

Sipiczki Mátyás

Az RNS-interferencia és távlatai

Genetika és genom-projektek

A modern biológia egyik leggyorsabban és leglátványosabban fejlődő területe a genetika, az a tudomány, amely az öröklődés mechanizmusát és törvényszerűségeit vizsgálja. Az utóbbi másfél évtized során a genetika óriási lendületet kapott az úgynevezett genom-projektek jóvoltából hozzáférhetővé váló hatalmas tömegű új információtól. A genom-projektek célja egy-egy szervezet teljes genetikai állományának olvashatóvá tétele, azaz a kromoszómákban és a kromoszómákon kívül elhelyezkedő DNS-molekulák nukleotid-sorrendjének meghatározása. A DNS nukleotid-sorrendje tartalmazza kódolt formában mindazt az információt, amit egy szervezet átad az utódjának, és amely segítségével az utód (az elődjéhez hasonló) életképes szervezetté fejlődhet. A nukleotidok egy folyamatos sorrendet alkotnak a DNS-en belül, de a sorrend (szekvencia) egyes szakaszai önálló egységeknek tekinthetők. Minden ilyen egységet, aminek önálló és specifikus információtartalma van, génnek nevezünk. Az egyes szervezetek nagyon eltérőek abban, hogy mennyi ilyen egységgel rendelkeznek, és milyen információt hordoznak ezek az egységek. Vannak fajok, amelyek egyedei mindössze pár száz génnel rendelkeznek, mások viszont több tízezer gént is tartalmaznak.

A genom-projektek korszakát megelőzően is sok faj sok génjének nukleotid-sorrendjét ismertük már, de néhány vírus kivételével egyetlen faj teljes génkészlete sem vált ismertté. A nukleotidsorrend meghatározásához általában az volt szükséges, hogy a génnek megfelelő DNS-szakaszt kivágjuk a kromoszómából, beültessük egy „klónozó” vektorba (általában bakteriális plazmidba), az így kiegészült vektort egy megfelelő gazdaszervezet (pl. *Escherichia coli* baktérium) sejtjeibe bejuttassuk, a baktérium-sejtekkel a számukra idegen DNS-t elszaporíttassuk, majd belőlük az elszaporodott DNS-t izoláljuk és meghatározzuk a nukleotid-sorrendjét. Ezt a technikát klónozásnak nevezzük, és széleskörűen használjuk nem csak szekvenciák meghatározásához, hanem a génszűrés egyik alapvető módszereként is.

Időközben azonban a szekvenálási technikák tökéletesedésének és új bioinformatikai módszerek bevezetésének köszönhetően lehetővé vált a hosszadalmas, munkaigényes és ebből kifolyólag alacsony hatékonyságú klónozás helyett más úton meghatározni a DNS-molekulák nukleotid-sorrendjét. A hatások egy

mértékben javult, hogy teljes genomok szekvenálása is lehetségessé vált. Óriási áttörésnek számított az első valódi kromoszóma, a *Saccharomyces cerevisiae* élesztőgomba III-as sorszámú kromoszómáját alkotó DNS molekula nukleotid-sorrendjének meghatározása 1996-ban, majd néhány évvel később a faj teljes genomjának a „megszekvenálása”. Az élesztőgenom szekvenálásának tanulságait felhasználva fokozatosan egyre több és több eukarióta szervezet genomját – közöttük az emberét is – sikerült megszekvenálni.

A teljes nukleotid sorrend ismerete önmagában nem sokat ér. Egy ismeretlen nyelven írt rendkívül hosszú betűsorozatnak látszik, ugyanakkor számítógépes elemzése (amit szokás annotálásnak is nevezni) után részlegesen olvashatóvá/értelmezhetővé válik. Például kideríthető, hogy a szekvencia mely részei tekinthetők géneknek, meghatározható a feltételezett gének szerkezete és valószínű funkciója. Természetesen az így kapott információ csak becslésnek tekinthető. A teljes biztonsággal levonható következtetések megkívánják a kísérletes bizonyítást.

Funkcionális genomika és fordított genetika

A kísérletes bizonyításon azt értjük, hogy a számítógéppel identifikált, génnek látszó szekvencia-szakaszokról kiderítjük, hogy azok valóban gének-e, és meghatározzuk a pontos biológiai funkciójukat is. A bizonyítás nagyon sokszor nem könnyű feladat, gyakran nem is vezet egyértelmű válaszokhoz. Különösen olyan gének esetében nehézkes a nyomozás, amelyek több funkcióval is rendelkeznek (pleiotróp hatásúak), azaz több biológiai folyamat irányításában is részt vesznek. A genom-projektek során identifikált gének szerepének keresését szokás funkcionális genomikának is nevezni. A funkcionális genomika módszertana rendkívül szerteágazó. Nem is lehet egyértelműen definiálni, hogy melyek az ide tartozó technikák. A funkcionális genomika legtöbb módszere ugyanis nem a genomika kedvéért lett kidolgozva, hanem már korábban is létezett, illetve más célok érdekében fejlesztették ki.

Mindenesetre a genom-szekvenciák megjelenése meglehetősen fejére állította a genetikai gondolkodás logikáját. Korábban a gén nukleotid-sorrendje a genetikus munkájának a végterméke volt, most a kiindulása. Nézzük meg, miként gondolkodott és dolgozott a genetikus a genom-projektek korát megelőzően. Egy gén identifikálása és megismerése érdekében mutánsokat hozott létre a normális populáció tagjai között. Úgy gondolkodott, hogy egy gén identifikálásának a legegyszerűbb módja a gén elrontása (pl. mutációval). Például, ha a testfelület színét meghatározó géneket kívánta megtalálni, akkor olyan mutánsokat keresett a populációban, amelyek testfelülete a normálistól eltérő színű vagy teljesen színtelen volt. Az ilyen egyedekben a színeképzésért felelős gének valószínűleg nem működnek, vagy legalább is rosszul működnek. A mutáns egyedek továbbra is rendelkeznek a kérdéses génekkel, de azok elrontott változataival. Az elrontó

hatású mutációt szokás genetikai markernek is nevezni. Hosszadalmas keresztezésekkel – amelyek során a mutánst és utódait keresztezzük mindenféle más genetikai markert (mutációt) hordozó egyedekkel – kideríthető, hogy a vizsgált gén melyik kromoszómán helyezkedik el, melyik már korábról ismert gén közelében (genetikai térképezés). Ezt követte a gén klónozása, amihez a faj nem mutáns (vad típusú) egyedéből izolálni kellett a DNS-t. Az izolált DNS-t feldarabolták, a darabokat (fragmenseket) a fentiekben már említett vektorokba építették be. Mivel a feldarabolás során sok millió, egymástól nagyrészt eltérő nukleotid-sorrendű DNS-darab jön létre, nagyon sokféle olyan vektor-molekula képződik, amelyek mindegyike más és más nukleotid-sorrendű DNS-darabot tartalmaz (az ilyen preparátumot szokás génkönyvtárnak is nevezni, mivel benne a faj minden génje előfordul). Közülük egy, vagy néhány tartalmazni fogja a keresett gént. Ahhoz, hogy az ilyen kombinációkat megtaláljuk, a génkönyvtárt hozzáadjuk a mutáns sejtjeihez olyan kísérleti körülményeket biztosítva, amelyek mellett a sejtek felveszik a vektormolekulákat. Ha egy sejtbe olyan vektormolekula jut be, amely tartalmazza a keresett gént, akkor a bejutó gén pótolni fogja a befogadó sejtben rosszul működő (mutáns) gént. Az ilyen „kiegészült” (komplementált) mutáns sejtből egy látszólag teljesen normális, azaz vad típusú egyed fejlődhet ki, amit transzformánsnak nevezünk. A transzformáns egyed sejtjeiből „visszaizolálható” a vektor-molekula, a benne levő vad típusú génnel együtt. Az utóbbinak a nukleotid sorrendje meghatározható.

A genomika korszakában mindezt nem kell elvégezni, mert a gén szekvenciáját adatbázisokban megtalálhatjuk. Viszont nem tudhatjuk biztosan, hogy a gén valóban a színeképzéshez kell-e. Tehát mégiscsak kell dolgoznunk, de fordított irányban, merthogy a szekvenciából indulunk ki, és funkciót keresünk hozzá. Szokás ezt a megközelítést fordított genetikának is nevezni.

A funkciókeresés egyik alapmódszere a gén teljes vagy részleges inaktiválása a sejteken belül. Ennek számos módszere van. A legelterjedtebbek közül érdemes megemlíteni az *in vitro* mutagenézist, amikor is a vad típusú gén szekvenciáját módosítjuk *in vitro*, majd a módosított változattal lecseréljük a sejtben meglévő normális változatot. Egy másik megközelítés a transzpozonok (mozgékony genetikai elemek) segítségével történő géninaktiválás. Az utóbbi időben egyre elterjedtebben használják az RNS-interferencia jelenségét is. Ez a technika semmit sem változtat a génen. Csupán a működését teszi lehetetlenné.

Az RNS-interferencia mint természetes védekező rendszer

Az RNS-interferencia természetes jelenség, amelynek a segítségével eukarióta szervezetek védekeznek az RNS-vírusok támadásával szemben. Az ilyen vírusok bejuttatják a duplaszálú RNS-üket a megtámadott sejtbe, és – ha a sejt nem védekezik – a bejutott RNS elszaporítja önmagát. Eközben a sejt súlyos károsodáso-

kat szenved vagy el is pusztul. A sejt azonban védekezhet a vírus-RNS-sel szemben egy speciális ribonukleáz – a Dicer – segítségével. A Dicer feldarabolja, és ezáltal inaktiválja a behatoló vírus-RNS-t. A darabolás eredményeként apró (21–25 nukleotid hosszúságú) duplaszálú RNS-darabok jönnek létre, amelyeket siRNS-eknek (short interfering RNAs) nevezünk. A Dicer nem támadja meg a sejt saját RNS-eit, mivel azok szimplaszálúak. Az siRNS-ek két szála elválhat egymástól. A keletkező szimplaszálú RNS-darabkák pedig rákapcsolódhatnak a sejt bármelyik olyan szimplaszálú RNS-ére, amelyben előfordul velük komplementer nukleotid-sorrend (RNS-RNS-hibridizálódás). Milyen RNS-ekben fordulhat elő ilyen szekvencia? Elsősorban olyanokban, amelyeket a behatoló vírus termelhetett még azelőtt, hogy RNS-e feldarabolásra került volna. Ezek az RNS-ek is veszélyesek lehetnek a megtámadott sejtre, mert olyan fehérjék termelésére kényszerítenék a sejtet, amelyek káros hatásúak. A sejt szerencséjére a szimplaszálúvá vált siRNS-darabkák rátapadhatnak ezekre a vírus termelte, veszélyes (szintén szimplaszálú) RNS-ekre, és egy további védekezési mechanizmust kapcsolnak be. A tapadás következtében létrejövő rövid duplaszálú szakaszokat felismeri a RDE-1 nukleáz, és a duplaszálú résznél elvágja a vírus RNS-ét.

Az RNS-interferencia mint a funkcionális genomika egyik módszere

Az RNS-interferenciát felhasználhatjuk arra, hogy segítségével egyes gének működését specifikusan megakadályozzuk. A géneket nem változtatjuk meg, tehát nem kell mutációkat létrehozunk. Csupán azt érjük el, hogy a gének ne tudjanak megnyilvánulni. Nem a gént, hanem a génről képződő RNS-másolatokat inaktiváljuk.

Ennek érdekében a vizsgált élőlény kiszemelt génjéről másolatokat készítünk PCR (polimeráz-lánreakció) segítségével. A másolatokat olyan vektormolekulákba építjük be, amelyekben a beépítés helye előtt és után egy-egy bakteriális promoter helyezkedik el. Az ilyen konstrukciókat bejuttatjuk az *Escherichia coli* baktérium sejtjeibe. A promoterek olyan nukleotid sorrendek, amelyekre a baktériumban működő RNS-polimeráz rá tud tapadni. A megtapadás után a polimeráz RNS-másolatot készít a promoterek által közrefogott DNS-szakasz mindkét száláról. Két, egymással komplementer nukleotid sorrendű szimplaszálú RNS-másolat képződik. Ezek egymással összekapcsolódnak, és egyetlen duplaszálú RNS-sé alakulnak. A képződött duplaszálú molekulák a gén RNS-be átitrt másolatának tekinthetők. Ezeket izolálhatjuk a baktériumsejtekből, és bejuttathatjuk az általunk vizsgált szervezet sejtjeibe. A befogadó sejtek a bejutó RNS-t (tévesen) vírus-RNS-ként fogják kezelni, és feldarabolják azt a Dicer ribonukleázuk segítségével. A keletkező siRNS darabkák szála elválnak egymástól, és ezáltal olyan rövid szimplaszálú RNS-darabkák jönnek létre, amelyek komplementerek a vizsgálatra kiszemelt génről képződő mRNS-másolatokkal. (mRNS-nek nevez-

zük a génről készült olyan szimplaszálú RNS-másolatokat, amelyek a génben kódolt információnak megfelelő fehérje szintézisét teszik lehetővé.) Komplementaritásuk miatt rá is tapadnak a gén minden egyes mRNS-másolatára (az mRNS-ek szimplaszálúak). A keletkező mRNS-siRNS hibrid molekulákat felismeri az RDE-1 nukleáz, és feldarabolja azokat. Ha minden mRNS-másolat feldarabolódik, akkor a sejtben nem képződhet a gén által kódolt fehérje, ami meg tudná valósítani a gén funkcióját. Mivel az siRNS-ek a vizsgált génre specifikus nukleotid sorrendekkel rendelkeznek, csak a génről képződő mRNS-ek inaktiválódását (feldarabolódását) okozzák, a sejt többi génjének RNS-másolatát általában nem befolyásolják. Hatásukat tekintve tehát rendkívül specifikusak.

Szekvencia-specifitásának köszönhetően az RNS-interferencia jól felhasználható a genom-projektek segítségével azonosított gének funkciójának keresésére. Bármely ismert szekvenciájú, de ismeretlen funkciójú génnel elvégezhető a fenti kísérlet. A gén érvényesülésének gátlása zavart okoz a szervezet életében, és a zavar jellegéből következtetni lehet a gén funkciójára. Például, ha a szervezet színe megváltozik, akkor a gén valószínűleg a testszint biztosító pigmentek képzéséhez szükséges.

Az RNS-interferencia mint eszköz a betegségek elleni küzdelemben

Az RNS-interferenciát nem csak genomikai vizsgálatoknál lehet eredményesen felhasználni. Lehetőségekkel kecsegtet a betegségekkel szembeni küzdelemben is, akár a növények, akár az állatok, akár az ember esetében. Mivel segítségével elvben bármely gén elcsendesíthető vagy működésében gátolható, alkalmas lehet az olyan betegségek kezelésére, amelyek egy vagy néhány gén túlzott aktivitására vezethetők vissza. Például fel lehet használni úgynevezett onkogének csendesítésére. Az onkogének olyan gének, amelyek a szervezetben normálisan jelen levő és általában életfontosságú szerepet játszó gének (az úgynevezett proto-onkogének) kisebb-nagyobb módosulásával jönnek létre. A módosulás következtében a gén elveszti a szabályozhatóságát (mintegy öntörvényűvé válik), és akkor is működik, amikor nem kellene működnie. Sok olyan gén van a sejtek szaporodását biztosító gének között, amelyeknél ez bekövetkezhet. Szerepük a szervezet életében alapvető fontosságú, mert nélkülük a sejtek nem tudnának szaporodni. Viszont csak akkor kell működniük, amikor sejtszaporodásra van szükség. Ha máskor is működnek, akkor rendellenes sejtburjánzást okozhatnak, és tumorok kifejlődéséhez vezethetnek. Amíg a gén normális változata van jelen, ilyen veszély nem fenyeget, mert a sejt a szükségnek megfelelően ki- és bekapcsolhatja a működését. Ha viszont kikapcsolhatatlanná válik (pl. egy mutáció következtében), akkor már veszélyes lehet.

Az RNS-interferencia segítségével „elcsendesíthetjük”, azaz „féken tarthatjuk” a kikapcsolhatatlan gént is. Ennek érdekében a sejtbe olyan duplaszálú

RNS-eket juttatunk be, amelyek nukleotid-sorrendje megegyezik (vagy legalább is nagyon hasonló) a lecsendesítendő onkogén nukleotid sorrendjével. Ezek a molekulák a fentiekben bemutatott mechanizmus segítségével inaktíválják az onkogénről képződő mRNS-eket, így a sejtben nem fognak képződni az onkogén által kódolt fehérjék. Hiányukban pedig elmarad a sejtburjánzás. A módszert sikerrel alkalmazták emberi melanómát, pankreász adenokarcinómát és leukémiát okozó gének csendesítésére.

Az RNS-interferencia gyors elterjedésének az orvosi gyakorlatban gátat szab számos technikai nehézség. Közülük említsünk meg néhányat. A sejtekbe bejuttatott RNS molekulák például fokozhatják az interferon-rendszer működését, és gátolhatják (a gének közötti szekvenciahasonlóságok miatt) számos más gén működését is, ami mellékhatásokhoz vezethet. A mellékhatások csökkentése érdekében célszerű lenne az interferenciát kiváltó RNS-molekulákat csak azokba a sejtekbe (pl. rákos szövetekbe) bejuttatni, ahol a célzott géncsendesítést elő akarjuk idézni. Ez egyelőre csak nehezen, vagy egyáltalán nem oldható meg.

A meglévő technikai nehézségek és élettani mellékhatások ellenére is az RNS-interferencia egy rendkívül perspektivikus módszernek tekinthető az alap-kutatáson kívül a genetikai okokra visszavezethető betegségek elleni küzdelemben is. Nyilván emiatt döntött úgy az illetékes szakmai testület, hogy a 2006. évi élettani és orvosi Nobel-díjat az a két amerikai kutató – A. Fire és C. C. Mello – kapja meg, akik feltárták a jelenségben rejlő távlatokat. Figyelemreméltó, hogy a két kutató nem emberi sejteken, hanem a *Caenorhabditis elegans* nevű nematoda férgen végezte kísérleteit. Talán kevésbé ismert, hogy az úgynevezett „orvosi” Nobel-díjjal sokszor jutalmaznak olyan kutatásokat, amelyek nem tekinthetők orvostudományi kutatásoknak. A Debreceni Egyetem egyik Nobel-díjas díszdoktora (Paul Nurse) az élesztőgombák tanulmányozásánál elért eredményeiért részesült ebben a legrangosabb tudományos elismerésben.