

Válasz Dr. Szabados László bírálataira

Szeretném megköszönni Opponensemnek a dolgozat részletes bírálatát. Köszönöm kritikai észrevételeit, amelyekkel egyetértek és elfogadom.

*Mi az oka, hogy Drosophila rendszerben vizsgálták a P19 funkcióját, a silencing szuppressziót?
Mi az előnye a heterológ rendszer alkalmazásának?*

Több megfontolás alapján választottuk a *Drosophila melanogaster in vitro* rendszert. Döntésünk egyik fontos oka az volt, hogy a 2000-es évek elején nem állt rendelkezésünkre növényi *in vitro* rendszer. A későbbiekben két különböző növényből származó *in vitro* rendszert is bemutatunk. A kukorica embrióból kialakított *in vitro* rendszer alkalmazhatósága azonban limitáltnak bizonyult. A rendszer nem alkalmas exogén siRNA által indukált target RNA hasítására valószínűleg azért, mert a kukorica embrió extraktumban nincs jelen olyan AGO fehérje, ami nem tartalmaz kis RNA-t. Szekvensspecifikus RNA hasítást is csak bizonyos miRNA kötőhelyeket tartalmazó target RNA-k esetében sikerült detektálni. Ennek az lehet a magyarázata, hogy azok a bizonyos miRNA-k egyszálú formában az AGO fehérjébe töltve vannak jelen az embrióban. A második növényi *in vitro* rendszer kialakításához a dohányból származó BY-2 sejt kultúrát használták fel. Ugyan ez az extraktum sem rendelkezett saját target RNA hasító aktivitással, azonban *in vitro* szintetizált AGO mRNA hozzáadása után az extraktum transzlációs kapacitása miatt funkcionális AGO fehérjét lehetett előállítani.

A *D. melanogaster in vitro* rendszer segítségével mutatták be először a szekvensspecifikus target RNA hasítást eredményező folyamat alapvető biokémiai lépéseit. Az RNA silencing első lépését végző DICER enzim hatékonyan alakítja át az ún. hosszú dsRNA-t siRNA-ekké. A kukorica embrióból kialakított *in vitro* rendszerrel szemben a *Drosophila* extraktumban nagy mennyiségben van jelen a kis RNA-t nem tartalmazó AGO2 fehérje, így a rendszer könnyen „programozható” az extraktum által előállított vagy a hozzáadott siRNA segítségével. Továbbá a siRNA indukálta RNA silencing folyamatában részt vevő fehérjekomplexek kialakulása is viszonylag könnyen nyomon követhető. Ezért azt feltételeztük, hogy a siRNA kötő aktivitással rendelkező p19 fehérje funkcionális vizsgálatára a *Drosophila in vitro* rendszer szükségesnek és elégségesnek bizonyul majd.

A *Drosophila* rendszerrel végzett kísérleteink idejében már több biológiai modell-élőlényben azonosítottak az RNA silencing folyamatában részt vevő géneket és az RNA silencing központi molekuláit, a kis RNA-eket. Biokémiai aktivitásuk és elsődleges szerkezetük alapján azt gondolták, hogy a szekvensspecifikus RNA degradáció hasonló módon zajlik az

eukariótákban. Így a heterológ rendszer használata nemcsak a p19 részletes vizsgálatát tette lehetővé, hanem arra is rámutatott, hogy a p19 és a hasonló aktivitással rendelkező fehérjék potenciálisan minden kis RNS által irányított folyamat blokkolására alkalmasak.

Mennyire általános jelenség a silencing szupresszió a növényi vírusoknál? Mindegyik vírusnak van silencing szupresszor rendszere, ez inkább kivételes mechanizmusnak mondható vagy bizonyos vírusokra jellemző?

Az elmúlt 20 évben legalább 70 vírus silencing szupresszorát írták le, ezek az eredmények legtöbbször a vírusnemzetségek típuscsoportjainak vizsgálata során születtek.

A virális szupresszorok az RNS silencing útvonalak különböző lépéseit gátolva végül a növényi antivirális védekezés első vonalába tartozó AGO1 és -2 aktivitását blokkolják. Azonban az AGO1 aktivitás (legalább részleges) gátlása miatt nemcsak az antivirális védekezés, hanem a miRNS vezérelte génszabályozás is alacsonyabb hatékonysággal működik. A miRNS indukálta génszabályozás vizsgálata során megállapították, hogy a folyamatban résztvevő gének hiánya okozza a mutáns növények morfológiai elváltozásait, úgymint törpülés, levélfodrozódás. A vírusfertőzés során a gazdanövények részben hasonló morfológiai elváltozásai is megfigyelhetők, valamint a növényi vírusfajok elnevezése utal az általuk okozott tünetekre, ezért véleményem szerint a tüneteket okozó vírusok nagy valószínűséggel silencing szupresszor fehérjéket kódolnak. Szeretném megjegyezni, hogy a szakirodalomban óriási mennyiségű adat utal arra, hogy a növényi vírusok RNS silencing szupresszor aktivitással nem rendelkező strukturális és nem-strukturális fehérjéi is fontos szerepet játszanak a tünetek kialakításában.

A Partitiviridae családba sorolt szegmentált genommal rendelkező kriptikus vírusok sok növényfajban, köztük gazdaságilag fontos növényekben is előfordulnak. Tüneteket nem okoznak és nagyon alacsony szinten vannak jelen a növényi sejtekben, ezért is nevezték el őket kriptikus vírusoknak. Partitiviridae családból származó vírusok esetében nem azonosítottak silencing szupresszor aktivitású fehérjét. Elképzelhető, hogy a gazdanövény RNS silencing apparátusa szabályozza - tartja alacsony szinten - a vírus koncentrációját, de az sem kizárt, hogy a vírus pl. kompartmentalizálódással kerül el az RNS silencing hatását.

Mi lehet a silencing szupresszor fehérjék eredete? Eredetileg mi lehetett a szupresszor fehérjék őseinek a funkciója? Miből differenciálódhattak?

A RNS silencing szinte az összes eukarióta élőlényben megtalálható szekvenciaspecifikus RNS degradációs mechanizmus. Az RNS silencing folyamata hasonlóképpen játszódik le, a magas szekvencia homológia miatt a folyamatban résztvevő enzimek könnyen azonosíthatók a rendszertanilag távol álló élőlényekben is.

Azonban bizonyos eukarióta fehérjékben lévő funkcionális doménekhez hasonló motívumok néhány RNS silencing szupresszorban felismerhetők.

Például a Poleovirusok P0 silencing szupresszora egy ún. F-box motívumot tartalmaz, de a P0 ezen kívül nem hasonlít a növényekben található F-box fehérjékre. A P0 hatására az AGO1 fehérje ubiquitinálódik és a 26S proteasómán keresztül lebomlik. Az F-box domén egy 42-48 aminosav hosszúságú oligopeptid az eukarióta fehérjékben, azonban a P0 fehérjében csak egy öt aminosavas régió hozható összefüggésbe az F-box doménnel. Ezért véleményem szerint szerint a P0 F-box doménje egy F-box „core” doménnek felel meg.

Számos eukarióta fehérjében azonosítottak ún. glicin-triptofán ismétlődéseket (WG/GW, vagy „AGO hook”) tartalmazó fehérjéket, amelyek a AGO PIWI doménjéhez kapcsolódva pozitív hatással vannak a transzkripcionális és poszt-transzkripcionális silencing-re. Ismert néhány virális RNS silencing szupresszor, amelyek egy vagy több WG/GW domént tartalmaznak. A Tomato ringspot virus köpenyfehérjéje egy WG/GW domént tartalmaz és egy eddig nem azonosított mechanizmuson keresztül meggátolja a transzlációs repressziót a fertőzött sejtekben. Jelen dolgozat tartalmazza a három WG/GW domént tartalmazó SPMMV P1 fehérjével kapcsolatos eredményeimet. A P1 a WG/GW motívumok segítségével kapcsolódik az AGO1-hez, de a silencing szupresszor aktivitást a P1-ben lévő C4 cink ujj motívumot tartalmazó régió fejt ki. Szeretném megjegyezni, hogy a *Schizosaccharomyces pombe*-ban, a növényekben és az állatokban azonosított AGO-hook fehérjék legalább 25 WG/GW domént tartalmaznak. Az *Arabidopsis thaliana*-ban lévő ismétlődő WG/GW domént tartalmazó fehérjék a transzkripcionális silencing (TGS) kialakításához szükségesek és szintén a TGS folyamatához elengedhetetlenül szükséges AGO4-hez kapcsolódnak, de a poszt-transzkripcionális silencing-ben részt vevő - szintén *Arabidopsis thaliana* - AGO1 fehérjéhez nem mutattak affinitást. Saját munkám során is hasonló eredményre jutottam. Az SPMMV P1 három WG/GW domént tartalmazó régióját a *Drosophila melanogaster* GW182 fehérje több mint 30 GW/GW doménjéből kiválasztott három WG/GW doménjére cseréltem ki, de a hibridfehérje nem mutatott az AGO1-hez kapcsolható RNS silencing szupresszor aktivitást. A SUO ('shuttle' in chinese) fehérje aktivitása hatékonyabbá teszi a miRNS indukálta RNS silencing-et *Arabidopsis thaliana*-ban. Bár a SUO két WG/GW domént is tartalmaz, fizikai kapcsolatot eddig még nem mutattak ki az AGO1 és a SUO fehérjék között. A HESO (Hen1 Suppressor 1) fehérje egy WG/GW domént tartalmaz és uridilil-transzferáz aktivitása

segítségével poli-uridilálja a kis RNS-ek 3' végén levő nem metilált nukleotidot, így a miRNS-ek fél-életidejének szabályozásában játszik szerepet. A HESO1 az AGO1 fehérjébe töltődött miRNS-eket is elfogadja szubsztrátjának, ezért könnyen elképzelhető, hogy az AGO1-hez kapcsolódva a HESO1 hatékonyabban működik.

Ezek az eredmények azt sugallják, hogy az AGO4 és AGO1 közvetítette RNS silencing útvonalak elváltak az evolúció során. Az AGO4 a WG/GW doméneket sokszoros ismétlődésben tartalmazó fehérjékre, míg az AGO1 a maximum kettő WG/GW domént tartalmazó endogén fehérjékre specializálódott. Valószínűleg ez lehet a magyarázata annak, hogy a AGO1 target RNS hasítását gátló SPMMV P1 fehérjében három WG/GW domén található, ezek közül legalább kettő szükséges és elégséges a silencing szupresszor aktivitáshoz. Bírálóm kérdésére nem könnyű válaszolni. Elméletileg a „mini” F-box és a P1 fehérjében lévő WG/GW domének az eukarióta fehérjékkel párhuzamosan is kialakulhattak. Elképzelhető az is, hogy az F-box vagy a WG/GW domént kódoló növényi mRNS szakaszok egy rekombinációs esemény következtében a vírus genom részévé válnak és a pozitív szelekció hatására stabilizálódnak. Ez a lehetőség egy közös őst létét feltételezi.

Érdemes megemlíteni, hogy rendszertanilag távoli vírusok esetében a szupresszor fehérjék között nincs sem nukleotid sem aminosav szinten homológia. Ennek ellenére, például a Tombusvirus (Tombusviridae), Tobamovirus (Virgaviridae), Potyvirus és Ipomovirus (Potyviridae) családokba tartozó fajok is siRNS kötő silencing szupresszorokat kódolnak. Ezek a fehérjék funkcionális analógoknak tekinthetők, mivel a kis RNS-ek különböző szerkezeti elemeit, úgymint a duplaszálú régiót követően a 3' végén lévő kettő túlnyúló nukleotidot, az 5' végükön lévő foszfát csoportot, vagy a kis RNS-ben lévő duplaszálú régiót ismerik fel, ezért nagy valószínűséggel párhuzamosan alakultak ki az evolúció során.

Ismertek-e olyan növényi fehérjék amelyek virális szupresszorokhoz hasonlóan gátolják a kis RNS-ekhez kapcsolódó silencing-et?

Az RNS silencing folyamatában résztvevő ún. „core” gének, úgymint DICER és AGO azonosítása után számos más génről derült ki, hogy fontos szerepet játszanak a különböző funkciót betöltő RNS silencing útvonalak működésében. A legtöbb gén pozitívan hat az RNS silencing folyamatára, de legalább négy gén fehérjeterméke negatív hatást fejt ki erre.

Az *A. thaliana* SQUINT (SQN) gén mutációja az AGO1 fehérje szintjének csökkenését okozza, a Sqn génterméke homeosztatisz körülmények között feltehetően az AGO1 fehérjét stabilizálja. A sqn mutáns mutagenizálásával találták egy olyan revertáns vonalat (fbw2), ami nem allélikus a Sqn lókusszal. Az FBW2 (F-box w2) fehérje az SCF (Skp1, cullin, F-box)

ubiquitin ligáz komplex egyik alegysége, így az FBW2 az AGO1 ubiquitinálódását és a 26S proteoszómán keresztüli lebomlását segíti elő. Ezért az FBW2 fehérjét az AGO1 negatív regulátorának tekintjük.

A Hua Enhancer 1 (HEN1) gén metiláz enzimet kódol, amely a kis RNS-ek 3' végén lévő nukleotidot metilálja. A hen1 mutáns növényekben az érett miRNS-ek mennyisége lecsökken, azonban a még detektálható miRNS-ek mérete néhány nukleotiddal megnő. A hen1/hesol (Hen1 Suppressor1) kettős mutánsban a miRNS-ek stabilabbnak mutatkoztak, mint a hen1 mutánsban. A HESO1 gén egy nukleotidil-transzferáz fehérjét kódol, ami a 3' végén nem metilált kis RNS-eket poli-uridilálja. Ez a 3' végi módosítás a kis RNS-ek degradációját indítja el, ezért a Hesol gén is az RNS silencing negatív regulátorának tekinthető.

Az AGO fehérjék nemcsak a target RNS hasításában, hanem a kis RNS-ek stabilizálásában is fontos szerepet játszanak. Az AGO1 és -10 fehérjék a miR165/6 miRNS-eken keresztül vesznek részt a növények merisztémáinak fenntartásában. Azonosítottak egy exonukleáz aktivitással rendelkező enzim családot (Small RNA Degrading Nuclease, SDN), amely az AGO1 és -10 fehérjékhez kötött kis RNS-ek (a merisztémában a miR165/6) degradációját indítja el. Azonban az AGO10-ben lévő kis RNS-ek jóval érzékenyebbek az SDN enzimek általi degradációra, így az SDN fehérjék és az AGO1-10 aránya fontos szerepet játszik a merisztéma fenntartásához szükséges miR165/6 szintjének kialakításában. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy az AGO10 és az SDN enzimes család az RNS silencing negatív regulátoraiként működnek.

Érdekes módon két virális RNS silencing szupresszort írtak le napjainkig, amelyek hasonló módon gátolják a kis RNS indukálta silencing folyamatát, mint az általam említett RNS silencing-et negatívan szabályozó növényi fehérjék.

A Poleovirusok P0 silencing szupresszora az *A. thaliana* FBW22 fehérjéhez hasonlóan egy F-box motívumot tartalmaz, mely az AGO1 destabilizálását és 26S proteoszómán keresztüli lebontását indítja el.

A Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) által kódolt p22 fehérje a kis RNS-ek endonukleolitikus degradációját eredményezi. Azonban a p22 egy dsRNS kötő fehérje, amely a ds kis RNS-eket hasítja el, ezzel szemben az 3' vég RNS exonukleáz aktivitással rendelkező SDN nukleázok az AGO1 és -10 fehérjékben lévő egyszálú kis RNS-eket bontják le.

Szeretném megjegyezni, hogy a P0 és p22 fehérjéket hamarabb írták le és jellemezték, mint a hasonló hatású, ezért funkcionális analógnak tekinthető növényi fehérjéket.

Van-e olyan (növényi) mechanizmus, ami a silencing szupresszort gátolja? Van-e következő lépése a „fegyverkezési versenynek”? Lehetséges-e szupresszor gátlással javítani a haszonnövények vírusrezisztenciáját? Van-e erre példa?

Elméletileg az evolúció során megjelenhetett olyan növényi mechanizmus, ami közvetlenül gátolja a virális szupresszorok működését. Ismertek olyan silencing szupresszorok, amelyek dimer vagy oligomer formában vannak jelen a sejtekben. Ezért az alegységek összekapcsolódásának meggátlása egy működő stratégia lehetne. A virális fehérjék a legtöbb vírus esetében akár nagyságrendekkel is nagyobb koncentrációban vannak jelen, mint a gazdasejt fehérjei, ezért ez a stratégia nem tekinthető versenyképesnek.

Bizonyos növényi rezisztenciagének képesek a szupresszor fehérjék felismerésére és a vírusfertőzés tovább terjedésének megakadályozására.

A növény-patogén kapcsolat leírására jelenleg a cikk-cakk modell a legelfogadottabb. A modell szerint a növény felismeri a kórokozó felszínén található bizonyos molekulákat (Pathogen Associated Molecular Pattern, PAMP). Vírusfertőzés esetében a vírusok replikációs intermediere (dsRNS) és a vírusok által kódolt strukturális és nem-strukturális fehérjék egyaránt PAMP-ként viselkedhetnek. A dsRNS növényi receptorai, a DCL (Dicer-like) enzimek beindítják a gazdanövény nukleinsav alapú antivirális RNS silencing folyamatát (PTI, PAMP Triggered Immunity). Az RNS silencing egy nagyon hatékony szekvenciaspecifikus antivirális válaszreakció, így a vírus-gazda ko-evolúció során számtalan vírusfajban megjelentek olyan fehérjék, az ún. RNS silencing szupresszorok (effektor molekuláknak felelnek meg), amelyek képesek blokkolni az antivirális RNS silencing-et. A cikk-cakk modell második lépésében a vírusok által kifejtett szelekciós nyomás következtében a növényekben megjelentek a különböző virális fehérjéket - köztük RNS silencing szupresszorokat - felismerni képes rezisztenciagének. A rezisztenciagének által felismert effektor molekulák így válnak avirulencia génekké (Avr). A rezisztenciagének direkt vagy indirekt módon felismerik az Avr géneket, majd hyperszenzitív reakciót (HR) váltanak ki. Ennek során a fertőzött sejtek erősen toxikus szabadgyököket termelnek, ami a sejt pusztulásához vezet, így gátolva meg a patogén tovább terjedését. Amennyiben a patogén-növény ko-evolúció következő lépésében a vírus mutáción esik át, ennek következtében egy olyan megváltozott effektor fehérje alakulhat ki, amit a rezisztenciagén már nem képes felismerni. Így kerülhet a vírus „lépéselőnybe” a gazdanövényvel szemben, és a „fegyverkezési verseny” folytatódik tovább.

Két viszonylag egyszerű módszer segítségével könnyen megállapítható, hogy egy vírus adott génterméke – beleértve a silencing szupresszor fehérjét is - Avr faktorként viselkedik-e egy adott növényben. Egy szemléletes példát szeretnék megemlíteni ezzel kapcsolatban. A TBSV (Tomato bushy stunt virus) p19, köpeny- és mozgási fehérjéje egyaránt Avr faktorként

viselkedik bizonyos növényekben. A p19 fehérje szisztémikus HR-t okoz *Nicotiana benthamiana*-ban és *Nicotiana clevalendii*-ben. Hét p19 mutáns hatását vizsgálták, hat esetében tapasztaltak gyengébb HR indukáló képességet. Érdekes módon azok az aminosavak okoztak HR intenzitás csökkenést, amelyek a kis RNS végének, a kis RNS gerincén lévő foszfát csoportok kötésében, valamint a p19 dimer stabilizálásában vesznek részt. Ugyanakkor a mutáns fehérjék siRNS kötő képessége jelentősen csökkent. Ezért nagy valószínűséggel a két növényben lévő rezisztenciagén(ek) a stabil kis RNS-p19 RNS fehérje komplexet ismerik fel. Jelen dolgozat eredményei is azt mutatják, hogy a vírusfertőzött sejtekben, legalábbis a *N. benthamiana*-ban, a p19 fehérje szinte kizárólag RNS-fehérje komplex formában található meg. A vírusok által kódolt strukturális és nem-strukturális fehérjéit felismerő növényi rezisztencia gének régóta ismertek. Amennyiben a rezisztencia gén nem ismert, akkor ezt a keresztezéssel át lehet vinni át lehet vinni a gént a gazdaságilag fontos növényfajtákba. Ez egy hosszabb folyamat, amelynek során több visszakeresztezési lépés (amennyiben lehetséges) és szelekció szükséges a rezisztencia és az elit fajta kedvező tulajdonságainak megőrzéséhez. Jó példa erre az ún. N-gén ami a dohány nekروزis vírussal szemben biztosít rezisztenciát a *Nicotiana tabacum* Xanthi fajtában is. Azonban a TMV-ob törzse áttöri az az N-génnel szembeni rezisztenciát. A rezisztencia áttörésében szerepet játszó aminosavakat a TMV RdRP (RNA dependent RNA Polimerase) génjének helikáz doménjében azonosították. Amennyiben ismert a rezisztencia gén, akkor az akkor az R gén stabil transzgenikus expresszálatásával rezisztens elit fajta hozható létre.

Történetek-e lépések az eredmények, a kidolgozott technológiák gyakorlati alkalmazására? Milyen lehetőségeket lát a biotechnológiai célú fejlesztések területén?

Több tudományterületre és az alkalmazott biotechnológiai kutatásokra is óriási hatással volt a p19 fehérje siRNS kötő aktivitását és 3D szerkezetét bemutató két tanulmány (Silhavy et al., 2002; Vargasson et al., 2003). Azóta számos virális RNS silencing szupresszort ismertünk meg, de a legtöbb ilyen irányú eredményt mégis p19 fehérjével kapcsolatban született. A silencing szupresszorokat eddig legalább négy különböző területen használták fel.

1. RNS silencing útvonalak térképezése modell élőlényekben.

A növényekben három különböző méretű (21, 22 és 24 nt), de nagyon hasonló szerkezetű kis RNS irányítja az RNS silencing folyamatát. Transzgenikus *Arabidopsis thaliana* növényekben öt silencing szupresszor hatását vizsgálták meg. Megállapították, hogy mindegyik fehérje gátolta a siRNS alapú silencing-et, azonban csak három szupresszor volt hatásos a miRNS indukálta RNS silencing-gel szemben. Születtek azonban ennek ellentmondó eredmények is.

Tulajdonképpen az eddig ismert összes kis RNS kötő silencing szupresszor kisebb-nagyobb mértékben gátolja a miRNS irányította RNS silencing-et. A hatékonyságbeli különbségnek az lehet a magyarázata, hogy ezeknek a fehérjéknek kisebb az affinitása miRNS-ekhez, mint a duplaszálú régióban 100%-ban homológ siRNS-eknek.

A növényi vírusok „sikeressége” terjedésük hatékonyságán is múlik. Az RNS silencing aktiválódásával párhuzamosan a sejtekből egy ún. mobilis szignál indul el, ami a vírusok rövid és hosszútávú terjedését hivatott meggátolni. A p19 fehérje virális és transzgenikus háttérben megakadályozta mind a rövid és hosszútávú mobilis szignál terjedését, amiből arra következtettek, hogy a 21 nt siRNS-ek kapcsolják be a növény távoli részeiben az RNS silencing folyamatát.

A p19 hatását emberi sejtenyészetekben is vizsgálták. A citoplazmába és a sejtmagba lokalizált p19 viszonylag hatékonyan kötötte meg a különböző kis RNS-eket. Érdekes módon leginkább G-C nukleotid párokban gazdag kis RNS-eket izoláltak, valószínűleg azért, mert a magas G-C arány a kis RNS duplaszálú formáját stabilizálja.

2. Transzgenek expressziójának növelése silencing szupresszorok alkalmazásával

A vad típusú virális RNS silencing szupresszorokat termelő transzgenikus növények sokszor erős fejlődési rendellenességeket mutatnak. Ennek oka az lehet, hogy a szupresszor fehérje legalább részlegesen gátolja a miRNS vezérelte RNS silencing-et. Ismertek a p19 fehérjének olyan mutáns változatai, amelyeknek kisebb a kis RNS-ekhez mutatott affinitása. Bizonyos mutáns változatok stabil transzgenikus expressziója nem okozott súlyos fejlődési rendellenességeket, azonban még mindig hatékonyan támogatta a kifejezni kívánt fehérje expresszióját.

3. Kis RNS-ek dúsítása

Kis RNS kötő képességgel rendelkező fehérjék alkalmazásával a duplaszálú kis RNS-ek specifikusan izolálhatók és nagy áteresztő képességű szekvenálással azonosíthatók. Ennek akkor van jelentősége, ha kizárólag a duplaszálú formában lévő kis RNS molekulákkal kapcsolatos problémával foglalkozunk. A sejtekben és az RNS preparátumokban is a miRNS-ek jelentős hányada egyszálú formában van jelen az AGO fehérjékhez kötve. A New England Biolabs napjainkban is forgalmaz egy a p19 rekombináns fehérjét tartalmazó kis RNS dúsító kit-et.

4. Kis RNS-ek bejuttatása emlős sejtekbe

A RNS silencing egy szekvenciaspecifikus RNS degradációs folyamat, ezért nagy lehetőséget láttak a klinikumban való alkalmazására. A kutatások legalább két különböző irányban indultak el. A kis RNS prekursorokat virális vektorokkal bejuttatják a sejtekbe vagy kémiai módosítással próbálják megkönnyíteni a siRNS-k penetrációját. Jó alternatívának tűnt a p19

ezirányú felhasználása. A p19 stabil komplexet alkot a kis RNS-sel, azonban maga a komplex nem jut át a sejtmembránon. A HIV (Human Immunodeficiency Virus) Tat fehérje egy pozitív töltésű peptidjét fuzionáltatták a p19 fehérjével és ez a módosítás jelentős mértékben megnövelte a membránon való áthaladás hatékonyságát. A másik fontos kérdés az volt, hogy hogyan kerül át a kis RNS a p19 komplexből az RNS silencing végrehajtó fehérje komplexébe a RISC-be. A p19-siRNS komplex egy viszonylag szűk pH tartományban stabil, így az endoszómában lévő alacsony pH hatására destabilizálódik, ezért a kis RNS eljuthat a citoplazmába és kifejtheti hatását. Ez a rendszer emlős sejtekben hatékonyan működik, azonban a siRNS alapú terápiának (is) jelenleg limitált az alkalmazhatósága, mert egyelőre nincs megnyugtató módon megoldva a terápiás molekula adott szövetekbe, szervekbe, tumorba való célzott bejuttatása.

Szeged, 2019. 01. 19.

Tisztelettel:

Lakatos Lóránt