynione przez nich obserwacje sugerują, że zaobserwowane cząsteczki stanowią jeden z etapów ich de-



**Rycina 10.** Transkrypty genów tRNA oraz ich dojrzewanie (na podstawie [40]). (A) transkrypt genu o kanonicznej kolejności segmentów (B) transkrypt genu permutowanego (C) powstawanie tRNA z transkryptu genu permutowanego. Pogrubionymi liniami oznaczono fragmenty wchodzące w skład dojrzałego tRNA, a bladezielone linie odpowiadają elementom usuwanym w trakcie dojrzewania. Trójkąty oznaczają miejsca cięcia. c - cięcie, l - ligacja.

gradacji, niekoniecznie syntezy. Autorzy ci zauważyli też występowanie kolistych form szeregu niekodujących RNA, niepowiązanych z wycinaniem intronów. Były to między innymi (odnotowane dla *Sulfolobus solfataricus*): małe jąderkowe RNA (snoRNA, biorą udział we wprowadzaniu modyfikacji potranskrypcyjnych) z rodziny H/ACA, kilka RNA komplementarnych do transpozonów, fragment RNazy P (bierze udział w dojrzewaniu tRNA) oraz 7S RNA (wchodzący w skład kompleksu SRP, ang. *signal recognition particle*).

Starostina i wsp. [43] również zaobserwowali występowanie szeregu niekodujących circRNA niepowiązanych z przetwarzaniem intronów. W ich pracy dotyczącej *Pyrococcus furiosus* odnotowane zostało wystąpienie znacznej liczby snoRNA z rodziny C/D zarówno w formie kolistej, jak i liniowej. Zauważyli też, że C/D circRNA (podobnie jak ich formy liniowe) oddziałują *in vivo* z białkowymi składnikami kompleksu snRNP (małych jąderkowych rybonukleoprotein), więc przypuszczalnie również są funkcjonalne.

## FUNKCJE ORAZ KONSEKWENCJE WYSTĘPOWANIA KOLISTYCH RNA

Po odnotowaniu istnienia kolistego RNA nasuwa się szereg pytań. Jakie konsekwencje pociąga za sobą jego występowanie w tej formie? Jakie funkcje pełni taka cząsteczka? Zamiast odpowiedzi w wielu przypadkach dostępne są jedynie hipotezy, przypuszczenia bądź dane negatywne, temat ten jest znacznie mniej dokładnie poznany, niż omówione wcześniej kwestie. Mimo wielu przeprowadzonych badań nie poczyniono obserwacji, które świadczyłyby o translacji kolistych cząsteczek RNA [2].

W przypadku wirusa HDV, wiroidów oraz wiroidopodobnych satelitarnych RNA funkcja jest łatwa do określenia - kolisty, jednoniciowe RNA stanowi nośnik ich informacji genetycznej. Pytanie o konsekwencje takiego stanu rzeczy ma mniej trywialną odpowiedź. Kolisty RNA cechuje się odpornością na egzonukleazy. Ta cecha stanowi niepomijalną zaletę z punktu widzenia przenikającego do organizmu gospodarza patogenu, znacznie zwiększając szanse przetrwania cząsteczki genomu w



bogatej w enzymy z tej grupy cytoplazmie infekowanej komórki. Obsadzenie circRNA w roli materiału genetycznego niesie za sobą również korzyści niezwiązane bezpośrednio z przeżywalnością jednostek patogenu podczas infekcji. Pojedyncza inicjacja replikacji (dzięki opisanemu już mechanizmowi tocącego się koła) skutkuje powstaniem wielu cząsteczek potomnych. Cięcie syntetyzowanej nici do odcinków zawierających pojedynczą kopię genomu zachodzi dzięki działaniu rybozymów, zawartych w kopiowanym RNA. Nie byłoby to możliwe, gdyby niezdolne do katalizy reakcji DNA pełniło rolę nośnika informacji genetycznej. Nie ma też potrzeby, by genom patogenu zawierał gen kodujący endonukleazę, która odpowiadałaby za cięcie.

Funkcje kolistych RNA związanych z dojrzewaniem transkryptów zawierających introny grupy I oraz II nie zostały dogłębnie zbadane. Dawniej uważano te cząsteczki za rezultat błędów w procesie wycinania. W związku z tym powszechnie zakładano, że nie odgrywają znaczącej roli w organizmie. Ich postrzeganie drastycznie zmieniło się w ciągu ostatnich lat. Wyszukiwano szereg hipotez, opartych na dostępnych poszlakach. Introny grupy I oraz II są zdolne do cyrkularyzacji bez utraty informacji w nich zawartej (koła pełnej długości, opisane w odpowiednich sekcjach powyżej). Przepuszczalnie takie circRNA biorą udział w przemieszczaniu się tychże elementów genetycznych (ang. *intron mobility* [30,31]).

W przypadku intronów grupy I ciąg reakcji prowadzący do powstania circRNA pełnej długości nie skutkuje powstaniem funkcjonalnego RNA. Bywa to podkreślane, gdy są przedstawiane jako samolubne elementy genetyczne. Jak dotąd nie udało się określić funkcji pełnionej przez okręgi zawierające niepełną sekwencję intronu [30]. W przeciwieństwie do grupy I, cyrkularyzacja intronów grupy II owocuje prawidłowo połączonymi eksonami. Nie bez znaczenia dla ich przemieszczania się jest zapewne zdolność do przeprowadzania wspomnianej wcześniej reakcji SER (*spliced exon reopening*), stanowiącej potencjalne źródło wolnych eksonów poprzedzających (niezbędnych do inicjacji ścieżki prowadzącej do cyrkularyzacji).

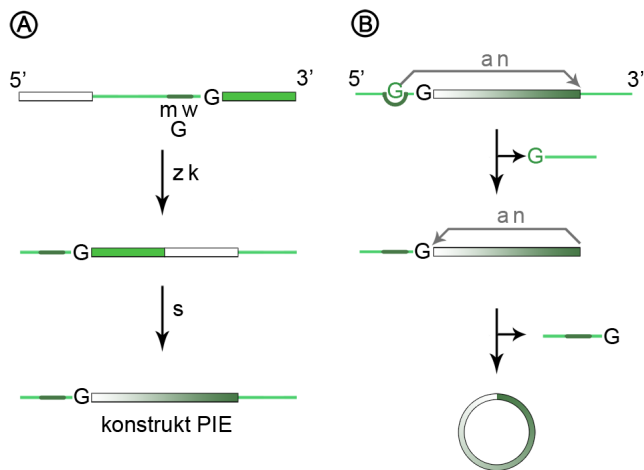
W ostatnich latach odkryto wiele kolistych RNA powstających w związku z działaniem spliceosomu w organizmach eukariotycznych. Wiele spośród circRNA należących do tej grupy jest tkankowo specyficznych lub pojawia się w konkretnym stadium rozwojowym organizmu. Część jest konserwowana ewolucyjnie, co sugeruje, że nie są one pozbawione funkcji [38]. Dotąd odnotowane dla ecircRNA funkcje obejmują między innymi modulację działania miRNA (ang. *micro RNA*, uczestniczą w regulacji ekspresji genów poprzez wstrzymanie translacji oraz destabilizację transkryptów, z którymi się wiążą). Często spotyka się określenie *miRNA sponge* (dosłownie „gąbka na miRNA”). Takie cząsteczki wpływają na ilość wolnych miRNA wiążąc część z nich. Molekuły zdolne do pełnienia funkcji *miRNA sponge* nie ulegają cięciu ze względu na niepełną komplementarność z miRNA w środkowej części dupleksu. Posiadają wiele miejsc wiązania miRNA. Kolisty RNA mogą być pośrednio istotne w rozwoju ważnych z punktu widzenia współczesnej medycy-

ny schorzeń. Dobrym przykładem jest zaobserwowane u ludzi (i nie tylko) koliste RNA ciRS-7 (znane również jako CDR1as; odpowiednio ang. *circular RNA sponge for miR-7* oraz *CDR1 antisense*). Odnotowano, że moduluje ono aktywność miRNA miR-7, które z kolei jest zaangażowane w regulację różnych procesów mogących skutkować nowotworzeniem. Przepuszczalnie również bierze udział w regulacji ekspresji  $\alpha$ -synukleiny - białka, którego akumulacja w neuronach jest powiązana z szeregiem chorób neurodegeneracyjnych, między innymi z chorobą Parkinsona [2,5]. Wspomniane wcześniej eksonowo-intronowe koliste RNA (EiCiRNA) zostały po raz pierwszy opisane stosunkowo niedawno, więc niewiele można powiedzieć o ich funkcjach. Li i wsp. [36] odnotowali, że wykryte przez nich cząsteczki oddziałują z polimerazą RNA II i uczestniczą w regulacji transkrypcji swoich genów macierzystych (podobnie jak ciRNA [35]).

Koliste RNA zaobserwowane u archeonów stanowią bardzo różnorodną grupę. Ze względu na to pełnione przez nie funkcje (zarówno potwierdzone, jak i stanowiące jak dotąd jedynie przypuszczenia) są równie zróżnicowane - uczestnictwo we wprowadzaniu modyfikacji potranskrypcyjnych, zmiana kolejności odcinków RNA w dojrzewającym transkrypcie czy wspomaganie przyjmowania właściwej konformacji cząsteczki to tylko kilka z nich. Kolisty introny rRNA przypuszczalnie odgrywają rolę w międzykomórkowej mobilności tychże elementów genetycznych [20]). Odnotowano, że circRNA powstałe w konsekwencji wycinania intronów tRNA mogą uczestniczyć w poddawaniu cząsteczek, z których zostały usunięte modyfikacjom potranskrypcyjnym. Potwierdzono to dla jednego z intronów tRNA *Haloferax volcanii*, w którym to organizmie intron tRNA<sup>Trp</sup> uczestniczy w metylacji dwóch nukleotydów w trakcie dojrzewania tegoż tRNA. Dla innych archeonów poczyniono obserwacje sugerujące podobny stan rzeczy [22]. Jak zostało wcześniej wspomniane, koliste stadia pośrednie zapewne odgrywają rolę w dojrzewaniu tRNA tworzonych na podstawie informacji zawartej w genach permutowanych. Określenie funkcji takich półproduktów nie nastęrcza trudności - dzięki nim osiągnięta jest docelowa kolejność odcinków w obrębie dojrzewającej cząsteczki. Możliwe też, że kolista forma wspomaga przyjmowanie przez RNA odpowiedniej struktury drugorzędowej. Bardziej interesująca jest jedna z sugerowanych konsekwencji posiadania przez organizm genów permutowanych - zmniejszone prawdopodobieństwo nabycia transpozonów w tych intensywnie wyrażanych częściach genomu, jakie stanowią geny tRNA [40].

## UZYSKIWANIE ORAZ POTENCJALNE ZASTOSOWANIA KOLISTYCH RNA

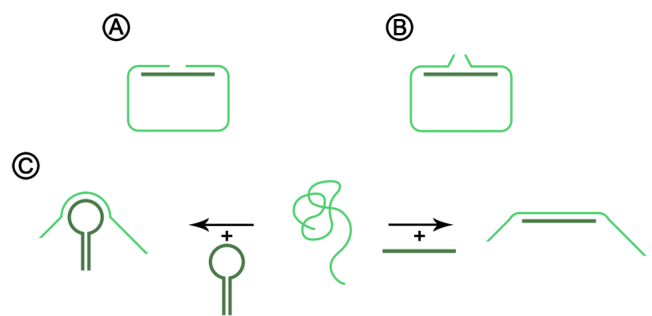
Wspomniane właściwości i funkcje kolistych RNA pozwalają mieć nadzieję na to, że w przyszłości da się je wykorzystać na wiele sposobów. Ze względu na ich powiązania z różnymi schorzeniami zapewne zostaną opracowane metody diagnostyczne oparte na wykrywaniu circRNA. Oprócz tego dzięki ich odporności na egzonukleazy, podwyższonej trwałości oraz zdolności do funkcjonowania jako *miRNA sponge* mogą się okazać bardzo użyteczne w roli cząsteczek terapeutycznych, na przykład w terapii genowej.



**Rycina 11.** Konstrukct PIE (ang. permuted intron-exon). (A) koncept, (B) zasada dzialania. Biale i zielone prostokaty symbolizuja eksony, prostokat z gradientem oznacza cyrkularyzowany odcinek, a zielone linie oraz czarne G odpowiadaja elementom wchodzacych w sklad intronu. G - guanozyna, mwG - miejsce wiązania guanozyny, zk - zmiana kolejności, s - substytucja, an - atak nukleofilowy.

CircRNA mogą zostać uzyskane na skutek przeprowadzanej *in vitro* transkrypcji specjalnie zaprojektowanego kolistego konstruktu DNA. Powstający transkrypt zawiera rybozomy typu szpilka do włosów, co sprawia, że jeszcze w trakcie syntezy ulega cięciu i cyrkularyzacji. Metoda ta bywa określana sztuczną replikacją według modelu toczącego się koła (ang. *artificial rolling circle replication* [12]). Do połączenia końców cyrkularyzowanego RNA można wykorzystać również inne rybozomy. Metoda PIE (ang. *permuted intron-exon*) zakłada wykorzystanie konstruktu bazującego na autokatalitycznym intronie grupy I. Tenże konstrukct zawiera przepołowiony intron, którego część 3' poprzedza fragment 5'. Między oryginalnymi końcami intronu umieszczony jest odcinek, który ma zostać poddany cyrkularyzacji (Ryc. 11A). Warto zauważyć, że jego sekwencja może być niemalże dowolna. Rezultatem reakcji jest pożądany kolisty RNA oraz liniowy intron podzielony na dwie części (Ryc. 11B).

W poszukiwaniu metod uzyskiwania kolistych RNA podjęto również próby wykorzystania konstrukctów opartych o introny grupy II. Zaobserwowana wydajność reakcji jest nieco wyższa niż dla konstrukctów bazujących na intronach grupy I, ale uzyskane kolisty RNA są zamknięte wiązaniem 2'-5'. Do cyrkularyzacji RNA można też wykorzystać procedury ligacji chemicznej lub enzymatycznej. Przy ich zastosowaniu (w przeciwieństwie do replikacji typu sigma *in vitro*) łączenie końców wcześniej uzyskanego liniowego kwasu rybonukleinowego stanowi odrębny etap preparatyki. Takie podejście stawia przed badaczami szereg wyzwań. Jak doprowadzić do odpowiedniej bliskości łączonych końców RNA? Jak zwiększyć szanse na intramolekularny przebieg ligacji? Jak (gdy wykorzystuje się protokoły ligacji nieenzymatycznej) zapobiec powstawaniu wiązań 2'-5'? W celu odpowiedniego ustawienia łączonych końców RNA stosuje się między innymi tak zwane szyny (ang. *splint*). Są to krótkie oligonukleotydy, które poprzez hybrydyzację z obydwoma końcami cyrkularyzowanej cząsteczki zapewniają ich wzajemną



**Rycina 12.** Wykorzystanie szyn (ang. splint) w cyrkularyzacji RNA: (A) i (B) dla zapewnienia bliskości łączonych końców; (C) w celu zapobieżenia powstawaniu niepożądanych struktur drugorzędowych (na podstawie [12]). Jasnozielone linie oznaczają cyrkularyzowany RNA, a ciemnozielone - szyny.

bliskość (Ryc. 12). Wykorzystywane w niektórych procedurach szyny mogą też pełnić inne funkcje (patrz niżej).

Zwiększenie szansy na ligację końców należących do pojedynczej molekuly z reguły osiąga się poprzez pracę z niewielkimi stężeniami kwasów nukleinowych [12]. Przy zastosowaniu ligacji chemicznej (nieenzymatycznej) wcześniej uzyskanego RNA uniknięcie powstawania wiązań 2'-5' jest możliwe na przykład poprzez wykorzystanie 2'-deoksyrybonukleotydu w roli ostatniego ogniwa cyrkularyzowanej cząsteczki. W eksperymentach obejmujących enzymatyczną cyrkularyzację RNA najczęściej wykorzystuje się ligazy kodowane w genomie bakteriofaga T4, zaangażowane w naprawę pęknięć RNA. Każda z nich jest w stanie połączyć fosforylowany koniec 5' z końcem 3' posiadającym grupę hydroksylową. Aby osiągnąć taki stan rzeczy w zależności od sposobu uzyskania cyrkularyzowanej cząsteczki może się okazać niezbędna modyfikacja (przykładowo fosforylacja lub defosforylacja) jej końców. Większość opracowanych protokołów ligacji enzymatycznej nadaje się do modyfikacji RNA do pół kilobazy; przy dłuższych pojawiają się problemy związane ze strukturą drugorzędową przyjmowaną przez cyrkularyzowaną cząsteczkę. Wykorzystywane w uzyskiwaniu kolistych RNA enzymy faga T4 to ligaza DNA, ligaza 1 RNA i ligaza 2 RNA. Różnią się nieco charakterem, a co za tym idzie również sposobem wykorzystywania. Ligaza DNA łączy znajdujące się blisko siebie końce RNA w obrębie dupleksu RNA-DNA. Przy ligacji z jej użyciem wykorzystuje się wcześniej wspomniany szyny DNA. Celem tego zabiegu jest nie tylko zapewnienie bliskości końców cyrkularyzowanej cząsteczki. Dzięki ich obecności uzyskuje się dupleks RNA-DNA, który umożliwia zajście reakcji (Ryc. 12A). W niektórych przypadkach wykorzystuje się bardzo długie szyny (bliskie długości cyrkularyzowanej cząsteczki), wiąże się to jednak z ryzykiem pojawienia się niepożądanych struktur drugorzędowych w obrębie tychże. Ligaza 1 RNA łączy końce jednoniciowego RNA. W związku z tym wykorzystywane wraz z nią szyny mają nieco inny charakter. Ich oddziaływanie z końcami cyrkularyzowanego RNA pozostawia po dwa-trzy skrajne nukleotydy łączonych końców niezwiązane (Ryc. 12B). Oprócz szyn wykorzystuje się też pomocnicze oligonukleotydy zapobiegające przybieraniu przez ligowany RNA niepożądanych struktur drugorzęd-

dowych. Najczęściej są one w całości komplementarne do odcinka cyrkularyzowanej cząsteczki, który ma tendencję do zwijania się w utrudniającą zajęcie reakcji konformację. Oprócz tego stosuje się też cząsteczki pomocnicze o strukturze spinki do włosów, których jednoniciowy fragment oddziałuje z problematycznym odcinkiem substratu (Ryc. 12C). W przeciwieństwie do ligazy 1 RNA, ligaza 2 RNA bardziej wydajnie łączy końce w obrębie dwuniciowych RNA, niż jednoniciowych. Ze względu na to bywa wykorzystywana w sytuacji, w której bliskość końców jest zapewniona przez struktury drugorzędowe przybierane przez cyrkularyzowaną cząsteczkę. Istnieje również szereg innych ligaz, których właściwości czynią je potencjalnie użytecznymi w cyrkularyzacji RNA [12]. Opracowano również metodę uzyskiwania kolistych RNA na drodze syntezy chemicznej w fazie stałej (ang. *solid phase synthesis*). Pozwala ona na uzyskanie jedynie bardzo krótkich (2-21 nukleotydów) circRNA. Średnia wydajność tej metody to ~15% [12].

Ze względu na rozpowszechnienie circRNA i coraz to nowe właściwości wychodzące na światło dzienne można przypuszczać, że zarówno stan wiedzy na temat kolistych RNA, jak i wachlarz ich zastosowań czeka w najbliższej przyszłości dynamiczny rozwój.

## PIŚMIENNICTWO

- Wang PL, Bao Y, Yee MC, Barrett SP, Hogan GJ, Olsen MN, Dinneny JR, Brown PO, Salzman J (2014) Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One* 9: e90859
- Lasda E, Parker R (2014) Circular RNAs: diversity of form and function. *RNA* 20: 1829-1842
- Flores R, Grubb D, Elleuch A, Nohales MÁ, Delgado S, Gago S (2011) Rolling-circle replication of viroids, viroid-like satellite RNAs and hepatitis delta virus: variations on a theme. *RNA Biol* 8: 200-206
- Hansen TB, Wiklund ED, Bramsen JB, Villadsen SB, Statham AL, Clark SJ, Kjems J (2011) miRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *Embo J* 30: 4414-4422
- Hansen TB, Jensen TI, Clausen BH, Bramsen JB, Finsen B, Damgaard CK, Kjems J (2013) Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* 495: 384-388
- Ding B (2009) The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 47: 105-131
- Diener TO (1991) Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *FASEB J* 5: 2808-2813
- Flores R, Hernández C, Martínez de Alba AE, Daròs JA, Di Serio F (2005) Viroids and viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol* 43: 117-139
- Flores R, Gas ME, Molina-Serrano D, Nohales MÁ, Carbonell A, Gago S, de la Peña M, Daròs JA (2009) Viroid replication: rolling-circles, enzymes and ribozymes. *Viruses* 1: 317-334
- Diener TO (1986) Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 58-62
- Gas ME, Hernández C, Flores R, Daròs JA (2007) Processing of nuclear viroids *in vivo*: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathog* 3: e182
- Petkovic S, Müller S (2015) RNA circularization strategies *in vivo* and *in vitro*. *Nucleic Acids Res* 43: 2454-2465
- Nohales MÁ, Molina-Serrano D, Flores R, Daròs JA (2012) Involvement of the chloroplastic isoform of tRNA ligase in the replication of viroids belonging to the family Avsunviroidae. *J Virol* 86: 8269-8276
- Elena SF, Dopazo J, de la Peña M, Flores R, Diener TO, Moya A (2001) Phylogenetic analysis of viroid and viroid-like satellite RNAs from plants: a reassessment. *J Mol Evol* 53: 155-159

- Hughes SA, Wedemeyer H, Harrison PM (2011) Hepatitis delta virus. *Lancet* 378: 73-85
- Salehi-Ashtiani K, Lupták A, Litovchick A, Szostak JW (2006) A genome-wide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science* 313: 1788-1792
- Lazinski DW, Taylor JM (1995) Intracellular cleavage and ligation of hepatitis delta virus genomic RNA: regulation of ribozyme activity by cis-acting sequences and host factors. *J Virol* 69: 1190-1200
- Jeng KS, Su PY, Lai MM (1996) Hepatitis delta antigens enhance the ribozyme activities of hepatitis delta virus RNA *in vivo*. *J Virol* 70: 4205-4209
- Reid CE, Lazinski DW (2000) A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 424-429
- Lykke-Andersen J, Aagaard C, Semionov M, Garrett RA (1997) Archaeal introns: splicing, intercellular mobility and evolution. *Trends Biochem Sci* 22: 326-331
- Salgia SR, Singh SK, Gurha P, Gupta R (2003) Two reactions of *Haloflex volcanii* RNA splicing enzymes: joining of exons and circularization of introns. *RNA* 9: 319-330
- Danan M, Schwartz S, Edelheit S, Sorek R (2012) Transcriptome-wide discovery of circular RNAs in Archaea. *Nucleic Acids Res* 40: 3131-3142
- Simon D, Fewer D, Friedl T, Bhattacharya D (2003) Phylogeny and self-splicing ability of the plastid tRNA-Leu group I Intron. *J Mol Evol* 57: 710-720
- Cech TR (1990) Self-splicing of group I introns. *Annu Rev Biochem* 59: 543-568
- Nielsen H, Johansen SD (2009) Group I introns: moving in new directions. *RNA Biol* 6: 375-383
- Haugen P, Simon DM, Bhattacharya D (2005) The natural history of group I introns. *Trends Genet* 21: 111-119
- Ho Y, Waring RB (1999) The maturase encoded by a group I intron from *Aspergillus nidulans* stabilizes RNA tertiary structure and promotes rapid splicing. *J Mol Biol* 292: 987-1001
- Been MD, Cech TR (1987) Selection of circularization sites in a group I IVS RNA requires multiple alignments of an internal template-like sequence. *Cell* 50: 951-961
- Vicens Q, Cech TR (2009) A natural ribozyme with 3',5' RNA ligase activity. *Nat Chem Biol* 5: 97-99
- Nielsen H, Fiskaa T, Birgisdottir AB, Haugen P, Einvik C, Johansen S (2003) The ability to form full-length intron RNA circles is a general property of nuclear group I introns. *RNA* 9: 1464-1475
- Lehmann K, Schmidt U (2003) Group II introns: structure and catalytic versatility of large natural ribozymes. *Cri Rev Biochem Mol Biol* 38: 249-303
- Monat C, Quiroga C, Laroche-Johnston F, Cousineau B (2015) The L.LtRb intron from *Lactococcus lactis* excises as circles *in vivo*: insights into the group II intron circularization pathway. *RNA* 21: 1286-1293
- Monat C, Cousineau B (2016) Circularization pathway of a bacterial group II intron. *Nucleic Acids Res* 44: 1845-1853
- Warf MB, Berglund JA (2010) Role of RNA structure in regulating pre-mRNA splicing. *Trends Biochem Sci* 35: 169-178
- Zhang Y, Zhang XO, Chen T, Xiang JF, Yin QF, Xing YH, Zhu S, Yang L, Chen LL (2013) Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell* 51: 792-806
- Li Z, Huang C, Bao C, Chen L, Lin M, Wang X, Zhong G, Yu B, Hu W, Dai L, Zhu P, Chang Z, Wu Q, Zhao Y, Jia Y, Xu P, Liu H, Shan G (2015) Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* 22: 256-264
- Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, Slevin MK, Burd CE, Liu J, Marzluff WF, Sharpless NE (2013) Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* 19: 141-157
- Ebbesen KK, Kjems J, Hansen TB (2016) Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochim Biophys Acta* 1859: 163-168

39. Maruyama S, Sugahara J, Kanai A, Nozaki H (2010) Permuted tRNA genes in the nuclear and nucleomorph genomes of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 27: 1070-1076
40. Soma A (2014) Circularly permuted tRNA genes: their expression and implications for their physiological relevance and development. *Front Genet* 5: 63
41. Garrett RA, Dalgaard J, Larsen N, Kjems J, Mankin AS (1991) Archaeal rRNA operons. *Trends Biochem Sci* 16: 22-26
42. Tang TH, Rozhdestvensky TS, D'Orval BC, Bortolin ML, Huber H, Charpentier B, Branlant C, Bachelier JP, Brosius J, Hüttenhofer A (2002) RNomics in Archaea reveals a further link between splicing of archaeal introns and rRNA processing. *Nucleic Acids Res* 30: 921-930
43. Starostina NG, Marshburn S, Johnson LS, Eddy SR, Terns RM, Terns MP (2004) Circular box C/D RNAs in *Pyrococcus furiosus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14097-14101

## Characteristics of circular ribonucleic acid molecules (circRNA)

Daria Zganiacz\*, Rafał Milanowski✉

Department of Molecular Phylogenetics and Evolution, Institute of Botany, Faculty of Biology, Biological and Chemical Research Center, University of Warsaw, ul. Żwirki i Wigury 101, 02-089 Warszawa, Poland

✉e-mail: milan@biol.uw.edu.pl

\*Student of College of Inter-Faculty Individual Studies in Mathematics and Natural Sciences, University of Warsaw

**Key words:** circular RNA, RNA genome, intron, exon, RNA maturation

### ABSTRACT

Ribonucleic acids appear in many forms, including circular (circRNA). It is much more widespread than originally thought. For HDV, viroids & viroid-like satellite RNAs circular RNAs act as genomes. It has also been observed in connection with the maturation of archaeal pre-rRNAs & pre-tRNAs – as an end product or transitional stage. In Archaea there are also circular forms of several snoRNAs and other RNAs known for their regulatory functions. Many circRNAs might appear in the course of maturation of pre-mRNAs containing spliceosomal, group I or group II introns. Observed molecules consist of exclusively intronic or exonic sequences. Particles containing both at once were detected too. Intronic circRNAs may take part in their maternal genetic elements' mobility. Exonic circRNAs are often tissue-specific or characteristic for a particular stage of the organism development. Some can modulate miRNA activity. Exonic circRNAs may be associated with several neurodegenerative diseases. Circular RNAs might prove useful in therapeutics and diagnostics.