# 13. Mutagenezis, géncsendesítés

Adott fehérjék *in vivo* szerepét a leginkább úgy vizsgálhatjuk, ha az illető fehérjét megváltoztatjuk, vagy egyszerűen eltüntetjük a sejtekből. A molekuláris biológiai módszerek alkalmazása lehetőséget ad nekünk erre. A legismertebb módszereket szeretnénk ebben a fejezetben összefoglalni.

## 13.1. Mutagenezis

Mutagenezis alatt valamilyen permanens genetikai változás generálását értjük. Már a genetika hőskorában felismerték, hogy a radioaktív sugárzás vagy bizonyos vegyületek random mutációkat generálhatnak az élőlények genomjában. Az így létrehozott, még életképes élőlények vizsgálatával a genetika tudománya jelentős haladást tudott elérni. Ma már inkább nem a random, hanem az irányított mutációk hatására létrejövő változások vizsgálatán van a hangsúly.

**13.1.1. Irányított pontmutációk generálása**

Ilyenkor **egyetlen nukleotidot** cserélnek ki egy tetszőleges másik nukleotidra. A módszer elve nagyon egyszerű, és mindig ugyanaz: az egyszálú DNS-re egy olyan **primert** hibridizáltatnak, amelynek a **közepén** ott van a **mutáns nukleotid**. Polimerázzal megszintetizálják a DNS másik szálát; a képződő dupla szálú DNS egyik szála mutáns, a másik szála „vad” típusú lesz. A következő replikációs lépés után az egyik dupla szálú DNS mindkét szála mutáns, a másik dupla szálú DNS mindkét szála „vad” típusú lesz (13-1. ábra). Hogy a mutáns DNS-ek arányát megnöveljék a vad típusúakhoz képest, többféle módszert is kidolgoztak.

13-1. ábra

http://www.tutorgigpedia.com/ed/PCR\_mutagenesis

2013.10.10.

13.1.1.1. A Kunkel-módszer

A mutagenizálni kívánt DNS-szakaszt M13 bakteriofágba illesztjük, mellyel dUTP-áz és uracil-N-glikoziláz-deficiens E. colit fertőzünk. A **DNS-hibajavító mechanizmusra deficiens** baktériumokban a replikáció során olyan egyszálú M13 fágok keletkeznek, melyek DNS-ében a timin bázisok helyett néha uracil található. A fágok egyszálú DNS-ére tervezett, pontmutációt hordozó primer segítségével *in vitro* megszintetizáljuk a másik szálat. Ha ezt a dupla szálú DNS-t olyan E. coli sejtbe transzformáljuk, amelynek a DNS-hibajavító mechanizmusa ép, akkor a dezoxi-uridinek kivágódnak a „vad” típusú láncból, a lánc darabokra szakad, és a keletkező új M13 fágok már csak a mutáns szálat fogják tartalmazni (13-2. ábra).

13-2. ábra

http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/lect33/kunkel.gif

2013.10.10.

13.1.1.2. A metiláción alapuló módszer

Ebben az esetben a mutáltatni kívánt DNS-szakaszt hordozó plazmidot olyan baktérium-törzsben kell szaporítani, amelyben a **Dam metiláz** (DNA adenin methylase) enzim génje **nincs kiütve**. A baktériumból izolált, **metilált plazmidhoz** két mutáns primer és **lineáris PCR-reakció** segítségével megszintetizáljuk a komplementer szálakat, amelyek, mivel a csőben nem voltak sem metilázok, sem SAM (amelytől a metilcsoport származik), **nem tartalmaznak metilációt**. A PCR-reakció végén a kész egyszálú plazmidok hibridizálnak egymással. Többségben lesznek azok, amelyek egyik szálukon sem tartalmaznak metilációt. Ha **DpnI** restrikciós endonukleázt adunk a rendszerhez, az felismeri és **emészti** a Dam metiláz által **metilált DNS-szekvenciákat**. Azokban a kétszálú plazmidokban, amelyekben egyik szálon sincs metiláció, nem történik emésztés. Mivel utóbbiak tartalmazzák a mindkét szálon mutáns nukleotidot, és ezek a zárt (mindkét szálon 1-1 nicket tartalmazó) plazmidok tudnak csak megfelelő hatásfokkal transzformálódni, a szelektív táptalajon kinövő baktériumkolóniák szinte mindegyike ezt a mutáns plazmidot fogja tartalmazni (13-3. ára).

13-3. ábra

http://www.lesbellesregions.fr/rhonealpes/media/2012/09/site-directed-mutagenesis.jpg

2013.10.10.

13.1.1.3. Restrikciós hasításon alapuló módszer

A módszer során nem egy, hanem **két mutáció együttes bevitelére** van szükség. Az inzertet tartalmazó plazmid két szálát hővel elválasztjuk egymástól, majd kétféle primert keverünk hozzá: az egyik primer homológ az inzert egy részével és tartalmazza a mutáns nukleotidot, a másik primer a plazmid egy olyan szakaszára homológ, amelyen a plazmidot csak egy helyen hasítani képes **restrikciós enzim hasítóhelye** van. Ennek a primernek az enzim **felismerőhelyét elrontó pontmutáció** van a közepén. Amikor a hőmérséklet gyors csökkentésével a plazmidhoz hibridizáltatjuk a primereket, nagy az esélye annak, hogy adott templátra **vagy mindkét primer** hibridizálódik, vagy a templát komplementer szála kapcsolódik vissza, és akkor **egyik primer sem** képes erre. Azokra a templátokra, ahova a primerek tapadtak, a primerek, dNTP-k és polimeráz (klenow fragment) segítségével megszintetizálják a komplementer szálakat. A dupla szálú plazmidokat ezután az említett **restrikciós endonukleázzal** kezelik, majd baktériumokba transzformáljuk. Amely plazmidokban a restrikciós hely elmutálódott (és nagy eséllyel a másik primer által bevitt mutáció is jelen van az egyik szálon) nem történik emésztés, **a cirkuláris plazmid könnyen transzformálódik**. Az emésztett nyílt plazmidok transzformációs hajlandósága több nagyságrenddel kisebb. A plazmidokat tartalmazó klónokat antibiotikummal szelektáljuk. A plazmidok a replikáció során létrehoznak vad és két helyen pontmutációt tartalmazó utódplazmidokat. A baktériumkultúrából történt plazmidizolálás után **újabb restrikciós emésztésnek** vetik alá a konstrukciókat: csak a mutáns plazmidok maradnak cirkularizálva, a vad típusúak linearizálódnak. Újra transzformálva a baktériumokat azok most már csak a **mindkét szálon mutációt** tartalmazó konstrukciókat fogják tartalmazni (13-4. ábra).

13-4. ábra

13.1.1.4. A megaprimer-módszer

Pontmutáció generálásához nagyon kézenfekvő és jó eszköz a PCR használata: a megaprimer-módszert akkor lehet használni, ha a **pontmutációt** nem a hosszú DNS-szakasz közepére, hanem valamelyik **széléhez közelebb** szeretnénk generálni. A feladat **két, egymást követő PCR-reakcióval** oldható meg. Előbb egy rövidebb szakaszt szaporítunk fel, az egyik primert a szakasz mutációhoz közelebbi végére, a másik, mutáns primert pedig a jövendő mutációt tartalmazó rész környékére. Az első PCR eredménye egy olyan szakasz, amely az egyik végéhez közel tartalmazza a kívánt mutációt. Ennek a terméknek az egyik szála használható primernek a második PCR-reakcióban (ez a megaprimer), míg a másik primert az eredeti templát másik végére kell tervezni (13-5. ábra). (Nagyon gyakran **aszimmetrikus PCR**-t alkalmaznak, hogy az egyik szál sokkal nagyobb mennyiségben szaporodjon fel.) Ha az első két primer olvadási hőmérséklete (Tm) jóval alacsonyabb, mint a második primerpáré (a megaprimer esetén ez nem meglepő, a párját meg egyszerűen magas Tm-űre kell tervezni), a két reakció **ugyanabban a csőben, egymás után** elvégezhető, más annealing temperature-t használva. Ilyenkor a két reakció között mindössze az új primert kell a csőbe tenni, és az elfogyott dNTP-ket kell pótolni, utána azonnal indítható a második PCR-reakció. A magasabb olvadási hőmérséklet miatt az esetleg még a reakciócsőben maradt eredeti primerek nem képesek a templátra tapadni, nem zavarják a második reakciót. Ennek a módszernek nagy előnye, hogy nem kell az első reakció után PCR-fragmentet tisztítani.

13-5. ábra

13.1.1.5. Mutagenezis láncközi primerekkel

Ezt a módszert kell akkor használni, ha a pontmutációt a **DNS-szakasz közepén** kell előidézni. Itt is **két PCR-reakció** használatos, de azokat nem egymás után, hanem **egymással párhuzamosan** kell elvégezni. A DNS-szakasz két felét külön-külön szaporítjuk fel, mindkét esetben az egyik primer a pontmutáció környéki szakaszra homológ és szekvenciájában hordozza a mutáns nukleotidot. A PCR-reakciók után a megtisztított **termékeket összekeverjük**, majd magas hőmérsékletre melegítjük, hogy denaturálódjanak. Az elegyet ezután lehűtjük; az esetek többségében az egyes szálú DNS-szakaszok megtalálják a homológ párjukat. **Egy kis részük** azonban nem a párjukhoz, hanem a másik PCR-reakcióban keletkezett, egyszálúsított termék, a **mutáns primer** szekvenciáját hordozó **homológ szakaszához** tapad. Ez az összetapadt rész a két szakasz feltapadt primerének is felfogható: DNS-polimeráz (például klenow fragment) és dNTP-k segítségével **fel tudjuk tölteni** mindkét szálat. (Ez csak az 5’ túlnyúló végeket tartalmazó hibridszekvenciákra igaz, a 3’ túlnyúlókat tartalmazó hibrideket nem tudjuk kiegészíteni, hiszen 3’-5’ irányban nem haladhat a polimerizáció.) Az így képződött szakasz identikus lesz az első reakciókban a két párhuzamos PCR-hez alkalmazott templáttal, mindössze egyetlen nukleotidpárnyi különbséggel (ez lesz a bevitt pontmutáció). Ezt a szakaszt az első két PCR-ben is használt, a **szakasz végeire** tervezett primerrel lehet **felerősíteni** és ezt követően esetleg valamilyen vektorba klónozni (13-6. ábra).

13-6. ábra

**13.1.2. Random mutációk készítése PCR-rel**

Ha egy teljes fehérje funkcióvesztésének lehetséges genetikai okaira vagyunk kíváncsiak, akkor érdemes véletlenszerű mutációkkal megváltoztatni 1-1 aminosavat a fehérjék szerkezetében, és a keletkezett polipeptidláncok működését összehasonlítani. Ezen a módon nem csak **funkcióvesztéses**, hanem **új tulajdonságokkal bíró** fehérjéket is előállíthatunk. A random mutációk a fehérje cDNS-én történnek, a különböző polipeptiláncokat termelő klónok genetikai információjának visszakeresésével tudjuk őket azonosítani. Az így kapott információk segítségével a továbbiakban már célzott mutációkkal próbálhatjuk meg a fehérjék működését megváltoztatni.

A véletlenszerű mutációk generálásának az alapja a **Taq polimeráz** nem túl jó **fidelitása** (viszonylag sokszor hibáz, a többi hőstabil polimerázhoz képest). A másolás pontosságát **MnCl2** a PCR-reakcióelegyhez történő adásával és egymástól **eltérő koncentrációjú dNTP-k** alkalmazásával tudjuk tovább rontani. A reakciót optimalizálni kell: A PCR hatékonyságát, az amplifikálni kívánt szakasz hosszát is figyelembe kell vennünk, amikor a megfelelő reakcióelegyet összeállítjuk. Nem szabad, hogy a reakció során egy adott hosszúságú DNS-szakaszon túl sok mutáció keletkezzen (mert akkor szinte biztos, hogy funkcióképtelen fehérjét kapunk). Minél nagyobb a PCR-reakció ciklusszáma, annál valószínűbb valamilyen mutáció keletkezése. Ebből következik, hogy nem csak a dNTP-k arányát, vagy a Mn2+ koncentrációját érdemes változtatni, de a templát mennyiségével és a reakció ciklusszámával is befolyásolható a mutáció gyakorisága.

Egy tipikusnak mondható reakcióelegy 1-1 mM dCTP-t és dTTP-t, 0,2 mM dGTP-t és dATP-t, 0,5 mM MnCl2-t, 2 µM 5’ és 3’ primert, és megfelelő DNS-templátot tartalmaz. A ciklusszámot általában érdemes alacsonyan, 15 ciklus körül tartani.

**13.1.3. Deléciók készítése**

13.1.3.1. Deléció készítése exonukleázokkal

Azt a DNS-szakaszt, aminek a közepéből el szeretnénk távolítani egy darabot, egy vektorba illesztjük. Ezután az adott DNS-szakasz közepén lévő restrikciós endonukleáz-hasítóhelynél **linearizáljuk** a plazmidot. Ilyenkor a kérdéses DNS-szakasz két darabban, a linearizált konstrukció **két végén található**. Most kétféle módon lehet rövidíteni a lineáris DNS végeit: vagy **Bal 31 nukleázt** használunk (csak emlékeztetőül: a Bal 31 kettős szálú DNS exonukleáz), vagy **exonukleáz III és S1 nukleáz keverékét** (az exonukleáz III a dsDNS 3’ végétől emészti vissza az egyik szálat, az S1 nukleáz pedig az egyszálú nukleinsavakra specifikus, leemészti a keletkező 5’ túlnyúló végeket). Az exonukleáz III viszonylag lassú működése miatt a második eset jobban kontrollálható, a gyakorlatban inkább ez használatos. Az enzimreakció leállítása után **statisztikusan különböző hosszúságú** fragmenteket kapunk (az emésztés hosszának változtatásával is manipulálhatjuk a keletkezett fragment hosszát). A nyílt DNS-eket (ez most már egy heterogén populáció) újra **összeligáljuk** (13-7. ábra), és a transzformáció után keletkezett klónok tulajdonságait vizsgálhatják (például: mekkora deléciót tud elviselni egy promóter régió, hogy még képes legyen meghajtani a mögötte ülő riportergént).

13-7. ábra

13.1.3.2. Deléció készítése hiányos primerrel

Az előző módszertől eltérően itt pontosan, nukleotidra meg lehet határozni, hogy mely DNS-szakasz essen ki egy adott génből. Készíteni kell egy primert, amelynek **két vége homológ** a kiejteni kívánt darab melletti szekvenciákkal, de a közepén nincs semmi, ami kiejteni kívánt szekvenciával kapcsolódhatna. A manipulálni kívánt gént tartalmazó plazmidot egyszálúsítjuk (hővel), majd gyors hűtéssel hozzáhibridizáltatjuk a primert (vektornak használhatunk **egyszálú M13 fágot** is). A hibridizáció következményeként az eltüntetni kívánt **egyszálú szakasz** mintegy **kitüremkedik** a hibridizált szakaszok közül. A másik szál kiegészítése és a ligáció után a plazmidot olyan **enzimatikus kezelésnek** vetjük alá, mely **eltávolítja a hurkot** (például S1 nukleázos kezelés vagy restrikciós endonukleázzal nick vágása, majd ezt követő exonukleáz III-as emésztés). A hurok helyére megszintetizálható a primerrel homológ szekvencia, amely már nem tartalmazza a deletált szakaszt (13-8. ábra).

13-8. ábra

http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Genetic\_Engineering5E-In\_Vitro\_Mutagenesis\_files/image005.jpg

2013.10.13.

Nem feltétlenül kell egyszálúsított plazmid, vagy M13 fág-genom alapú konstrukciót használnunk templátnak. Ha nem túl hosszú szakaszt akarunk eltávolítani, akkor bármilyen kétszálú DNS-darabon előidézhetjük a deléciót, ha egy PCR-reakciót végzünk a kivágandó szakasz nukleotidjait tartalmazó primer segítségével (13-9. ábra). Ugyanezen a módon tudunk rövidebb inzerteket a DNS-szakaszunkba ültetni, ilyenkor az egyik primer a közepén tartalmazza az extra nukleotidokat (13-9.) ábra.

13-9. ábra

http://eu.idtdna.com/pages/images/decoded/figure-1.png?sfvrsn=0

2013.10.13.

13.1.3.3. Deléció készítése PCR-rel

Ez a módszer nagyon hasonlít ahhoz, amikor pontmutációt idéztünk elő láncközi primerek segítségével. A különbség annyi, hogy nem kell mutáns primereket használni, a primereket a megmaradó szekvenciarészek végeire készíttetjük. A primereket úgy kell tervezni, hogy 5’-végükön a kapcsolódni kívánt szekvenciával homológ farkat tartalmazzanak. A PCR-reakció ezután ugyanazt a templátot tartalmazó két párhuzamos csőben zajlik. A termékek végeinek hibridizáltatása után kiegészíthető a teljes szál, majd PCR-rel történt szaporítás után megkapjuk a deléciót tartalmazó terméket (13-10. ábra).

13-10. ábra

http://www.mikeblaber.org/oldwine/bch5425/lect24/IMG00006.GIF

2013.10.10.

13.1.3.4. Génfúzió PCR-rel

A génfúzió készítése azért került ebbe az alfejezetbe, mert gyakorlatilag ugyanúgy zajlik, mint a deléció készítése PCR-rel (13-10. ábra). A különbség csak annyi, hogy a párhuzamos PCR-reakciónkban különböző DNS-templátot használunk. (Használhatjuk természetesen ugyanazt a templátot is, ha az összefűzni kívánt két szakasz ugyanazon a DNS-láncon van. Ilyenkor a két szakasz által közrefogott szekvenciát technikai szempontból tekinthetjük akár egy óriási, deletálandó szekvenciának is.)

**13.1.4. Génkiütött állatok**

A génkiütött állatok nagyon fontos objektumai a kutatásoknak. A gén eltávolításával **eltávolítunk egy fehérjét**, aminek így a sejtben betöltött szerepéről (mennyire fontos, milyen folyamatokban játszik szerepet stb.) rengeteg információt kaphatunk. A génkiütés technikáját használhatjuk transzgenikus állatok létrehozására is. Mivel a technika egéren a leggyorsabb és a legjobban kidolgozott, ezért most ezen a példán fogjuk ezt bemutatni.

A fejlődő egérembriót hólyagcsíra (**blastocysta**) állapotban kivesszük az anyaállatból, majd az **embryoblast** sejtjeit izolálják (**pluripotens** embrionális **őssejtek**). Az izolált sejtekbe olyan konstrukciókat transzfektálunk, melyek tartalmazzák a kiütni kívánt gén **két végével homológ** szekvenciákat, de a középső szakasz helyett egy saját promóterrel meghajtott **antibiotikum-rezisztencia gén** található. Ha ez a szakasz homológ rekombinációval **integrálódik a genomba**, akkor azt vagy az anyai, vagy az apai eredetű kromoszómán teszi (a két kromoszómán egy időben történő integrációnak az esélye csaknem nulla). Ebben az esetben a sikeresen rekombinálódott sejtek hosszú antibiotikumos kezelésekre is rezisztensek lesznek, míg a transzgént nem integrált sejtek elpusztulnak. Egy-egy életben maradt sejtből osztódással **klónok keletkeznek**, ezeket külön-külön szaporítjuk tovább. Amikor már elég sejt keletkezett, akkor másik anyaállatból egy **újabb blastocystát** veszünk ki, és abba **injektálják** a transzgénikus sejteket (13-11. ábra). A sejtek oda fognak tapadni a hólyagcsíra eredeti embryoblast sejtjeihez, fejlődésükben, működésükben gyakorlatilag megkülönböztethetetlenné válnak tőlük.

13-11. ábra

http://en.wikipedia.org/wiki/Knockout\_mouse

2013.10.13.

A blastocystákat egy álvemhessé tett **anyaegérbe visszajuttatjuk**, amiben azok **kiméra egérkékké** fejlődnek: bizonyos szerveik, testtájaik a blastocysta eredeti („vad típusú”) sejtjeiből erednek, mások a transzgénikus sejtekből. Szerencsés esetben a **gonádok** a **génkütött sejtekből** fejlődnek ki, ezért az egerek leendő ivarsejtjei is génkiütöttek lesznek. Ha két ilyen egér párosodik egymással, az öröklés szabályai szerint az utód 25%-os valószínűséggel mind a két szülőtől a génkiütött kromoszómát örökli, a gén hiánya **fenotípusosan is meg fog** nála **jelenni** (13-12. ábra).

13-12. ábra

http://www.linguamedica.jp/mita/20030618/knockout/knockout\_files/image004.gif

2013.10.13.

A génkiütés nagyon jó módszer, de nem mindig tökéletes megoldás. A **heterokromatin** állományban való elhelyezkedés, a kiterjedt **metiláció**, vagy a génben lévő **repetitív szekvenciák** gyakorisága a genomban megakadályozhatja, hogy célzott, sikeres génkiütés történjen. Előfordulhat, hogy a gén olyan fontos fehérjét kódol, amelynek a hiánya már az embrionális korban letális. Ilyenkor a fehérje *in vivo* szerepét csak embrionális korban, vagy **kondicionális mutánsokon** tudjuk vizsgálni. (A kondicionális mutációk csak adott körülmények között jelennek meg fenotípusosan.) Az is megtörténhet, hogy a gén kiütése valamilyen oknál fogva (pl. redundancia) semmiféle hatással nincs az egér életére. Bár evolúciósan viszonylag közel vannak, mégsem biztos, hogy a génkiütött egerekben történő változások emberekben is hasonló módon manifesztálódnának.

## 13.2. Géncsendesítés

Bizonyos fehérjék sejtből való eltüntetésére nem a génkiütés az egyetlen módszer. A fehérjék termelődését meg lehet akadályozni úgy is, hogy a gént kódoló DNS-szakasz épségben megtalálható az adott élőlény genomjában. A gének expresszióját elvben akadályozni lehetne az adott mRNS átírásának gátlásával. Ezt úgy lehetne megoldani, hogyha csakis az adott génre specifikus transzkripciós faktor működését gátolnánk valahogy. Az eukarióta sejtekben azonban egy-egy transzkripciós faktor több gén működéséért is felelős, és egy adott gén működését is több transzkripciós faktor együttes, vagy egymást kizáró jelenléte határozza meg. Ezért a gyakorlatban a géncsendesítés nem a transzkripció szintjén, hanem a keletkezett **RNS féléletidejének jelentős csökkentésén** alapszik. A géncsendesítésnek ez a mechanizmusa a természetben is előfordul: Vírusfertőzések elleni védekezésnél, vagy génexpresszió szabályozásánál találkozhatunk vele.

**13.2.1. A géncsendesítés elmélete**

A géncsendesítés elmélete a következő: az adott génről képződött RNS egyik részéhez egy **kb. 21-bázis** hosszú **komplementer RNS** képes egy adott **enzimkomplex jelenlétében** tapadni. A kapcsolódás vagy csak egy **térbeli gátat** képez és így akadályozza a transzlációt (elsősorban nem teljesen tökéletes bázispárosodású, viszonylag széles specifitású miRNS-ek – mikro-RNS-ek – esetében), vagy az **enzimkomplex** **ribonukleáz** működésének következtében **elhasad** a kiválasztott RNS (ez főleg tökéletes szekvenciahomológiával bíró, igen specifikus miRNS-ek esetében jellemző), és ennek következtében nem íródik át a fehérje.

Hogyan keletkeznek ezek a kis komplementer szakaszok, az ún. mikro-RNS-ek (miRNS)? Nagyobb, **nem transzlálódó RNS-ek** bizonyos részeiből. Ezek az RNS-ek a sejtmagban **saját magukkal bázispárosodnak**, részben feltekerednek. Ezt a formát hívják **pri-miRNS**-nek. Ezek az RNS-ek a sejtmagon belül érnek: RN-ázok bizonyos részeiket leemésztik, csak egy kb. **70 bázis hosszúságú,** nagyrészt **hajtű alakú** **pre-miRNS** marad. Ez kijut a sejtmagból és tovább alakul: egy „**Dicer**” nevű **RN-áz enzim** levágja a hajtű hurkát és az esetleg nem bázispárosodó lelógó részeket. Az eredmény egy **19–23 bázispár hosszú, dupla szálú RNS** lesz, melynek mindkét 3’ végén 2-2-nukleotid túllóg. Ezt nevezzük miRNS-nek, vagy siRNS-nek. (**siRNS-nek** nevezzük azokat, amelyek **nem endogén** módon jöttek létre, hanem a sejten kívülről érkeztek, például virális eredetűek, vagy mesterségesen szintetizáltak.) Ez a rövid, dupla szálú RNS több fehérjével együtt egy **enzimkomplexszé** áll össze, miközben az RNS kitekeredik, és az egyik szála ledisszociál a komplexről. A ledisszociált RNS-szálat a citoplazma ribonukleázai elemésztik. A megmaradó egyszálú, 19–23 nukleotidnyi RNS-t kötő enzimkomplexet nevezik **RISC**-nek (RNA-induced silencing complex). A RISC az egyes szálú RNS-e segítségével képes a **célzott RNS komplementer szakaszához kötődni** és annak átírását a már ismertetett módokon akadályozni (13-13. ábra). Ha a célzott RNS hasítása bekövetkezett, a RISC komplex új préda után tud nézni (ez a csendesítési forma hatékonyabb, mint a sima térbeli gátlást okozó kapcsolódás).

13-13. ábra

http://www.pnas.org/content/suppl/2005/07/10/0504439102.DC1/04439Fig7.jpg

2013.10.13.

**13.2.2. Géncsendesítési módszerek**

Hogyan válasszuk ki, hogy melyek azok a szekvenciák, amelyeket a RISC felismer? Legegyszerűbb, ha a tudományos irodalomban utánanézünk, hogy van-e már előzménye az általunk kiválasztott gén csendesítésének. Ha már volt **sikeres csendesítés,** érdemes nekünk is **ugyanazzal a konstrukcióval** próbálkoznunk először. A különböző biotechnológiai cégek is már egyre több gén csendesítéséhez árusítanak **kipróbált**, **validált siRNS-eket**. Ha ezek nem lehetséges opciók, akkor érdemes különböző számítógépes programok segítségével (az siRNS-eket gyártó cégek online biztosítják az ezekhez való hozzáférést) megtervezni a lehetséges legjobb konstrukciókat. Előny, ha **egy génre több siRNS-t** is tervezünk, majd a kezdeti kísérletek során kiválaszthatjuk a legjobbakat. Az sem baj, ha egyszerre **több siRNS-t** használunk **párhuzamosan**, ha azok együtt képesek a gén csaknem teljes csendesítésére. Egy jó géncsendesítési kísérletben az adott gént reprezentáló mRNS-ek számát akár 1–5%-ra is csökkenthetjük az eredetihez képest.

Kétféle módja van a géncsendesítésnek. Az **RNS-alapú géncsendesítés** esetén vagy **kétszálú siRNS-eket**, vagy hajtű alakú **pre-miRNS-eket** használunk. Ezeket transzfektáljuk a sejtkultúra sejtjeibe (speciális, RNS-transzfekcióra alkalmas reagenseket is lehet kapni). Gyakorlatilag mindegy, melyik RNS-formát választjuk, az eukarióta sejtekben benne vannak az RNS-ek átalakulását segítő mechanizmusok enzimjei (dicer, argonauta). Ha sejtkultúrán dolgozunk, rövid, féléletidejű fehérjét akarunk kiütni, vagy több lehetséges siRNS-t akarunk kipróbálni, akkor mindenképpen ezzel a módszerrel érdemes a géncsendesítést kezdenünk. A megvásárolt RNS viszonylag olcsó, ha jól transzfektálódó sejtvonalat választunk, viszonylag gyorsan kaphatunk kísérleti eredményeket. Valamivel drágábban hozzá lehet férni **módosított nukleotidokat** tartalmazó RNS-ekhez is. Ezek lehetnek erősebb bázispárokat képzők, vagy kevésbé érzékenyek a sejtekben lévő RN-ázokra. Ez utóbbi tulajdonságuk miatt **stabilabbak,** a hosszabb féléletidejű fehérjéknél (akár terápiás célra is) is használhatóak.

A **DNS-alapú géncsendesítés** valójában ugyanúgy siRNS-ekkel dolgozik, mint az RNS-alapú. Ilyenkor azonban nem RNS-t transzfektálunk a sejtekbe, hanem egy olyan **vektort**, mely tartalmazza a megfelelő **pre-miRNS szekvenciáját**, és egy megfelelően **erős promótert**, amely majd az RNS átírását biztosítja. A vektorba ültetett szekvencia a két végén tartalmaz kb. 20-20 bázispárnyi, egymással komplementer szakaszt (a képződő RNS-ben ez a két rész fog egymással összetapadni, majd egyikük a degradálandó RNS-hez kötni), és **középen egy konszenzus szekvenciát**, amelyről az RNS-hajtű hurka íródik át. Ezt a hurkot ismeri majd fel a dicer enzim, ami a kétszálú siRNS-t kialakítja (13-14. ábra).

13-14. ábra

A DNS-alapú géncsendesítésnek sok előnye van. Egyrészt a vektor **integrálódhat** a sejt genomjába, így egy permanens, gyakorlatilag génkiütött állapotot hozhatunk létre. A promóter és a hozzá kapcsolódó szakaszok jellegétől függően a **géncsendesítés erőssége**, **szövetspecifitása regulálható**. Ha olyan promótereket alkalmazunk, amelyekhez az **RNS-polimeráz III** köt, azok igen **erős siRNS-átíródást** okoznak, viszont nem szövetspecifikusak. Az **RNS-polimeráz II-t** kötő promóterek **gyengébbek**, viszont **szövetspecifikusak**. Ezzel a módszerrel az is megvalósítható, hogy a géncsendesítés az adott élőlénynek csak egy meghatározott szövetében, vagy egy adott sejtvonalban csak indukció hatására valósuljon meg.

Ha géncsendesítéssel próbálunk egy adott fehérje szerepéről információkat szerezni, nem szabad megfeledkezni néhány fontos dologról:

– Az siRNS-en keresztül működő **géncsendesítés nem azonnali hatású**, nagyban függ az adott fehérje féléletidejétől (akár több hét is lehet, mire a sejtben már jelen lévő fehérje lebomlik)

– A sejtekbe való **transzfekció hatékonysága** nagymértékben befolyásolhatja a géncsendesítés hatékonyságát (a transzfekció hatékonyságát gyakran párhuzamosan transzfektált riportergének kifejeződésével vizsgálják)

– Ha sok, ugyanarra a génre tervezett siRNS hatékonyságát vizsgáljuk, érdemes először **több csoportban** néhányat együtt transzfektálni, majd a leghatékonyabb csoport tagjait külön-külön vizsgálni a következő kísérletben

– Mindig használjunk **kontrollokat**, például **scrambled** (véletlenszerű nukleotidokból álló) **siRNS** transzfektálásával

– Az siRNS hatékonyságát a lehető legtöbb módon ellenőrizzük (northern blot, western blot, sejtfunciók ellenőrzése).