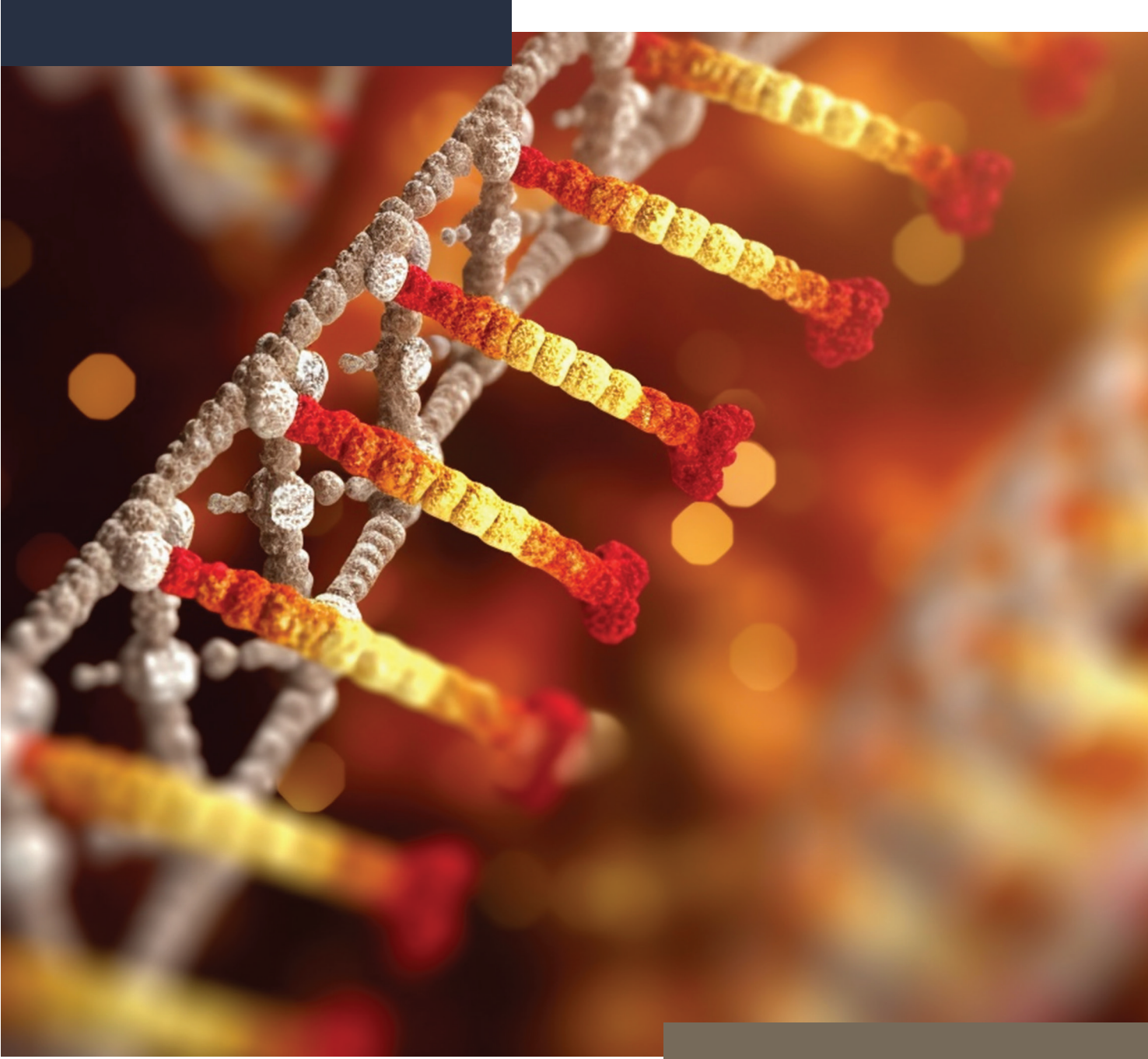


# RNA GİRİŞİMİNİN KEŞFİ



# Çift Sarmallı RNA Tarafından Gen Susturulması

Merve Çalışır ve Dr. Adil Denizli

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

2006 Nobel Fizyoloji veya Tıp Ödülü, California Stanford Üniversitesi'nden Profesör Andrew Fire'a ve Profesör Craig Mello'ya, Worcester Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) RNA interferansı (RNAi) olarak adlandırılan gen susturucu etkisini keşfettikleri için layık görüldü. Nobel Fizyoloji veya Tıp Komitesi Başkanı Profesör Güran K. Hansson, Nobel Ödülü sunum konuşmasında keşiflerinin etkisini "genetik bilgi akışını düzenlemek için yeni bir ilkeyi ortaya çıkardığını" söyleyerek özetledi, yaşam anlayışımıza "yeni bir boyut" eklemenin yanı sıra tıp için yeni araçlar sağladı. Fire ve Mello, "parlak çalışmalarında", "Çift sarmallı RNA'nın aktive olduğu" büyük bir düzenleyici adım belirlemişlerd, hangi genin susturulacağını belirleyen RNA molekülündeki genetik kod ile gen susturulmasına yol açan enzimatik bir mekanizma. Bu keşfin önemi, Nobel Ödülü'nün ilk yayınlanmasından sadece sekiz yıl sonra verilmiş olması gerçeğiyle vurgulanıyor. Bulguları, RNAi'yi tanımlamaları, hücrelerde gen düzenlemesinin altında yatan mekanizmalara ilişkin anlayışımızı değiştirmenin yanı sıra, RNAi'yi genleri manipüle etmek için biyolojik araştırmalarda önemli bir araç haline getirdi. Bu baskı ve geniş bir hastalık yelpazesi için yeni bir terapötik modalite olarak büyük bir potansiyele sahiptir. Bu bölümde, bilimsel yolculuklarının onları gen ifadesini kontrol eden mekanizmaları araştıran yeni araştırma alanları açan RNAi'nin keşfine nasıl götürdüğünü anlamak için her iki Nobel Ödülü Sahibinin de bilimsel geçmişlerini gözden geçireceğiz. RNAi'nin biyomedikal araştırma ve klinik tıbbın sahip olduğu ve gelecekte sahip olacağı etkiyi inceleyerek bitireceğiz.

## ÖDÜL KAZANANLARIN BİYOGRAFİLERİ VE BİLİMSEL GEÇMİŞLERİ

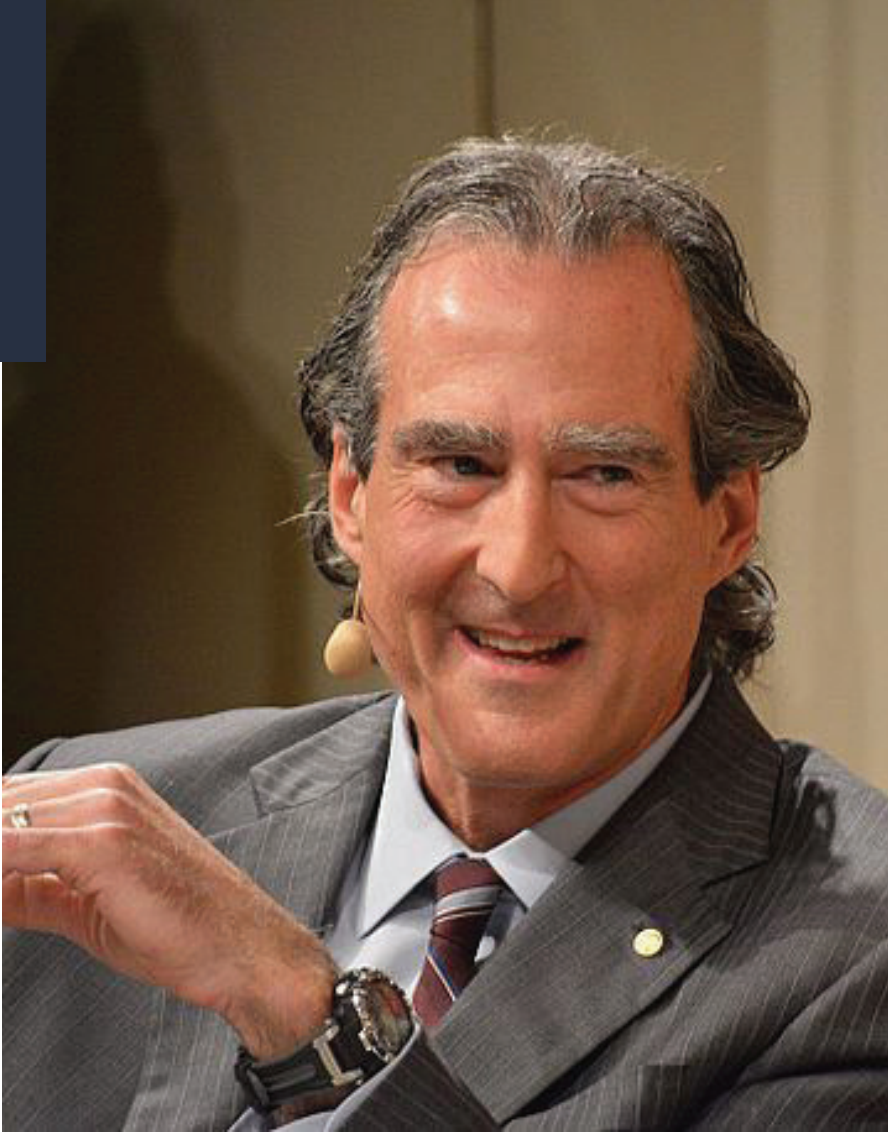
### Andrew Fire

Andrew Fire 1959'da doğdu ve California'da büyüdü. 1978'den 1983'e kadar Massachusetts Institute of Technology'de Nobel Ödülü Sahibi'nin danışmanlığında 'Adenovirüsün Vitro Transkripsiyon Çalışmaları' başlıklı doktoraasını yapmadan önce Berkeley'deki California Üniversitesi'nde matematik diploması aldı. Doktorasını tamamladıktan sonra Fire, Helen Hay Whitney Vakfı Üyesi olarak Tıbbi Araştırma Konseyi Moleküler Biyoloji Laboratuvarı, Cambridge, Birleşik Krallık'a geçti ve burada Nobel Ödülü sahibi Sydney Brenner başkanlığındaki *Caenorhabditis elegans* grubunda çalıştı. Fire'in Cambridge'deki araştırması mikroenjeksiyon teknolojisine odaklandı ve burada *C. elegans* solucanlarında yabancı DNA'yı ifade etmek için teknikler geliştirdi. Fire, *C. elegans*'ın erken gelişimi sırasında gen düzenlemesini araştırmak için Ulusal Sağlık Enstitüleri tarafından verilen kendi bağımsız araştırma ödeneği ile Maryland, Baltimore'daki Washington'daki Carnegie Enstitüsü'nün Embriyoloji Bölümünde araştırmacı olarak 1986'da ABD'ye döndü. 1989'da Carnegie'ye düzenli personel olarak atandı ve şu anda Patoloji ve Genetik Profesörü olduğu Stanford Üniversitesi Tıp Fakültesi'ne Kaliforniya'ya geri taşındığı 2003 yılına kadar orada kaldı. Carnegie'deyken Fire, klonlanmış genlerin işlevini araştırmak için bir araç olarak DNA dönüştürme teknolojisini geliştirmeye devam etti. Fire'in çalışmasına uygulamak istediği önemli bir araç, belirli genlerin ifadesini bozma yeteneğiydi. Bununla birlikte, enjekte edilen DNA ile karşılık gelen kromozomal lokus arasında homolog rekombinasyonu kullanan endojen genleri mutasyona uğratmak için tercih ettiği yöntemin *C. elegans* modelinde henüz mevcut olmaması gerçeğiyle sınırlıydı. İlk olarak 1984'te Jonathan Izant ve Harold Weintraub tarafından açıklanan, gen aktivitesini engellemek için antisens (saçma) DNA iplikçik transkripsiyonunun kullanıldığı alternatif bir yaklaşımı keşfetmeye



başladı. Fire, *C. elegans*'ın vücut duvarı kasındaki gen ifadesini başarılı bir şekilde engellemek için antisens RNA'lar üretmek üzere tasarlanmış bir transgen kullandı ve özelliklerin sonraki nesillere aktarılabilirliğini gösterdi. Bu duyu yapıları da etkiye neden olabilirdi. Bu bulgunun, sens iplikçikliğini oluşturmak için kullanılan DNA transgenlerinden amaçlanmayan antisens RNA üretiminin sonucu olduğu düşünülüyordu. Fire, en olası etki mekanizmasının, antisens RNA'nın, geç bir işleme adımını, RNA taşınmasını veya translasyonu bloke eden sens transkriptine hibritleşerek gen

ekspresyonunu bozması olduğu sonucuna vardı. İlginç bir şekilde, normal seviyelerde sens RNA'nın mevcudiyeti nedeniyle çift sarmallı RNA'ların (dsRNA) transkripsiyonun bozulmasına ve inhibisyonuna aracılık ettiği bir modeli göz ardı etti, ancak dsRNA'nın belirli hücreler üzerinde fizyolojik etkileri olabileceğini tamamen göz ardı etmedi. Fire, sonraki birkaç yıl içinde bu müdahale araştırması yolundan uzaklaştı ve bunun yerine, Mello ile işbirliğine başlanana kadar, hücre kaderini belirlemede gen düzenlemesinin rolünü anlamaya çalışmaya odaklandı.



## Craig Mello

Craig Mello, 1960 yılında Connecticut, New Haven'da doğdu ve yüksek lisans eğitimine başlamak için Boulder'daki Colorado Üniversitesi'ne taşınmadan önce Brown Üniversitesi'nde biyokimya ve moleküler biyoloji alanında eğitim gördü. David Hirsh'in laboratuvarının bir üyesi olarak *C. elegans*'i ilk kez burada inceledi. Mello, Dan Stinchcomb'un yanı sıra Mike Krause, Jim Kramer ve Ken Kemphues ve birlikte yürüttüğü Jim Priess gibi gelecekteki işbirlikçileri tara-

fından moleküler biyolojiye girişini içeren gelecekteki eğitiminin anahtarı olarak bu "fantastik" laboratuvarı gösteriyor. doktora sonrası çalışması. David Hirsh'nin ilk yılında endüstriye taşınmasının ardından Mello, Dan Stinchcomb ile çalışmaya devam etmek için Harvard Üniversitesi'ne taşındı ve esas olarak mayayı model sistem olarak kullanan solucan sentromer aktivatörlerini belirlemeye odaklandı. Fire ve Mello ilk kez bu noktada işbirliği yaptı. Her iki adam da, Kimble ve Stinchcomb tarafından açıklanan teknikleri temel alarak solucanlarda DNA dönüşümü için tek-

nikler geliştirmek üzerinde çalışıyorlardı. Fire, Mello'nun iyileştirmeye devam ettiği bir dizi yöntem geliştirerek bazı erken ilerlemeler kaydetmişti ve bu ikisi arasındaki erken işbirliği, DNA dönüşümünün solucan için rutin bir yöntem haline gelmesine yardımcı oldu. Bu yöntemler, RNAi'nin daha sonraki tanımlarında merkezi yer aldı ve DNA dönüşümünün etkilerini incelemek için *C. elegans* modelinin avantajlarını vurguladı. Tekniklerinde, solucanın kütükülünden ince ve keskin cam iğneler sokuldu ve yüzlerce germ hattı çekirdeği içeren bir gonadın geniş paylaşılan sitoplazması içine yerleştirildi. Deneysel malzeme daha sonra diğer gonad için tekrarlanan prosedürle gonada enjekte edilebilir ve daha sonra solucanlar, DNA dönüşümünün etkileri açısından gözlemlenir. Harvard'da doktora çalışmalarını başarıyla tamamladıktan sonra Mello, Jim Priess'in laboratuvarında doktora sonrası araştırmacı olarak Seattle, Washington'daki Fred Hutchinson Kanser Araştırma Merkezi'ne geçti. Mello, 1994 yılında Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde kendi laboratuvarını kurdu ve ardından 2000 yılında Howard Hughes Tıp Enstitüsü araştırmacısı oldu. 1995'te, antisens RNA'nın doğrudan enjeksiyonunun *C. elegans*'taki belirli genleri susturmak için kullanılabileceğine dair önemli keşif, Cornell Üniversitesi'ndeki Ken Kemphues'in laboratuvarında Su Guo tarafından yapıldı. Mello, incelediği genleri susturmak için bu güçlü aracı kullandı ve erken embriyolarda hücre kaderini belirleyen gelişimsel mekanizmaları anlamada ilerleme kaydetmeye başladı. Fire tarafından 1991'de yapılan benzer şekilde Guo ve Kemphues tarafından yapılan önemli bir gözlem şuydu: hem sens hem de antisens RNA zincirleri gen susturulmasına neden olabilir. Bu fenomenin altında yatan mekanizma hala bilinmiyordu, ancak herhangi bir ipliğin diğer ipliğin üretimini şablonlayabildiği ve susturucu RNA seviyeleri oluşturabildiği stokastik bir etkileşim olduğu düşünülüyordu. Bu mekanik belirsizlik, Mello'nun 1997'de susturucu fenomeni RNA interferansı veya

RNAi olarak adlandırmasına yol açtı. Mello'nun Fire ile işbirliği, 1997'de, erken embriyonik gelişimde gen ekspresyonunun baskılanmasının altında yatan mekanizmaları araştıran bir makalenin yayınlanmasıyla devam etti. *C. elegans*, ilginç bir şekilde, hedef genleri susturmak için doğrudan antisens RNA enjeksiyonlarının kullanımını içermiyordu. Hem Fire, Nobel Ödülü konuşmasında hem de Nature makalesinin ortak

yazarlarından biri ve Fire'da doktora sonrası araştırmacı olan Mary Montgomery. Bilim camiasında sıklıkla olduğu gibi, Mello tarafından 1997'de Madison, Wisconsin'deki bir solucan toplantısında düzenlenen ve RNAi işbirliğini ateşleyen ve RNAi keşiflerinin temelini atan şeyin gayri resmi bir tartışma olduğunu not edin. Temel hipotez, dsRNA'nın gerçek efektör molekül olduğu fikri etrafında toplanmıştır, ancak Mont-

gomery bu fikrin bir laboratuvar toplantısında sağlıklı bir şüphesizlikle karşılandığını belirtmektedir. Ancak bu, devam eden araştırmalarını durdurmadı ve *C. elegans* modelini kullanarak ortaya çıkan işbirlikçi deneyler dizisi, Şubat 1998'de RNAi in Nature hakkındaki makalelerinin yayınlanmasını sağladı.





## ÖDÜL: ÇİFT SARMALLI RNA TARAFINDAN GENETİK ETKİLEŞİMİN KEŞFİ

Fire ve Mello'nun 'Caenorhabditis elegans'ta çift sarmallı RNA'nın güçlü ve spesifik genetik müdahalesi' başlıklı 1998 tarihli Nature makalesi, RNAi'nin temel özelliklerini açıkladı ve altta yatan mekanizmalarına ilişkin içgörüler verdi. Bunların merkezi bulgu, dsRNA'nın RNAi'ye neden olan efektör molekül olduğu ve daha önce düşünüldüğü gibi yüksek oranda saflaştırılmış sens veya antisens RNA'nın izolasyonda olmadığıydı. Daha önceki çalışmalarda, antisens veya sens RNA ile girişim gösterilmişti, ancak bu preparasyonlar nispeten saf değildi çünkü RNA'ları oluşturmak için kullanılan DNA transgen dizileri veya bakteriyofaj RNA polimerazları, Fire ve Mello'nun inandığı gibi, dsRNA molekülleri de dahil olmak üzere anormal RNA ürünleri de üretebilirdi. RNAi son derece spesifikti, sadece hedef mRNA'ya homolog olan dsRNA dizileri girişime neden olabilirken, intronlara veya promotörlere karşılık gelen dsRNA bunu yapmadı. Bu bulgu, RNAi'nin transkripsiyon sonrası bir seviyede meydana geldiğini öne sürdü; ek olarak, dsRNA enjeksiyonu endojen mRNA transkriptlerini

azalttı veya ortadan kaldırdı, bu da bunların bozulduğunu düşündürdü. RNAi, dokular arasında yayılabilir ve nesillere iletebilir, bu da etkinin potansiyel bir RNA taşıma mekanizmasının bir parçası olarak hücreler arasında iletebileceğini düşündürür. Fire ve Mello, RNAi'yi açıklamak için basit bir antisens modelini reddettiler çünkü hücre başına yalnızca birkaç dsRNA molekülü ile girişim elde edebildiler; bu, tek başına sens veya antisens RNA'dan en az iki kat daha etkiliydi. Basit bir antisens modelinin işe yarayabileceğini düşünmediler çünkü enjekte edilen birkaç RNA molekülü ile aşırı endojen transkriptler arasındaki tavlama, gözlemlenen fenotipleri vermeyecekti. Bunun yerine, bulguların bir katalitik veya amplifikasyon bileşeni içeren aktif bir mekanizma ile daha uyumlu olduğuna inanıyorlardı. Diğer bir olasılık, mekanizmanın, hücrelerin dsRNA'ya spesifik olmayan bir tepkisi olabileceği ve gördükleri sinerjinin, bir "panik mekanizması" tarafından antisens etkilerin güçlendirilmesinden kaynaklandığıydı. Bununla birlikte, Fire ve Mello, ilgisiz dsRNA segmentlerinin hedef

gene birlikte enjeksiyonunun, tekli RNA sarmallarının inhibisyona aracılık etme yeteneğini güçlendirmediğini göstererek bunu göz ardı etti. RNAi'nin altında yatan gerçek mekanizma, şu anda belirsiz kaldı. Sonuçlarında Fire ve Mello, RNAi bulgularını daha geniş bir bağlama oturtular ve RNAi'nin bir araştırma aracı olarak potansiyel uygulamasını doğru bir şekilde tahmin ettiler. RNAi'nin C. elegans'ta gen işlevini incelemek için genetik bir araç olarak büyük bir potansiyele sahip olduğu ve fenomen diğer nematodlarda, omurgasızlarda ve omurgalılarda mevcut olsaydı daha da geniş bir uygulamaya sahip olabileceği onlar için açıktı. Fire ve Mello, RNAi'nin altında yatan mekanizmaların bazı biyolojik amaçlar için var olması gerektiğine inandılar ve organizmalar tarafından fizyolojik gen susturma için kullanılabileceğini varsaydılar. Ayrıca, RNAi fenomenlerinin, bitkilerde transkripsiyon sonrası gen susturma (PTGS) gibi diğer gen susturma fenomenlerini açıklayabileceğini de belirtmişlerdir.

## RNAİ'NİN ALTINDA YATAN MEKANİZMAYI ANLAMAK

RNAİ'nin keşfi ve tanımlanması, araştırma için yeni yollar açtı ve RNAİ'nin altında yatan mekanizmaların tanımlanmasında ve RNAİ'nin biyomedikal araştırma için kullanılmasında hızlı ilerleme kaydedildi. Mello, "bazıları bu dönemi bir RNA devrimine benzetse de... belki de buna bir RNA "ifşası" demek daha doğru olur. RNA hücreyi ele geçirmiyor - başından beri kontrol onda. Şimdiye kadar bunu fark etmemiştik." dedi. Fire ve Mello, fenomenle ilgili daha fazla önemli içgörü ile Nature makalelerini takip ettiler. Fire, birincil girişim etkilerinin, transkripsiyonun başlatılması veya uzaması üzerinde hiçbir etkisi olmaksızın transkripsiyon sonrası olduğunu kesin olarak gösterdi ve ek olarak, RNAi, transkriptlerin tüm sitoplazmik birikimini neredeyse tamamen ortadan kaldırırken, çekirdekte yeni transkriptlerin birikimini azaltır. Bu bulgular endojen RNA'nın hedef olduğunu ve mekanizmanın translasyondan önce hedef RNA'yı bozduğunu gösterdi. Mello, RNAi etkisinin kalıtsal olduğunu ve hem enjekte edilen hayvana hem de yavrularına RNA'nın ilk enjeksiyonundan birkaç gün sonra güçlü müdahale ile uzun ömürlü olduğunu gözlemledi. Mello ve Fire, müdahale eden RNA'nın, dsRNA'yı ifade etmek üzere tasarlanmış E. coli solucanlarını beslemek veya dsRNA içeren bir çözeltiye batırmak gibi başka yöntemlerle iletilebileceğini buldu. Her ikisi de doğrudan mikroenjeksiyondan daha az etkili olsa da, yöntemler daha büyük ölçekli genetik çalışmaların daha kolay gerçekleştirilebileceği anlamına geliyordu. Fire, bu ek bulgularla modelin enjekte edilen RNA dizileri arasında stokiyometrik bir etkileşime ihtiyaç duyan mekanizmalarla uyumlu olamayacağına inanıyordu. Enjekte edilen dsRNA'nın herhangi bir replikasyonunu tespit edemedikleri için, enjeksiyondan sonra dsRNA'nın kendisinin amplifiye edildiği replikasyona

dayalı bir mekanizmayı dikkate almadı. Bunun yerine Fire, RNAİ'nin şu anda kabul edilen mekanizmasıyla belirgin benzerlikleri olan RNAİ'yi açıklamak için üç aşamalı bir model önerdi. İlk olarak, dsRNA, homolojiye dayalı hedef tanımaya izin vermek için dupleksin kısmen çözülmesiyle özelleşmiş bir ribonükleoprotein kompleksinin bir parçasını oluşturacaktır. Bunu takiben, bölünme veya kovalent modifikasyon ile tanınan hücresel RNA işaretlenecek ve en sonunda bu hedef RNA bozulacaktır. Fire, yayınlarında RNAİ'nin bitkilerde RNA aracı susturma ve birlikte bastırma ile benzerlikleri hakkında yorum yapmaya devam ederek, dsRNA'nın her iki fenomende de bir aracı görevi görebileceğini öne sürdü. Virüslere karşı sistemik bir savunma olarak ve hücrelerin gen ekspresyonunu modüle etmesinin bir yolu olarak RNAi için fizyolojik roller önerdi ve hatta keşifleri için potansiyel klinik uygulamalar önerdi. Mello ayrıca RNAİ'yi daha geniş bir bağlamda düşündü ve evrimin bu fenomeni kullanmakta ne kadar ileri gittiğini anlamaya hevesliydi. Hayvanlarda gen ekspresyonunu modüle eden RNA bazlı hormonların olup olmadığını, hücrelerin viral genleri kapatmak için RNAi kullanarak enfeksiyonlarla savaşıp savaşmadığını ve patojenlerin konak hücreyi belirli konakçı gen segmentlerini yakalayıp aşırı eksprese ederek değiştirip değiştirmediğini merak etti. RNAİ'nin, hücrenin dışından gelen RNA'nın içerideki gen ifadesini manipüle edebildiği güçlü ve özel bir yolun varlığına işaret ettiğini öne sürdü. Fire ve Mello, RNAi fenomenini araştırmak konusunda yalnız değildiler ve keşifleri, bir takip telaşına yol açtı. Kısa süre sonra RNAİ'nin C. elegans'a özgü olmadığı ve benzer olayların Drosophila, planaria (yassı kurtlar), bitkiler ve tripanozomlar dahil diğer organizmalarda da rapor edildiği anlaşıldı. RNAİ'nin, transkripsiyon sonrası





gen susturma ve birlikte bastırma gibi diğer susturma mekanizmalarıyla aynı temel mekanizmaları paylaştığı bulundu, bu da ortak bir evrimsel kökene sahip olduklarını düşündürüyor. Bir sonraki büyük atılım, bitkilerde PTGS'nin altında yatan mekanizmalara odaklanan Andrew Hamilton ve David Baulcombe tarafından yapıldı. 25 nükleotid uzunluğunda ve baskılanmakta olan gene homolog olan küçük RNA'ların PTGS sürecinin bir parçası olarak biriktiğini ve muhtemelen onun özgülüğünü belirleyen faktör olduğunu belirlediler. Bu 21-25 nükleotid küçük RNA'lara kısa karışan adı verildi RNA'lar (siRNA'lar) ve *Drosophila* ve *C. elegans*'ın RNA-susturucu yollarındaki etkileşime aracılık eden ortak faktör olduğu gösterilmiştir. RNase III nükleaz ailesinin bir üyesi olan Dicer enzimi, şunları yapabilen enzim olarak tanımlandı: bu siRNA'ları üretmek için dsRNA'ları spesifik olarak böler ve enzim solucanlarda, sineklerde, bitkilerde, mantarlarda ve memelilerde evrimsel olarak korunmuştur. Hedef mRNA'ları parçalayan bir enzim kompleksi olan RNA kaynaklı susturma kompleksi (RISC) de bu noktada tanımlanmıştı RNAi mekanizmasının araştırılması sırasında ve daha sonra bir Argonaute proteini olduğu gösterildi. RNAi'nin arkasındaki mekanizmalar artık daha net hale geliyordu ve iki ana adımdan oluşuyordu. İlk adım, bir dsRNA'nın Dicer tarafından -22 nükleotit uzunluğundaki bir siRNA'ya işlenmesiydi. Bu kılavuz siRNA daha sonra, kılavuz siRNA'ya homolog olan bozunma için tek sarmallı mRNA'ları hedefleyebilen bir nükleaz kompleksi olan RISC'ye dahil edildi. RNAi mekanizmalarının, endojen RNA türlerinin düzenlenmesinde rol oynadıklarının keşfedilmesiyle hücrelerde fizyolojik bir rolü olduğu gösterilmiştir. Dicer, ekzojen dsRNA'ların yanı sıra, mikroRNA'lar (miRNA'lar) olarak adlandırılan bir doğal küçük RNA sınıfını da işle-

yebilir. mikroRNA'lar ilk olarak *C. elegans*'ta tanımlanmış ve gelişimsel zamanlamalarının düzenlenmesiyle ilişkilendirilmiştir ve ayrıca omurgasızlar ve omurgalılarda da tanımlanmıştır. Diğer bir RNase-III tipi nükleaz olan Drosophila'nın da, Dicer tarafından işlenmek üzere sitoplazmaya ihraç edilmeden önce birincil miRNA'ların öncül miRNA'lara dönüştürülmesinde özel bir rolü olduğu belirlendi. siRNA'nın bir araştırma aracı olarak gerçek potansiyeli de bu sıralarda gerçekleşmeye başlıyordu. Önemli bir ilerleme, RNAi'nin sentetik siRNA'larla elde edilebileceğinin gösterilmesiydi. Bu, hedefleme adımının dsRNA-işleme adımından ayrılabilceği anlamına geliyordu ve siRNA'nın fonksiyonel olarak gen ekspresyonunun spesifik düzenlemesi için bir araç olarak kullanılabilceğini gösterdi. genomik ve biyomedikal çalışmalar. Bununla birlikte, RNAi'nin altında yatan bu temel mekanizmalar *C. elegans* ve *Drosophila* gibi organizmalarda gösterilmiş olsa da, RNAi'nin memeli hücrelerinde işlev görmediği hala net değildi, bu da onun daha geniş uygulaması için büyük bir sınırlama. Fare embriyolarında RNAi'nin gösterilmesi, RNAi'nin memeli hücrelerinde var olabileceğini düşündürdü, ancak bunun, uzunluğu 30 baz çiftinden daha büyük olan dsRNA'lara spesifik olmayan savunma tepkilerine sahip olduğu gösterilen somatik memeli hücrelerinde görülüp görülmeceği hala kesin değildi. Bu önemli atılım, RNAi'nin 21-nükleotit siRNA'lar kullanılarak kültürlenmiş memeli hücrelerinde elde edilebileceğinin gösterilmesiyle kısa sürede geldi. Her iki yazar grubu da bulgularının, siRNA'nın gen ekspresyonunu düzenlemek için bir araç olarak kullanılmasının yolunu açtığını ve memeli hücrelerinde terapötik bir modalite olarak.





## HÜCREDE VE VİRAL ENFEKSİYONDA RNAİ İŞLEVLERİ

Son 12 yılda, başka bir yerde kapsamlı bir şekilde incelendiği gibi, RNAi'nin hücresel işlevleri düzenlemede bütüncü bir rolü olduğu gösterilmiştir. Etkileri, çoğunlukla inhibitördür ve etkisi yaygındır, sadece transkriptlerin transkripsiyon sonrası işlenmesini değil aynı zamanda kromatin yapısını da etkiler, c kromozom ayrımı, transkripsiyon, RNA işleme, RNA stabilitesi ve translasyonu. 30 RNAi'nin oynadığı pek çok rolün yanı sıra farklı küçük RNA türlerinin spesifik işlevlerine ilişkin anlayışımızı artıran ilerlemeler olmaya devam ediyor. Örneğin miRNA'lar, belirli mRNA'ları spesifik olarak tanımasına ve susturmasına izin vermek için RISC için adaptör görevi gören gen düzenleyici devrelerin temel bileşenleridir ve omurgalılarıdaki tüm mRNA'ların %50 kadarını düzenlediği tahmin edilmektedir. RNAi mekanizması da bu rolü oynamaktadır. Yüksek oranda yoğunlaştırılmış bir kromatin formu olan heterokromatinin oluşumunda ve dinamik düzenlenmesinde doğrudan bir rol. Heterokromatin, *S. pombe* mayasının yanı sıra *C. elegans* ve memelilerde transkripsiyon, kromozom

segregasyonu ve uzun menzilli kromatin etkileşimleri dahil olmak üzere çok sayıda kromozomal süreci kontrol eden düzenleyici proteinlerin toplanması ve yayılması için bir temel görevi görür. Aslında bir görüş şudur: transkriptleri parçalamak ve heterokromatini tekrarlayan elementlere hedeflemek için küçük RNA'ları vektörler olarak kullanan RNAi yolu, genom için önemli bir savunma mekanizması haline gelecek şekilde zaman içinde gelişmiştir. RNAi, bitkilerde antiviral tepkinin önemli bir parçasıdır ve omurgasızlar ve ilk olarak viral enfeksiyona doğuştan gelen bir bağışıklık tepkisi olarak evrimleştiği düşünülmektedir. Bitkilerde ve omurgasızlarda, RNAi, retrovirüsler dışında RNA virüslerinin replikasyonunda anahtar ara maddeler olan uzun dsRNA'lar tarafından tetiklenir. Bu uzun dsRNA'lar Dicer tarafından bölünür ve ortaya çıkan siRNA, RISC'ye dahil edilir ve viral genomik veya mRNA türlerinin tamamlayıcı bölgelerini hedeflemek için bir kılavuz görevi görür. Viral RNA'lar daha sonra RISC tarafından parçalanarak bozunurlar. RNA virüsleri de bitkilerde ve

omurgasızlarda RNAi'yi inhibe eden ve hayatta kalmalarına ve çoğalmalarına izin veren gen ürünleri geliştirmiştir. Bunun tersine, memeli somatik hücrelerinde viral enfeksiyona verilen bu RNAi tepkileri görülmez ve memeli hücreleri, interferon yanıtı dahil olmak üzere viral dsRNA'lara karşı başka doğal tepkilere sahiptir. Bu fark, memeli hücrelerinin RNAi mekanizmasının viral enfeksiyon sırasında aktif kalmasına izin verecek şekilde gelişmiş olabilir. Hem normal hücresel işlevi sürdürmek hem de savunma mekanizmalarına katkıda bulunmak için enfeksiyon. Bununla birlikte, memeli hücrelerinde antiviral RNAi tepkilerinin bu olmaması, virüslerin mekanizmayı kullanma ve RISC'yi viral miRNA'larla programlama fırsatına sahip olduğu anlamına gelir. Bu tür viral miRNA'ların hücresel veya viral genleri aşağı doğru düzenlediği, viral olarak enfekte olmuş hücrelerin doğuştan gelen veya adaptif bağışıklık tepkilerini baskınlama duyarlılığını arttırdığı veya herpes virüsü miRNA'larında görüldüğü gibi viral gecikmeyi stabilize ettiği gösterilmiştir.



## RNA GİRİŞİMİNİN BİYOMEDİKAL ARAŞTIRMA VE İLAÇ KEŞFİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

RNAi'nin biyomedikal araştırma üzerinde büyük bir etkisi olmuştur, çünkü bilim adamlarının genleri seçerek tek gen araştırmalarındaki işlevlerini anlamalarına ve aynı zamanda daha büyük araştırmalara izin vermesine olanak sağlamıştır. RNAi, Fire ve Mello tarafından tanımlanmasından sonraki iki yıl içinde *C. elegans*'ta genom ölçeğinde tarama yapmak için kullanıldı. siRNA'lar, memeli hücrelerinde RNAi'ye aracılık edebilir ve bunun daha geniş bir uygulama alanına sahip olmasına izin verir. RNAi aracılı yıkımın bir dizi avantajı vardır. Klasik genetik taramalarda, özellikle tanımlanmış tüm genlerin sekansları hemen bilindiği için, ölümcül mutasyonların tespit edilmesi daha kolaydır ve ortak sekansa sahip çoklu genler devre dışı bırakılarak fazlalık ortaya çıkarılabilir. Taramaların ölçeği, dizili genlerin üretilmesiyle binlerce geni kapsayan kimyasal olarak sentezlenmiş oligonükleotitlere sahip kütüphanelerle hızla arttı. Bu tür tarama yaklaşımları, özellikle potansiyel hedefler onkogenlerden büyüme faktörlerine ve hatta tek nükleotid polimorfizmlerine kadar genişlediğinden, ilaç keşfinde açık uygulamalara sahiptir. Bu nedenle, terapötik ajanların geliştirilmesinde aşağıdakiler dahil olmak üzere temel adımlar için tercih edilen bir yöntem haline gelmesi şaşırtıcı değildir.



## YENİ BİR TERAPÖTİK MODALİTE OLARAK RNA ETKİLEŞİMİ POTANSİYELİ

RNA tabanlı terapötik kavramı, doğrudan Fire ve Mello'nun RNA etkileşimi olgusunu tanımlayan çalışmalarından gelir. Sayda Elbashir ve diğerleri tarafından memeli hücrelerinde küçük karışan RNA'ların diziyeye özgü gen inhibisyonunu tetikleyebileceğinin gösterilmesiyle desteklenmiştir. Bu, insan hastalığına karışan bir genin spesifik olarak hedeflenebileceği ve siRNA'ların veya kısa saç tokası (sh)RNA'ları ifade eden yapıların ekzojen girişiyile susturu-

labileceği anlamına gelir. Bu tür spesifik bir gen tabanlı yaklaşım, hastalığa neden olan etkenleri hedeflemek için büyük bir potansiyele sahip olduğu anlamına da gelir. Örneğin, vahşi tip bir alelden RNA'yı hedeflemeyen veya hastalığa neden olan bir proteinin translasyonunu önleyerek bir tümör içindeki aleller. RNAi, patojene özgü proteinleri hedefleyerek bulaşıcı hastalıkları tedavi etmede de bir role sahip olabilir. RNAi keşfinin tanımından, altta yatan yeni

bir mekanizma olarak çevirisi *C. elegans*'ta gen susturulmasının, insan klinik deneylerinden geçen yeni bir terapötik modalite olarak ortaya çıkışı dikkat çekecek kadar hızlı olmuştur. Bu nedenle, hala erken aşamalarında ve RNAi'nin güvenli ve etkili bir terapötik araç olma potansiyeli, büyük ölçüde bir dizi büyük zorluğun üstesinden gelinmesi gerektiğinden, ancak şimdi fark edilmeye başlanmıştır. Başlıca zorluklar, istenmeyen bağışkıklık tepkilerinin tetik-

lenmesi gibi minimum hedef dışı etkilerle yüksek potens elde etmek için siRNA'nın uygun dokulara ve hücrelere iletimini optimize etmek olmuştur. Şu anda klinik deneylerde bulunan RNAi bazlı ilaçlar çoğunlukla RISC'ye giriş için Dicer bölünme adımını atlama avantajına sahip olan sentetik siRNA'lar veya ifade edilen kısa saç tokaları. miRNA'lar ayrıca tamamlayıcı nükleotid dizileri (anti-miR'ler) ile hedeflenebilir ve bu anti-miR'ler endojen veya eksojen (viral) bloke edebilir. ) etkilerini nötralize etmek için miRNA'lar. siRNA'nın hedef dokuya iletilmesi, parenteral uygulamayı gerektirir ve RNAi'nin terapötik bir modalite olarak başarılı bir şekilde uygulanması için büyük bir engel olmaya devam eder. Hücreye özgü antikolar tarafından tanınan peptidler ve bunların yanı sıra katyonik lipidler ve kolesterol gibi, tümü ekzojen siRNA'ları endojen RNAi mekanizmasına dahil edilmelerine izin vermek üzere hücreye getiren bir dizi dağıtım aracı artık kullanılmaktadır. Viral vektörler ayrıca shRNA tabanlı yöntemleri iletmek için kullanılabilir, ancak shRNA'ların potansiyel sorunları vardır çünkü viral olarak iletilen shRNA'lar hücrede uzun süreler boyunca eksprese edilebilir ve hatta endojen siRNA mekanizmasını doyurarak önemli yan etkilere neden olabilir. siRNA'nın hedef dışı etkilerini anlamak ve en aza indirmek, RNAi tabanlı terapötikleri kliniğe getirme mücadelesinin önemli bir parçasıdır. Örneğin, makula dejenerasyonunda vasküler endotelial büyüme faktörünü hedefleyen siRNA'nın doğrudan enjeksiyonunu kullanan klinik deneylerden elde edilen vaat, etkinin spesifik bir müdahale etkisi değil, bir siRNA sınıfı etkisi olduğu bulgusuyla hafifletildi. siRNA aslında hücrelere girmede, ancak bağışıklık yollarını etkinleştirmek için hücre dışı Toll benzeri reseptör 3'e bağlanarak hareket etti. Bu örnekte tedavi hala güvenli olsa da, bu, bağışıklık sisteminin istenmeyen aktivasyonunun potansiyel bir kaynak olabileceği anlamına gelmez. siRNA'yı güvenli bir terapötik modalite olarak geliştirme zorluğuna katkıda bulunan önemli yan etkiler mevcuttur. Maküler dejenerasyon ve respiratuar sinsityal virüs (RSV) enfeksiyonu gibi durumlar için pre-klinik deneylerden elde edilen sonuçlarla birlikte yeni bir terapötik modalite olarak

RNAi'nin büyük potansiyeli, geniş bir yelpazede sentetik siRNA'ların kullanıldığı erken faz klinik deneylerle (faz 1 ve 2) sonuçlanmıştır. Bunlar arasında yaşa bağlı maküler dejenerasyon, RSV enfeksiyonu, astım, hiperkolesterolemi, Pachyonychia congenita (ayrıca Jadassohn-Lewandowski Sendromu olarak da bilinir, keratin proteinlerini kodlayan genlerdeki mutasyonlara bağlı otozomal dominant bir dermatolojik durum), karaciğer ve akciğer kanseri gibi solid tümörler yer alır. shRNA, AIDS ile ilişkili lenfomayı tedavi etmek için de kullanılıyor ve antimRNA, hepatit C denemesinde kullanılıyor. Bu hızlı ilerleme etkileyici olmasına rağmen, yaşla ilgili yaşa bağlı makula dejenerasyonu gibi bir dizi geliştirme programının durdurulmasıyla hepsi başarılı olamadı. 2010'un sonuna kadar yayınlanmış yalnızca iki çalışma raporu vardı ve her ikisi de yalnızca birer hastayı dahil etmeleri nedeniyle sınırlıydı. Bu, insanlarda faz 3 çalışmalarının sonuç verdiği oligonükleotidler kullanılarak antisens inhibisyonda halihazırda elde edilen ilerlemenin tersidir. Apolipoprotein B sentezinin bir antisens oligonükleotid inhibitörü olan Mipomersen'in homozigot ailesel hiperkolesterolemili hastalardaki başarılı çalışması da dahil olmak üzere tamamlandı. Bu zorluklara rağmen, RNAi'nin modern tıbbi dönüştürebileceği ve etkili ve güvenli sistemik RNAi terapileri için bir cephanelik olabileceği umudu devam ediyor. Birkaç yıl içinde çok çeşitli insan hastalıkları mevcut olabilir.



## SONUÇLAR

Sadece 12 yıl önce *C. elegans*'ta dsRNA aracılı RNAi gözleminden yola çıkarak, şimdi RNAi'nin gen aktivitesinin nasıl olduğuna dair anlayışımızı yeniden tanımladığı bir konumdayız. Hücrelerimizde düzenlenir ve gen ekspresyonunu manipüle etmek için biyomedikal araştırmalarda önemli bir araç haline gelmiştir. RNAi, yeni ilaç keşfini kolaylaştırmaya yardımcı oluyor ve hatta kliniğe yaklaşmaya başlıyor. Fire ve Mello'nun RNAi'yi Nobel ödüllü keşfiyle tetiklenen bilimsel keşiflerin hızı ve geniş kapsamlı uygulamaları, tıbbi değiştirmede böylesine bir etki yaratmıştır ve bundan sonra da

bunu yapmaya devam edecektir. Gelecek yıllarda bilimsel keşiflerine giden yolda bizi aydınlatmak için sürekli ders talepleri almak Nobel Ödülü Sahiplerinin kaderidir. 2008'de Londra Imperial College'da ders verme talebini kabul eden Craig Mello, RNAi için Nobel ödülüne ilişkin bakış açısına ilişkin kapsamlı bir açıklama yaptı ve bu durumda fikirlerin nasıl olgunlaştığına dair içgörülü yorumlar da dahil oldu. kendisi ve eş-aday Andrew Fire, Nobel Ödülü'ne layık görülen anlayışta sıçramaya izin veren önemli deneylere öncülük etti.