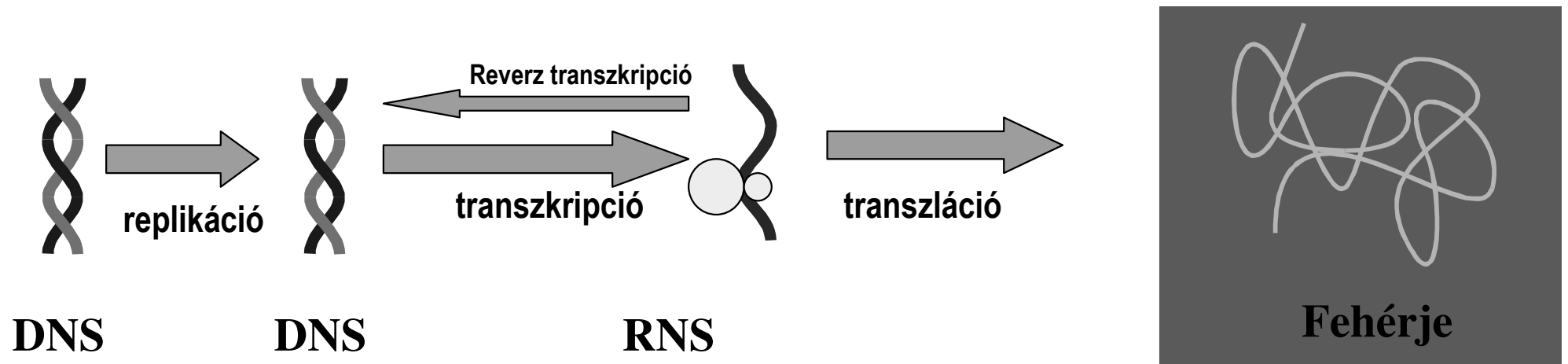


Antiszenz hatás és RNS *interferencia*

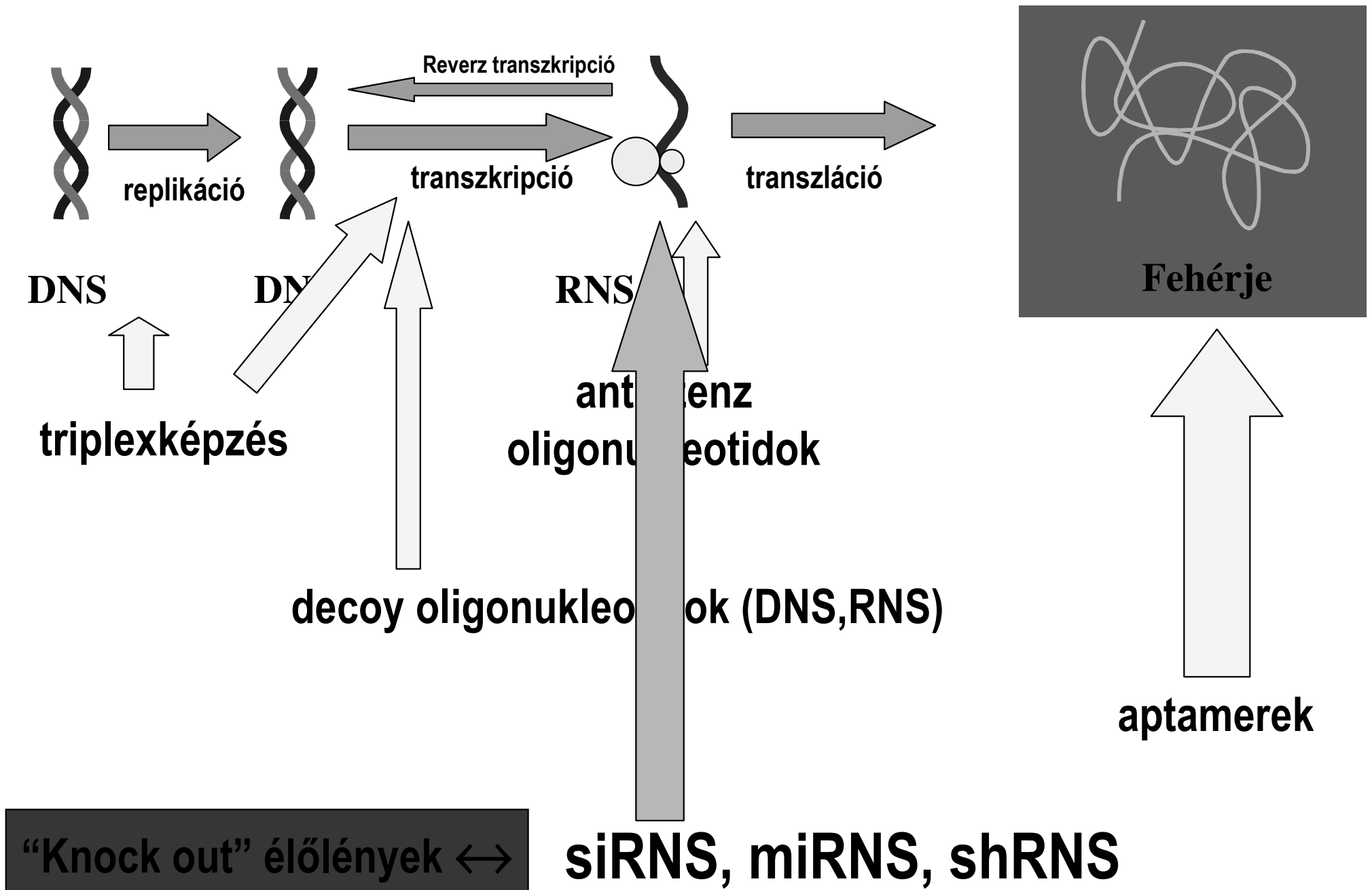
(a génexpresszió befolyásolásának
régi és legújabb lehetőségei)

Az antiszenz elv története



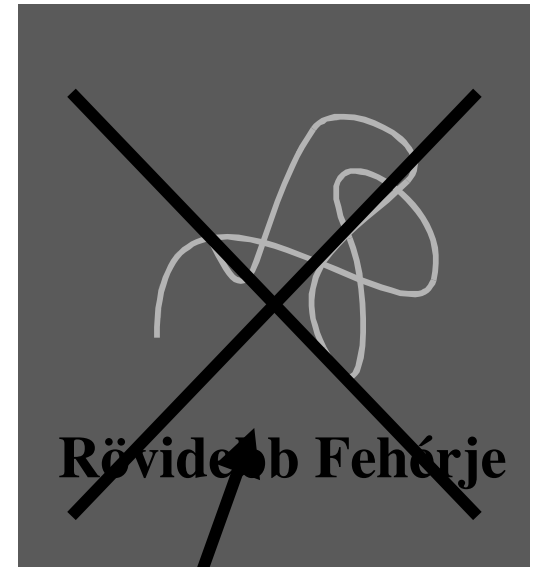
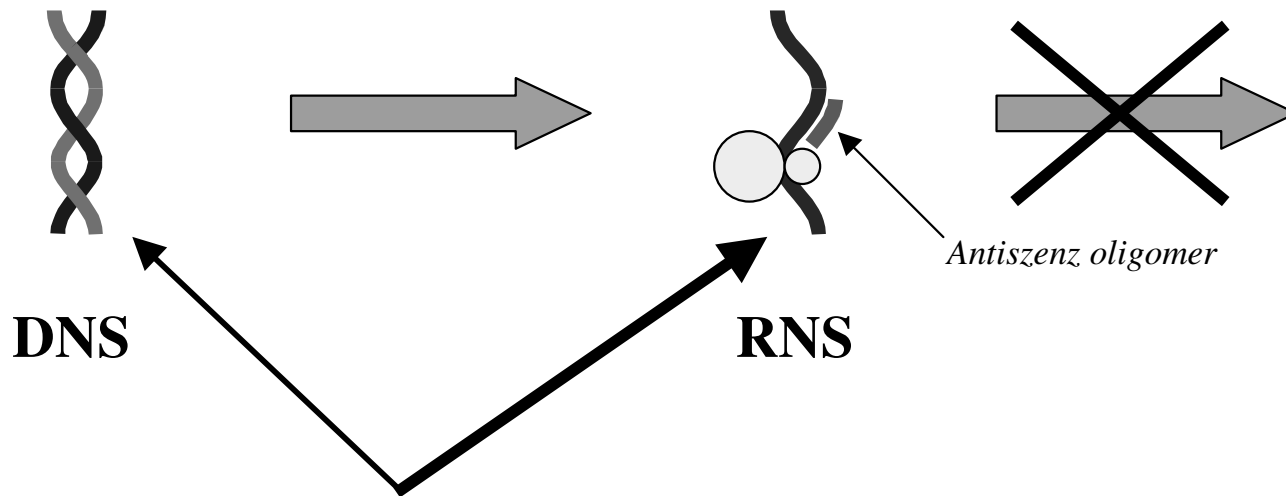
- 1969-77.** Először figyelték meg, hogy az antiszenz szál is átíródik, de ennek szabályozó szerepére 1983-ig nem volt bizonyíték.
1977-ben komplementer DNS-sel már sikerült transzláció gátlást elérni sejtmentes rendszerben.
- 1978.** Zamecnik és Stephenson voltak az elsők, akik javasolták szintetikus oligonukleotidok használatát terápiás célból, mert képesek voltak 13nt hosszú oligonukleotiddal gátolni vírusok szaporodását, aminek az alapja az volt, hogy a szekvencia komplementer volt az RNS vírus RNS-ével.
- 1983.** Simons és Kleckner prokariótákban detektált olyan RNS-eket, amik a riboszóma kötőhellyel komplementerek voltak és gátolták az átíródást.

A géneexpresszió és szabályozásának eszközei



Antiszenz hatás

(Paul Zamecnik és munkatársai 1982.)



Antiszenz megközelítés

- Célpont általában a mRNS vagy a DNS

Előnyök

- tervezhető
- specifikus
- korábbi stádiumban hat

Hátrányok

- több jelenleg még megoldatlan probléma
- jelenleg drága volna az ilyen gyógyszer

Klasszikus gyógyszertervezés

- Célpont általában a fehérje

Előnyök

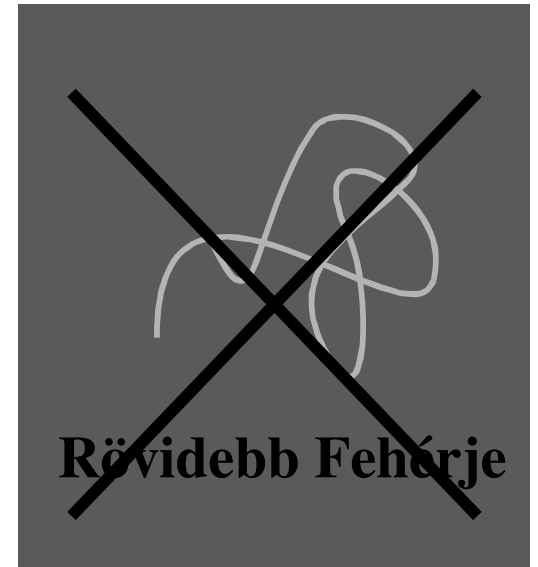
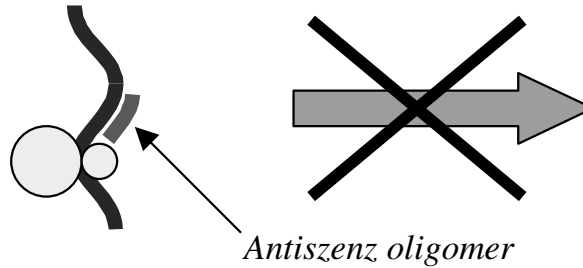
- “kis” molekulák (Lipinsky-szabályok / “dogmák?”)
- általában egyszerű a végtermék szintézise
- “olcsó” gyógyszer

Hátrányok

- nehezebben tervezhető (kb. 10000 molekula)
- magas fejlesztési költségek
- nem mindig specifikus (mellékhatások lehetnek)
- későbbi stádiumban hat

Antiszenz hatás

(Paul Zamecnik és munkatársai 1978.)



Hatáshoz szükséges:

- bejutás
- stabilitás
- megfelelő erősségű kötődés
- megfelelő szelektivitás
- Rnáz H aktivitás (ribozimok)

Eddigi eredmények:

- sok módosítás/szerkezet (gyógyszer is ISIS/HCMV!)
- nincs átütő siker, (gyenge hatás)
- de rengeteg tapasztalat

Módosított szerkezetek

Módosítások lehetséges helyei:

- cukorréssz (α -anomer, O-C csere, 2')
- foszfátmódosítások (tioát, ditioát, amidát, metilfoszfonát, foszfonoacetát-formiát ...)
- bázis módosítások (triplexképző bázisok, interkalálódó...)
- extra részek beépítése (interkaláció, ribozimok)
- gerinc részleges vagy teljes átalakítása:
 - PNS (PNA)
 - LNS (LNA)
- prodrug módosítások, konjugátumok, kimérák

Módosítások célja:

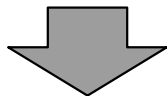
- T_m növelése
- Dnáz rezisztencia
- sejtpenetráció növelése
- AS-hatás fokozása

RNS interferencia *történet*

1990. festékanyagért felelős gén túltermeltetése petuniában

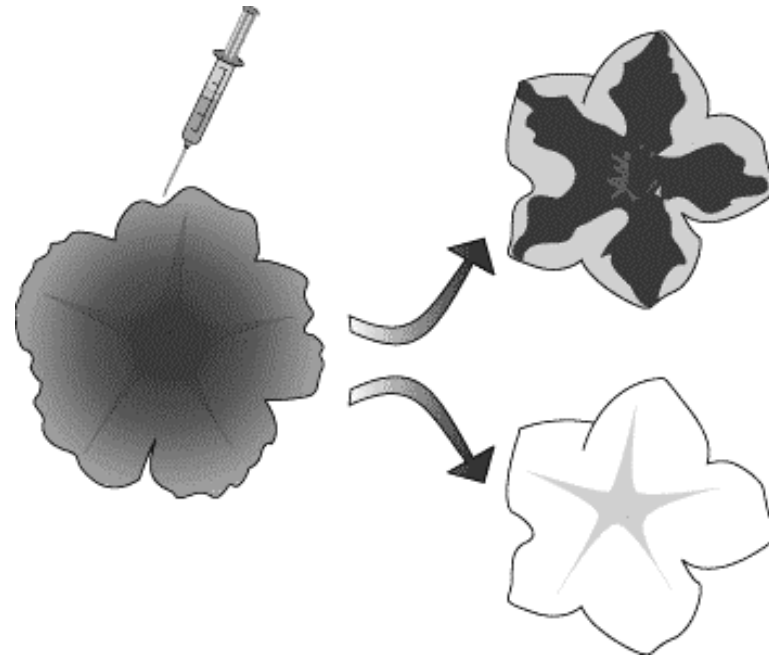
Eredeti cél: egy adott fehérje túltermeltetésével kideríteni, hogy egy enzim-kaszkádban melyik a sebességmeghatározó lépés.)

Eredmény: mélyebb színek helyett gyengébb szín vagy a szín teljes hiánya !!!



Elnevezés: RNS interferencia vagy

PTGS (Post Translation Gene Silencing)



1998. RNS interferencia vizsgálata *C. Elegans*-ban

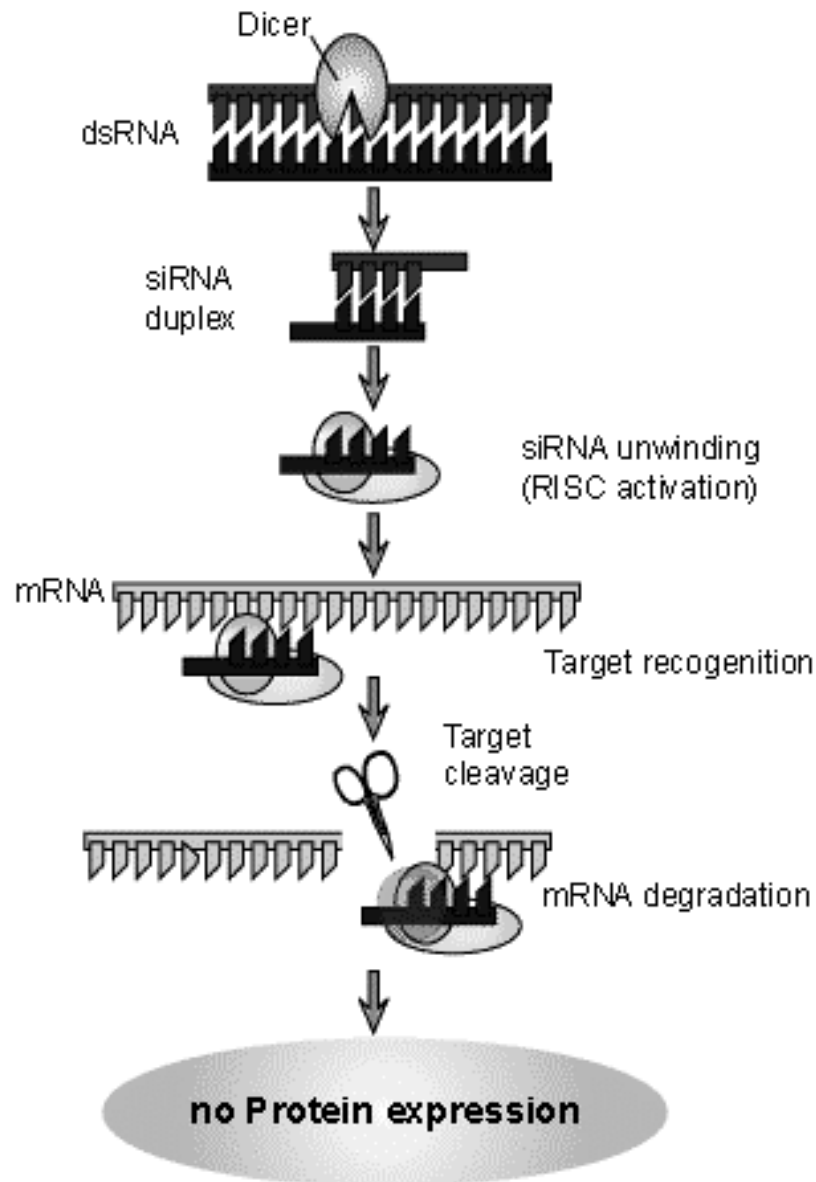
Eredmény: a kettős szálú RNS az, ami leginkább előidézi a hatást, igen kevés molekula elég, tovább tud terjedni a sejten túlra is a szomszédos sejtekbe (növények, férgek)



Mechanizmus felderítése

2006. Nobel díj

RNS interferencia *mechanizmus 1.*



1. Feldarabolás (DICER)

(kb. 18-23nt hosszú darabok,
3' túlnyúló szakaszok, 5'-foszfáttal)

2. RNS aktiválás (RISC)

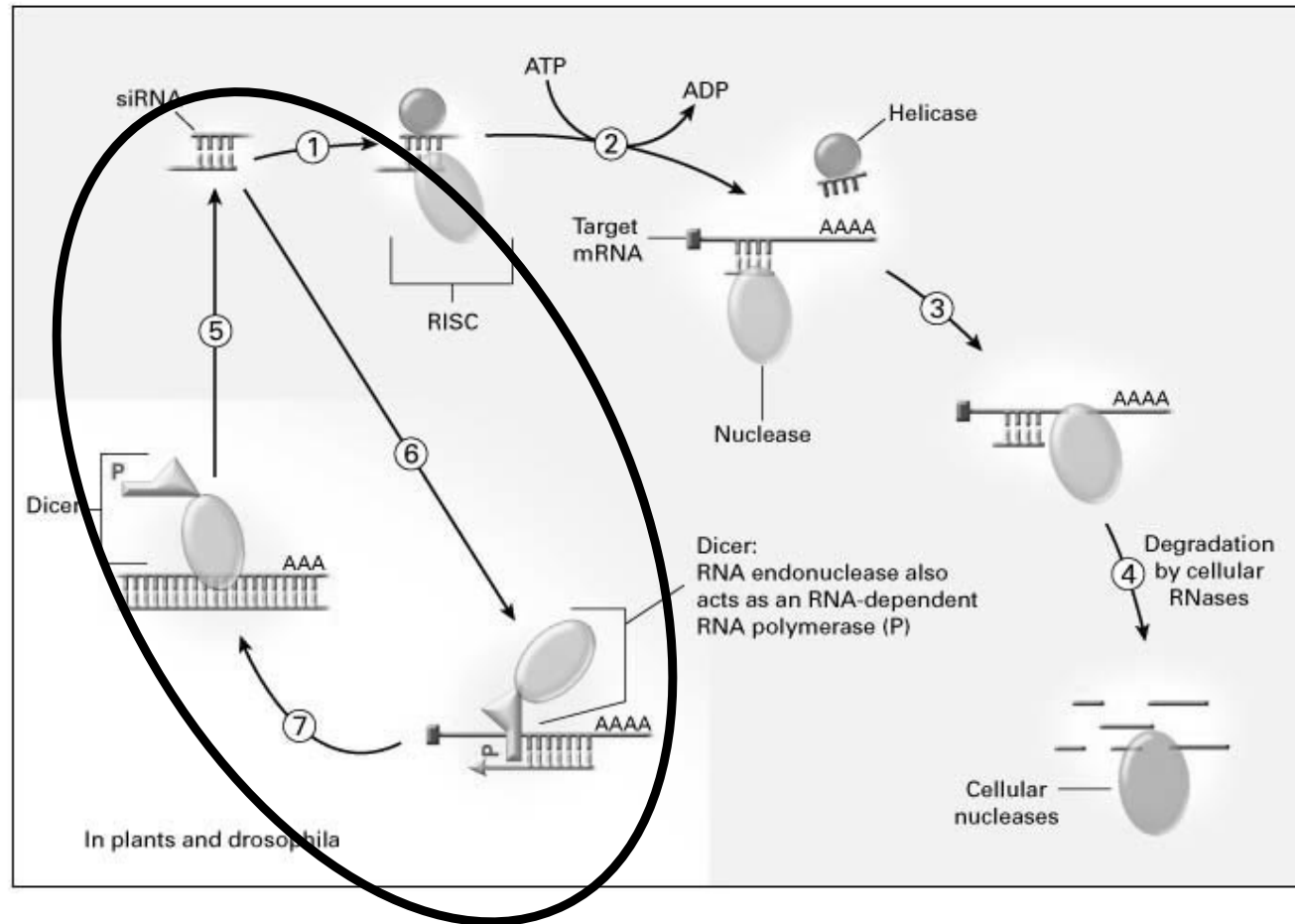
Rna Induced Silencing Complex kialakulása
és a 'antiszenz' szál felszabadulása

3. Célszekvencia (mRNS) hasítása

a 10 és 11. nukleotid között hasít,
majd új target keresése

RNS interferencia *mechanizmus 2.*

Növények és férgek esetében az siRNS megsokszorozódást tapasztalták.



- Emlősöknél még nem találoztak vele. (interferon, szekvenciafüggetlenül sejthalál)
- Előnyök és hátrányok mellékhatások (OFF target hatás)
- (+ siRNS-ek indukálta sejtmagbéli változások → DNS metilezése → csendesítés)

RNS interferencia

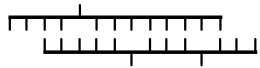
siRNS, miRNS, shRNS

1. siRNS :



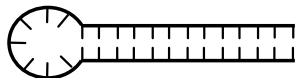
Tökéletesen komplementere a célszekvenciának.
(Növényekben, férgekben amplifikáció!)
A mRNS hasításával csökkenti a génexpressziót.

2. miRNS (mikro RNS):



Nem tökéletesen komplementere a célszekvenciának.
(Mégis igen hatásos!)
Egyesek szerint csak a transzláció gátlásaként hat (!?!)

3. shRNS (kis hajtú RNS): Enzimatikusan hasítódik ki belőle az egyszálú hurok kialakítva egy siRNS-t
(hurok mérete 6-7 bázis)



RNS interferencia

RNS bejuttatási lehetőségek

1. Kémiaailag szintetizált siRNS/miRNS/shRNS
 - injektálás/elektroporáció/transzfekciós reagensek/hordozó molekulák (CPP)
 - gyors, egyszerű és könnyen reprodukálható
 - nincs interferon válasz
 - kémiaailag módosított RNS is bevihető, (stabilitás)
 - viszonylag drága!
2. Biológiaailag szintetizált RNS (*in vitro* transzkripcióval)
 - olcsó
 - csak natív RNS-t lehet így készíteni
3. Sejtbe juttatás vektorokkal (pl vírusok).
 - hosszabb RNS bejuttatására jó, ami emlősöknél hátrány interferon válasz miatt
 - több OFF tartget hatásra lehet számítani
 - módosítatlan RNS
4. Sejten belül termeltetni az RNS-t *in vivo* (expressziós kazetták)
 - több munkát igényel a megfelelő módosított élőlény előállítása
 - itt is igaz, hogy emlősöknél nem könnyű (shRNS, RNS pol. III promóterrel)
 - indukálható promóterekkel a hatás ki-be kapcsolható

RNS interferencia

maga a kísérlet/vizsgálat

1. RNS bejuttatása a sejtbe (hatás kb. 24 óra múlva, mérés 1-4 nap)
(módosított RNS-ek több napig is stabilak)

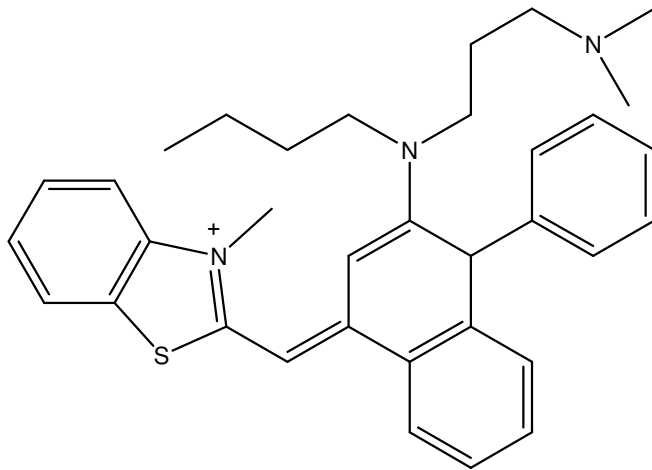
2. Hatás illetve mellékhatás(OFF-target) vizsgálata

- fenotípus változásának vizsgálata (pl. színváltozás)
- adott fehérje kiesésének közvetett hatása
pl. egy enzimrendszer működésének változása vagy valami fizológiásan mérhető változás
- a célfehérje mennyiségének mérése
- közvetlenül a mRNS mennyiségének mérése
 - kvantitatív Real-Time PCR (Q-RT-PCR)
SYBR Green módszer vagy Taqman próba
 - DNS chip technika (Off target hatások vizsgálata)

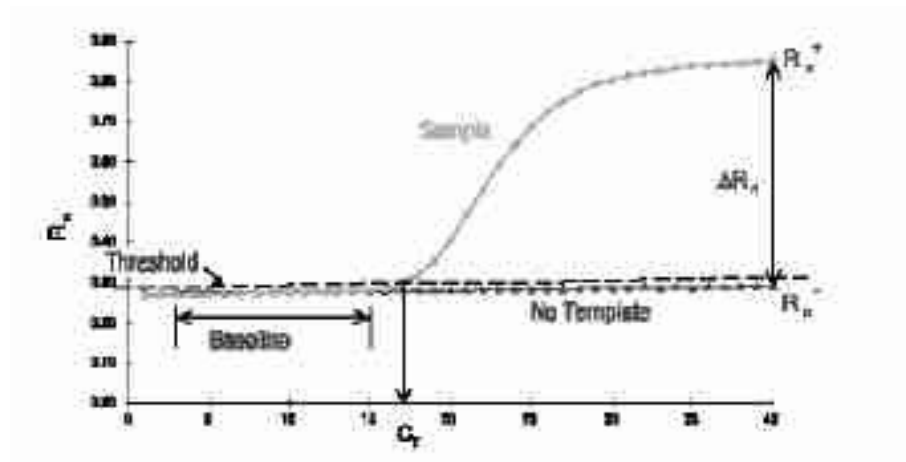
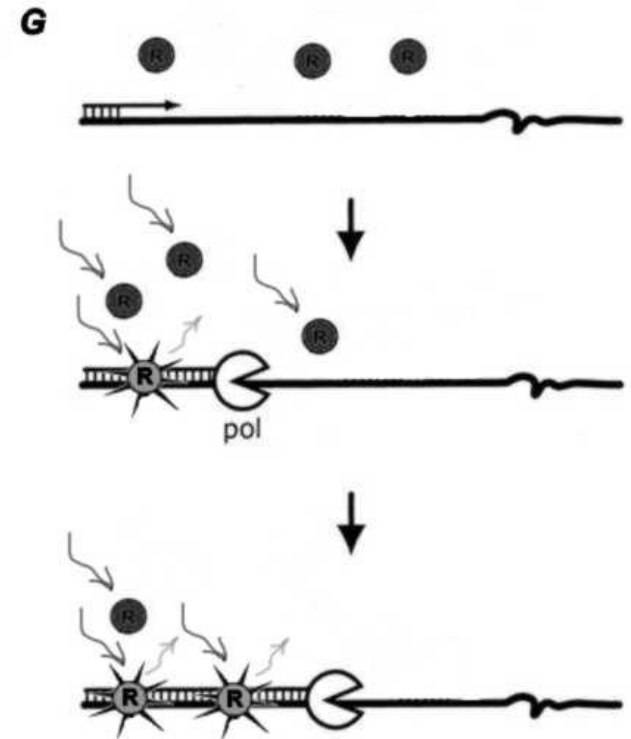
IX. Polimeráz láncreakció

E. Speciális PCR technikák

3.b. Kvantitatív Real-Time PCR (Q RT-PCR) SYBR Green módszer



SYBR green

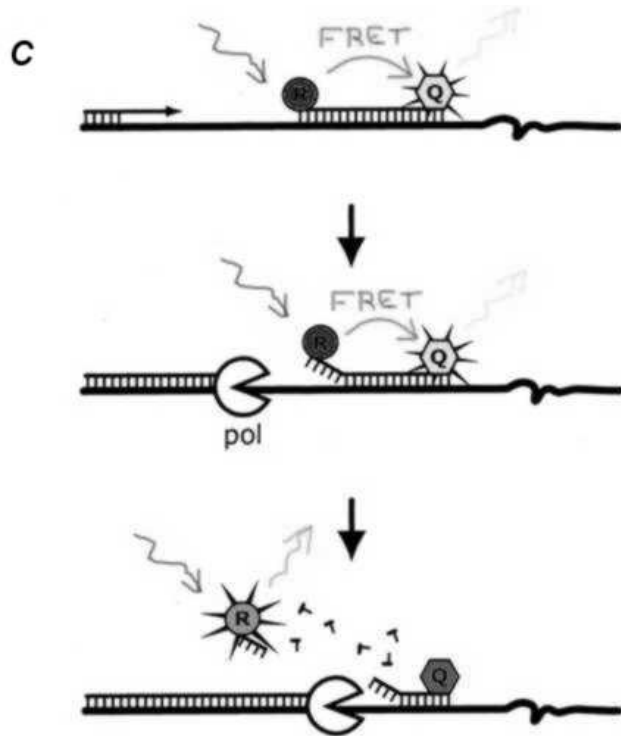


- “Houskeeper” gén belső standard
- Ct (threshold cycle) érték
- lehetséges hibák (aspecificitás)

IX. Polimeráz láncreakció

E. Speciális PCR technikák

3.c. Kvantitatív Real-Time PCR (Q RT-PCR) specifikus próbával (kettős jelölés)



R: Riporter
Q: Quencher

