

DERLEME

RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları

Ahmet KARAGÜZEL, Ersan KALAY, Figen CELEP

Karadeniz Teknik Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Trabzon.

ÖZET

RNA interferans (RNA girişimi=RNAi), memeli hücrelerinde transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesi için güçlü bir vital alettir. Küçük interfering RNA veya siRNAs, hedef gene komplementer bir kodlayıcı dizi taşır. RNA interferansın tedavi edici potansiyel değeri çok sayıda in-vitro çalışmalarda ve in vivo denemelerde gösterilmiştir. Diğer yandan viral, nörodejeneratif, inflamator ve otoimmün hastalıklarda gen sessizleştirilmesi gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: RNA interferans. siRNAs. Gen sessizleştirilmesi. Fonksiyonel genomik.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi), is a powerful vital tool for post-transcriptional gene silencing in mammalian cells. Small interfering RNA, or siRNA, includes the coding sequence which is complementary to the target gene. The potential therapeutic value of RNAi has been demonstrated on a wide variety of in vitro and in vivo studies. On the other hand gene silencing, has been shown in viral, neurodegenerative, inflammatory and autoimmune diseases.

Key Words: RNA interference. siRNAs. Gene silencing. Functional genomics.

mRNA seviyesinde gen ekspresyonunun durdurulması için kullanışlı bir metodun bulunması, son 15 yılda moleküler biyologların rüyası olmuştur. Bu gün RNA interferans (RNAi) = RNA girişimi; modern biyolojide ve tıpta önemli gelişmelere yol açacak bir fenomen olarak düşünülmektedir. RNAi, gen fonksiyonu (fonksiyonel genomik) araştırmalarında üzerinde yoğun araştırma yapılan yeni bir alandır. RNAi, Science dergisi tarafından 2001 de “yılın molekülü” ve “2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi” seçilmiştir. M.I.T.’den Nobel ödüllü Prof. Dr. Phillip Sharp, “RNAi, son on yılın en heyecan verici keşfidir” demiştir.

RNAi, genetik transformasyon çalışmaları sırasında ortaya çıkan önemli bir buluştur. İki botanikçi Napoli ve Stuitje grupları, bitkilerde chalcone synthase (*chs*) geninin over-ekspresyonunu konusunda bir rapor yayınlamışlardır. Bu araştırmacılar, petunyada pigmentasyonu katalizleyen enzimlerin etkilerini, gen (*chs geni*) ilave ederek artırmak istemişlerdir. Ne zaman daha mor petunyalarda elde etmeyi denemişlerse

bazen beklenmeyen ters sonuçlar (daha beyaz petunyalarda) elde etmişlerdir^{1,2}. Bu mekanizma, o zaman sırrını korumasına karşın, daha sonra Jorgensen ve Ark. bunun sebebinin chalcone synthase geni (*chs*) içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonunun bir sonucu olduğunu ve bunun bir PTGC (yazılım sonrası gen sessizleştirilmesi) ile ilgili olabileceğini rapor ettiler. (*chs* geninin Over-ekspresyonunun baskılanması³).



Şekil 1.

Petunia'da *chs* geninin ekspresyonunun baskılanması ile değişen pigmentasyon¹.



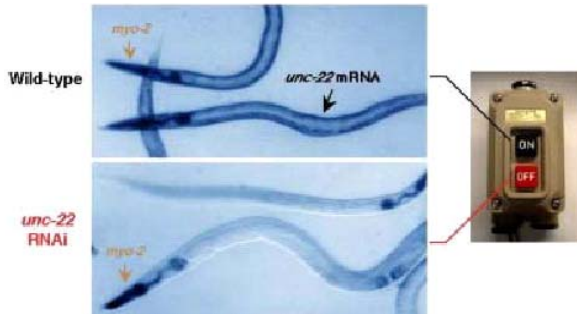
Şekil 2.

Bir satellit-virus silencing sistemi ile infekte edildikten 4 hafta sonra tütün bitkisinin fenotipik görünüşü¹⁴.

Geliş Tarihi: 19.03.2007
Kabul Tarihi: 19.06.2007

Dr. Ahmet KARAGÜZEL
Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
Trabzon

Daha sonra, MIT den Craig Mello ve Washington Carnegie Enstitüsü'nden Andrew Fire bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta dsRNA'nın, gen ekspresyonunu spesifik ve selektif olarak inhibe ettiğini ilk defa deneysel olarak gösterdiler⁴. Burada pigment üreten gen, güçlü bir promotörün kontrolü altındadır. Bu fenomen aslında bir co-supresyonudur ve ilgili homolog gen baskılanmıştır. Son yıllarda yapılan araştırmalar ile, etkili gen sessizleştirme mekanizması birçok türde başarı ile gösterilmiştir, bunlar: Funguslar (*Neurospora*), bitkiler (*Petunia*, *Nicotiana*, *Arabidopsis*), omurgasızlar (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Paramecium*, *Trypanosoma*)dır. Bu modeller artık memelilere de uygulanmaktadır⁸.



Şekil 3.

C. Elegans'ta hedef mRNA düzeyinin seçilmiş dsRNA ile reduksiyonu. (bir kas-ekspresyon geni *unc-22*)⁴

Bir hedef genin transkriptinin, sekans spesifik (diziye özgü) bir ilişki temelinde, çift zincirli RNA (dsRNA) ile durdurulması olayı, RNA interferansı (RNAi) olarak tanımlanmaktadır⁴. dsRNAi, aslında hücrede normal bir savunma sisteminin katalitik yolunu aktive eder. Bu işlemin temeli, hedef mRNA zincirine komplementer bir dsRNAi'nin tek zincirini kullanmaktır, (antisense zincir, 21 baz). Bu işlemde dsRNA, aktarıldığı hücrelerde küçük interfere edici RNAi'lere parçalanır. Bunlara siRNA (small interfering RNA) denir. Olay bir hücrel mekanizmadır ve hücrede oldukça komplike bir biyolojik regülatör makine olarak görev yapar. RNA interferansı, istenmeyen yabancı genlerin (eksternal RNA lar ve viral genler, transpozonlar v.b. gibi moleküler parazitler) elimine edilmesi ve aynı zamanda gen ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonunda hücrede kullanılan bir mekanizmadır.

RNA İnterferansın Mekanizması

İnsanda 250 civarında genin dsRNA ve mikro RNA ekspresyonu yaptığını biliyoruz. İnterferansta önemli nokta; hedef mRNA içinde doğru 21 nükleotidlik

komplementer sekansın bulunmasıdır, (21-base target site). RNA interferansı iki önemli adımda gerçekleşir: Birinci adım; geniş dsRNA'sının 21-23 nükleotidli küçük RNA'lara ayrılmasıdır. İkinci adım ise; hedef mRNA'nın belirlenmesi ve yıkılmasıdır.

Meyve sineğinde (*Drosophila*) yapılan çalışmalar göstermiştir ki; RNAase III familyası enzim (DICER) ve nükleaz aktiviteli multiprotein kompleksi (RISC= RNA- Induced Silencing Complex) bu işlemde iki önemli oyuncudur^{5,6}. dsRNA'nın siRNA'lara kesilmesi bir ATP- bağımlı nükleaz enzimce katalizlenir. Bu enzim RNAase III familyası nükleaz veya DICER diye adlandırılır. Bu proteinin N- terminali bir Helikaz domeini, C- terminali ise dsRNA-binding domeini taşır. Ayrıca tandem RNAase III domaini taşır. PAZ domaini RNA'ya bağlanır.

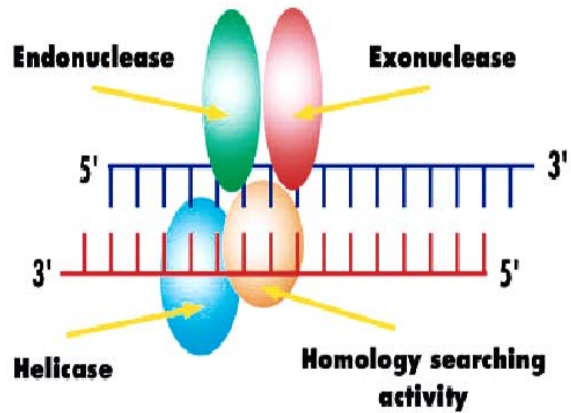
RISC (RNA- induced silencing complex = RNA tetikli sessizleştirme kompleksi), nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi, (500 kDa). Yapısında endonükleaz, eksonükleaz ve helikaz enzimlerini içerir. siRNA etkisi ile komplementer hedef mRNA'yı belirler ve bozulmasını tetikler.



Şekil 4.

Dicer'in domain strüktürü⁶

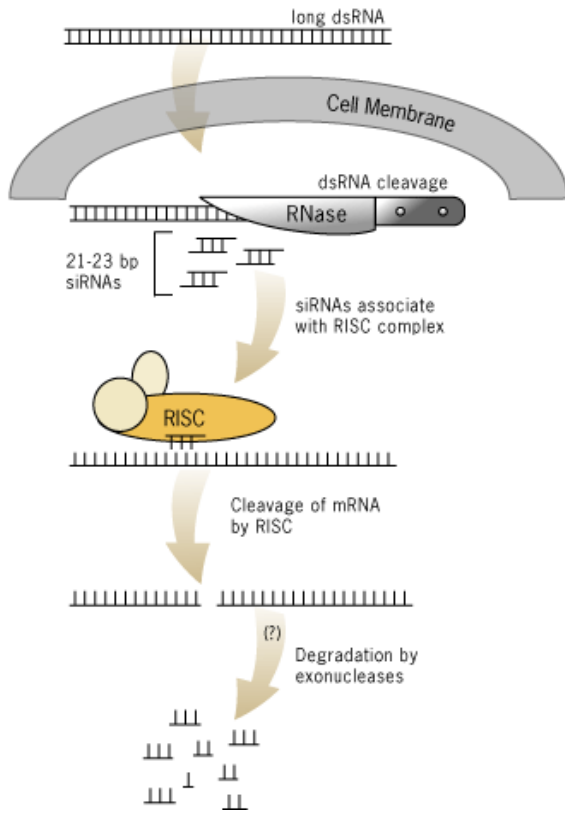
RISC (RNA- induced silencing complex = RNA tetikli sessizleştirme kompleksi), nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi, (500 kDa). Yapısında endonükleaz, eksonükleaz ve helikaz enzimlerini içerir. siRNA etkisi ile komplementer hedef mRNA'yı belirler ve bozulmasını tetikler.



Şekil 5.

RISC kompleksinin düşünülen modeli⁶

RNA İnterferans



Şekil 6.

RNA sessizleştirme mekanizmasının genel işleyişi.⁽¹⁵⁾

RNA interferansın mekanizması beş temel işlem halinde özetlenebilir, bunlar⁶:

1. dsRNA tanıma ve tarama prosesi.
2. dicer-RDE-1 (RNAi deficient-1) yani bir RNase III familyası enzim eşliğinde çift zincirli dsRNA'nın tanınması ve kesilmesi,
3. siRNAs üretimi: 21-23 nukleotid uzunluğunda RNA ların oluşması,
4. siRNA-RİSC kompleksi ikilisinin spesifik komplemanter mRNA bölgesi ile bileşmesi,
5. RISC içindeki exonukleazlar tarafından hedef mRNA'nın tahrip edilmesi ve RISC kompleksinin yeni bir işlem için başa dönmesi.

RNAi'nin Memelilerde Uygulanması ve Tedavi

RNAi bir çok omurgasız türünde oldukça aktiftir.

Son yıllarda bu teknolojinin memelilere adapte edilmesi bir hayli cezbedici bir alan olmuştur⁷. RNAi in terapötik değeri özellikle *in vitro* uygulamalarda defalarca gösterilmiştir. *In vivo* uygulamalar umut vericidir ancak henüz emekleme aşamasındadır. Memelilerde viral enfeksiyonlara karşı koruyucu

fenomenler olarak geliştirilen interferon vevap (transenfekte hücrelerde non-spesifik mRNA dejenerasyonuna yol açar) ve apoptozisin uyarılması problemini aşmak için interferans, uzun dsRNA uyarılmadan yapılmalıdır. Bu yüzden DICER adımı bypass edilerek sentetik siRNA lar kullanılmaktadır. siRNA lar, bu gün memeli hücrelerinde çok sayıda gen ekspresyon çalışmalarında kullanılmaktadır ve bir çok metotla elde edilebilmektedir:

- 1- Kimyasal sentez (siRNA Construction kits).
- 2- İn-vitro transfeksiyon,
- 3- DİCER ile uzun dsRNA ların kesimi
- 4- DNA temelli vektör kasetlerle (Plazmid ve viral) hücre içinde üretim,

Seçilen mRNA da hedef bölgeyi bulabilmek için çok sayıda siRNA, mRNA'nın çeşitli bölgeleri için denenmektedir. Homolojinin derecesini belirlemek için yapılan çalışmalarda bu gün microarray teknolojisi kullanılmaktadır.

Uygulamalarda iki temel alan vardır. Bunlardan birisi, RNAi temelli yeni ilaçların dizaynı çalışmalarıdır. Konu ile ilgili olarak yoğun araştırmalar devam etmektedir. RNAi -temelli oligonukleotidlerin hedef hücreye verilmesinde problemler vardır: verilme miktarı, immün cevap, hücre membranından transport v.b.gibi. Öncelikli amaç, hedef genler için geniş dsRNA ve RNAi kütüphanesinin oluşturulmasıdır. 2004 yılı satış 850 milyon \$, 2015 yılında beklenen 6 milyar \$ dir. Diğeri ise RNAi temelli tedavi çalışmalarıdır. Bu uygulamada temel strateji; zararlı proteinlerin sentezinin ilgili genin sessizleştirilmesi ile önlenmesidir. İlk uygulamalar onkogenler ve viral enfeksiyonlarda hedef viral genler üzerinde yapılmıştır. RNA inin tedavi edici değeri çok sayıda in-vitro çalışmada gösterilmiştir. Özellikle gen sessizleştirilmesi viral hastalıklarda uygulanmıştır, (HIV/AIDS, influenza, insan papillomavirus enfeksiyonu, hepatit, SARS). Diğeri yandan nörodejeneratif hastalıklar (Parkinson, Alzheimer gibi), kanser, romatoid arthridis, otoimmün hastalıklar üzerinde de araştırmalar ve uygulamalar vardır. HIV- enfekte akyuvarlarda ex-vivo uygulamalar gibi. Diğeri yandan kanser, HIV enfeksiyonu, SARS, romatizma, grip, astım, hepatit-C, kas distrofileri, moleküler dejenerasyonlar, Alzheimer, çiçek v.b. gibi hastalıklarda hayvan deneylerinde ve insanlara uygulamalarda ümit veren gelişmeler vardır⁹⁻¹³.

Sonuç olarak; "Yazılım sonrası gen sessizleştirilmesi (Post transcriptional gene silencing=PTGS)" veya "RNA girişimi (RNA interference = RNAi)", gen ekspresyonunun durdurulması için kuvvetli bir vital alettir ve gen ekspresyonunun inhibisyonunda yeni bir yaklaşımdır. Bu konudaki çalışmaların bazı hastalıkların tedavisinde yeni ufuklar açması beklenmektedir.

Kaynaklar

- 1- Napoli C, Lemieux C, and Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* result in suppression of homologous reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 1990; 2:279-289.
- 2- Alexander R, Krol V D, Lenting P E, Venestra J, Van Der Meer I M, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje A R. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 1988; 333, 866-869.
- 3- Jorgensen R A, Cluster PD, English J, Que Q, Napoli CA. Chalcone synthase cosuppression phenotypes in *petunia* flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. kompleks T-DNA sequences. *Plant Mol Biol* 1996; 32(5):957-73.
- 4- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and spesific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998;391(6669):806-11.
- 5- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschli T. RNA interference is mediated by 21 and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15(2):188.
- 6- Akashi H, Miyagishi M, Taira K. Supression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001; 11(6):359-67.
- 7- Padisson PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNSs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16(8):948-58.
- 8- Ruitz F, Vayssie L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 1998; 9(4)931-43.
- 9- Margues JT, Williams RG. Nucleofection and RNAi. *Nat Biotechnol* 2005; 23(11):1399-405.
- 10- Vorhies JS, Nemunaitis J. Nonviral delivery vehicles for use in short hairpin RNA-based cancer therapies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2007; 7(3):373-82.
- 11- Sun Y, Li Z, Li L, Li J, Liu X, Li W. Effective inhibition of hepatitis B virus replication by small interfering RNAs expressed from human foamy vectors. *Int J Mol Med* 2007;19(4):705-11.
- 12- Masiero M, Nardo G, Indraccolo S, Favaro E. RNA interference: Implications for cancer treatment. *Mol Aspects Med* 2007; 28(1):143-66.
- 13- Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nat Rev Genet* 2007; 8(3):173-84
- 14- Peter M, Waterhouse and Christopher A.Hellivel. Exploring plant genomes by RNA-induced gene silencing. *Nature Review* 2003;Volume 4,29-38.
- 15- Ambion Inc., RNA Interference Overview, The RNA Company 2007.