



RNA Interferens (RNAi)

Ayşe Nur Akkoç, Nihat Toplu

Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı, Işıklı, Aydın, Türkiye

ÖZET

Öz bilgi/Amaç: Birçok organizmanın genomunun dizi analizlerinin belirlenmesi ile fonksiyonu henüz bilinmeyen çok sayıda gen açığa çıktığı için bu genlerin fonksiyonlarının araştırıldığı çalışmaların sayısı artmıştır. Bir genin ifadesi farklı aşamalarda baskılanarak hedef genin fonksiyonuyla ilgili bilgi edinilebilir. Günümüzde genin transkriptini hedef alan antisense stratejileri özgül genlerin fonksiyonunun belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antisense tekniği kullanılarak yapılan özgül genlerin fonksiyonlarının belirlenmesini amaçlayan çalışmalarda ilgili genin transkriptine eşlenik oligonükleotidler kullanılarak transkriptin translasyonu engellenmektedir. Bu teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar RNA interferensin (RNAi) keşfedilmesine yol açmıştır. Bu derlemede RNAi, mevcut çalışmalar ve bu çalışmalar doğrultusunda sağlanan faydalar konu edilmiştir.

Sonuç: RNA interferens, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun susturulması/baskılanması için etkili bir metottur. RNA interferens mekanizması doğada var olan bir mekanizma olup, aynı zamanda moleküler biyolojide gen-protein işlevi analizinde, fonksiyonel genomik araştırmalarda ve gen tedavisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Antisens etki gösteren yapılar, komplementer mRNA'yı degrade ederek ya da translasyonu baskılayarak hedef geni susturarak ilgili gen ifadesinin engellenmesi mekanizmasıyla etki ederler. Bu mekanizmadan yola çıkılarak hastalıkların patogenezinde rol oynayan genlerin ekspresyonunun kontrolü ile moleküler temelli özgün tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi ön görülmektedir. Sonuç olarak bu mekanizmayı içeren yöntemler çoğu zaman başarısızlıkla sonlanan, tedavi süreci uzun ve etkilenen bireyler açısından yıpratıcı olan hastalıkların tedavisinde umut vaat edicidir.

Anahtar Kelimeler: DNA, RNA, Protein sentezi, RNAi

RNAi (RNA INTERFERENCE)

ABSTRACT

Background/Aim: The identification of the sequence analysis of the genomes of many organisms has led to the emergence of a large number of genes whose functions are not yet known, and the search for the function of these genes has increased considerably. A genetic expression can be suppressed at different stages and information about the gene function can be obtained. Today, antisense strategies targeting the broad transcript are widely used to determine the function of specific genes. In the studies of the functions of the specific genes constructed using the antisense technique, translation of the transcript is inhibited using oligonucleotides conjugated to the corresponding genetic transcript. Studies using these techniques have led to the discovery of RNA interference (RNAi). In this review, RNAi, current studies and benefits derived from these studies are discussed.

Conclusion: RNA interference is an effective method for silencing/suppressing post-transcriptional gene expression. This mechanism is inherent in nature and has a wide range of applications in gene-protein function analysis in molecular biology, functional genomics research and gene therapy. Antisense-acting constructs are seen as an important milestone in molecular therapy in terms of silencing the target gene by suppressing complement mRNA, suppressing target gene expression, controlling gene expression, and thereby specifically targeting genes involved in disease mechanisms. Therefore, it is seen as a promising mechanism in the treatment of long, troublesome and failing diseases in the future.

Key words: DNA, RNA, protein synthesis, RNAi.

Giriş

RNA interferens, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun susturulması/baskılanması için etkili bir metottur. RNA interferens mekanizması doğada var olan bir mekanizma olup, aynı zamanda moleküler biyolojide gen-protein işlevi analizinde, fonksiyonel genomik araştırmalarda ve gen tedavisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Rnai (RNA İnterferens)

Başta insan genomu olmak üzere birden çok organizma genomunun dizi analizlerinin belirlenmesi, görevi tam olarak belirlenemeyen çok sayıda geni ortaya çıkardığı için bu genlerin susturulması ile ilgili çalışmalar oldukça artış göstermiştir (Bodur ve Demirpençe, 2010). Günümüzde genin transkriptini hedef alan antisense stratejileri özgül genlerin fonksiyonunun belirlenmesinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Antisense tekniği kullanılarak yapılan özgül genlerin fonksiyonlarının belirlenmesi çalışmalarında ilgili genin transkriptine eşlenik oligonükleotidler kullanılarak transkriptin transasyonu engellenmektedir (Brennecke ve ark, 2005). Bu teknikler kullanılarak yapılan çalışmalar RNA interferensin (RNAi) keşfedilmesine yol açmıştır (Bushati ve Cohen, 2007). RNAi'nin doğal fonksiyonları ve onun ilişkili olduğu durumlar genellikle genomun virüsler ve transpozonlar gibi hareketli genetik yapılara karşı korunmasına yöneliktir (Kim ve Rossi, 2007).

Antisense etki gösteren moleküllerin hedef mRNA'ya bağlanması, genin eksprese olmasını engellemektedir. Bir genin genetik mesajının hücresel bir mekanizmadan dolayı ifade edilmemesine "Knock- Down" ya da "Knock-Out" olarak tanımlanır. RNAi ise 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 diğer bir antisense mekanizmalarından birisidir (Karagüzel ve ark, 2007, Davidson ve McCray, 2011). Mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda gözlenen RNAi mekanizması benzer hücre bileşenlerinin katılımı ile gerçekleşir (Ecevit ve ark, 2013).

RNAi, çift zincirli RNA (dsRNA)'ya post transkripsiyonel endojen bir yanıtır (Fire ve ark, 1998). Post transkripsiyonel gen susturma (PTGS:posttranscriptional gene silencing) ya da RNAi, çekirdekte DNA tarafından kodlanan çift iplikçikli miRNA'nın rehber tek sarmalıyla sitoplazmada komplementeri olan spesifik mRNA moleküllerini yıkıma uğratması sonucu, gen ekspresyonunun inhibe olduğu doğal, biyolojik bir süreçtir (Dykxhoorn ve ark, 2003; Ecevit ve ark, 2013). Gen susturumunda temel olarak iki tip küçük RNA vardır: micro RNA'lar (miRNA) ve siRNA'lar (small interfering RNA, küçük engelleyici RNA) (Czech ve Hannon, 2011). Günümüzde bitki ve hayvan kromozomlarında bu RNA'ların yüzlerce olduğu bilinmektedir. Bu RNA'lar öncelikli olarak gelişmeye dair genlerin mRNA'larını hedefleyen antisense RNA'lar olarak davranırlar (Bartel, 2004).

RNAi proseslerinin rolü; insanlar da dahil çok sayıda ökaryotik canlıda gen ekspresyonunun kontrol mekanizmasında ve çoğu bitki türü ile insektlerde antiviral defans sisteminde ortaya konmuştur. (Taylor ve Woodcock, 2015).

RNAi'nin Tarihsel Gelişimi

Tarihsel olarak miRNA'lar ilk defa *Caenorhabditis elegans*'ta gelişimde düzenleyici role sahip oldukları belirlenerek tanımlanmıştır (Lee ve ark, 1993). 1970'li yıllarda Zamecnik ve Stephenson, Rous Sarcoma virusun (RSV) 35SRNA'sının 5' ve 3' uçlu nükleotid sekansını kullanarak viral integrasyonda önemli olarak görünen 21 nükleotidik tekrarlayıcı sekansları tanımlamışlar ve viral sekansın bir kısmına komplementer olan d(AATGCTAAATGG)13mer'lik oligonükleotidi sentezlemişlerdir. Bu oligonükleotid Rous Sarcoma virus ile enfekte olmuş fibroblast hücre kültürüne verilmiş ve

viral üretimin büyük ölçüde inhibe olduğu gözlemlenmiştir (Zamecnik ve Stephenson, 1978).

miRNA'lar 1976'da Heywood and Kennedy, 1993'te Lee ve ark. tarafından ilk kez tanımlandığında bilim dünyası RNA'ların gen ekspresyonunda düzenleyici rolde olduğunu kabul etmeye hazır değildi. Olağan dışı yapıları ve gen düzenlenmesinde post transkripsiyonel aşamadaki rolleri bu molekülleri ilgi odağı haline getirmiştir (Mizuno ve ark, 1984).

1980'lerin başında bir bölüm antisense RNA'ların plasmid replikasyonunda kilit düzenleyici rol aldıkları gösterilmiştir (Dykxhoorn ve ark, 2003). Ardından yapılan çalışmalarda yine bakterilerde bu RNA'ların plasmid kopya sayısı, bakteriyofajlarda lizis/lizogeni kararlarının düzenlenmesi gibi birçok olayda proteinler gibi görev aldıkları belirlenmiştir (Ecevit ve ark, 2013; Bodur ve Demirpençe, 2010). 1980'li yıllara kadar RNA'nın sadece DNA ve protein sentezi arasında bilgi akışını sağlayan bir aracı olduğu düşünülmekteydi. Sonraki yıllarda bu yapının katalitik özelliklerinin de olduğu keşfedildi ve bu keşif Tom Cech ve Sidney Altman'a 1989 yılında bir Nobel ödülü getirdi (Garfield, 1990).

1990'lı yıllarda iki botanikçi Napoli ve Stuitje grupları, bitkilerde chalcone synthase (chs) geninin over-expressyonunu konusunda yayınladıkları bir raporda, petunya'da pigmentasyonu katalizleyen enzimlerin etkilerini, gen (chs geni) ilave ederek artırmak istemişler, ancak daha mor petunyalarda elde etmeyi denediklerinde bazen beklenmeyen ters sonuçlar (daha beyaz petunyalarda) elde etmişlerdir (Alexander ve ark, 1988; Napoli ve ark, 1990; Jorgensen ve ark, 1996). Bu mekanizma, o zaman sırrını korumasına karşın, daha sonra Jorgensen ve ark. (1996) bunun sebebinin chs geni içindeki dsRNA bölgesinin dejenerasyonunun bir sonucu olduğunu ve bunun bir PTGS ile ilgili olabileceğini rapor ettiler (chs geninin Over-expressyonunun baskılanması).

1998'de Massachusetts Institute of Technology (MIT)'den Craig Mello ve Washington Carnegie Enstitüsü'nden Andrew Fire bir nematod olan *Caenorhabditis elegans*'ta dsRNA'nın genin ifadesini spesifik olarak inhibe ettiğini ilk defa deneysel olarak gösterdiler (Mello ve Conte, 2004). Araştırmacılar *C. elegans*'a bir kas ekspresyonu geni olan unc-22'yi (mRNA düzeyinde ifadesinin sessizleştirilmesini hedefleyerek) dsRNA olarak verdiklerinde bu kas proteininden yoksun nematodlarda görülen fenotipik karakterlerin ortaya çıktığını gözlemlemişlerdir. 2006 yılında Andrew Fire ve Craig Mello (Fire ve ark, 1998), *Caenorhabditis elegans* nematodunda dsRNA'nın homolog mRNA'ları parçalanmaya sevk ettiğini gösteren ve "Ribonükleik asit interferansı" (RNAi) olarak adlandırılan mekanizmayı buldukları çalışma ile Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel ödülüne layık görüldüler.

Yapılan araştırmalarda (Ruitz ve ark, 1998); funguslar (*Neurospora*), bitkiler (*Petunia*, *Nicotiana*, *Arabidopsis*) ve omurgasızlar (*Caenorhabditis elegans*, *Drosophila*, *Paramecium*, *Trypanosoma*) olmak üzere birçok türde etkili gen sessizleştirme mekanizması ile gösterilmiştir. RNAi, Science dergisi tarafından 2001'de "yılın molekülü" ve "2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi" seçilmiştir (Karagüzel ve ark, 2007).

RNAi Mekanizmasında Antisens Etki Gösteren Moleküller

Gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNAi yolları, siRNA, miRNA, antisens oligonükleotid ve ribozim adı verilen küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA parçacıklarının aracılığıyla gerçekleşmektedir. Protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan bu RNA'lar; gelişim, farklılaşma, hücre çoğalması ve apoptozis gibi önemli biyolojik süreçlerin düzenlenmesinde rol alırlar (Mello ve Conte, 2004).

miRNA

miRNA'lar translyasyonun baskılanması ve transkriptin bozulması aşamalarını içeren PTGS mekanizması aracılığıyla gen ekspresyonunun susturulmasını sağlayan yaklaşık 22 nükleotid içeren bir küçük RNA'lar sınıfıdır (Almeida ve Allshire, 2005). miRNA başlangıç molekülü hücre içerisinde RNA polimeraz katalizöründe genom tarafından sentezlenen çift zincirli bir RNA'dır (Zamore ve ark, 2000). Her iki zinciri de post transkripsiyonel gen susturmaya aracılık edebilir ancak çoğu miRNA'lar asimetri gösterir ve öncelikle tek bir zincirini RNA ile indüklenen susturum kompleksi (RNA induced silencing complex-RISC) ne aktarır (Davidson ve McCray, 2011). Hücre içerisinde bulunan RISC'i aktive edebilmesi için bazı aşamalardan geçmesi gerekmektedir. Öncelikle RNA bağımlı RNA polimeraz II, kalıp olarak endojen veya ekzojen kaynaklı bir RNA'yı kullanarak çift zincirli RNA molekülünü sentez eder. Bu yapı intron bölgelerinden saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşir. Bu pri-miRNA olarak adlandırılan ilk miRNA'dır. Sonrasında RNase III grubu bir endonükleaz, pri-miRNA molekülüne etki ederek bu kıvrılmış RNA parçasını zincirin geri kalan kısmından ayırır ve oluşan pre-miRNA molekülüdür (Mello ve Conte, 2004; Rao ve ark, 2009; Ecevit ve ark, 2013). Sitoplazmadaki Dicer enzimi (RNase III) RNA ucundaki kıvrımlı kısımları koparır ve helikaz aktivitesi ile dupleks RNA'yı açar ve 21-23 nükleotid uzunluğunda parçalar halinde keser. Bu parçalar RISC'e aktarılır (Zamore ve ark, 2000). RNAi'nin mRNA ile etkileşimi RISC içinde gerçekleşir. RISC'in substrat seçiminde argonot proteinleri önemlidir. Substrat miRNA ise mRNA'nın 3'-translyasyonu olmayan bölgesinden kısmen eşleşme olur (Grishok ve ark, 2001). Eğer rehber miRNA dizisi hedef mRNA dizisiyle tamamen eşleşirse, Ago2 (Protein argonaute-2)'nin katalitik bölgesi söz konusu mRNA'nın yıkımına ve söz konusu genin susmasına neden olur. Ancak, diziler arası eşleşme kısmi ise, yani tohum dizisinde eşleşme varsa (seed sequence, miRNA'nın ilk 2-8 nükleotidi), translyonel bir baskılama olur ve bu, aynı zamanda diziyeye özgü olmayan, P cisimcikleri adı verilen yapıların oluşumuyla mRNA'ların degradasyonuna neden olur (Ecevit ve ark, 2013). Bazı durumlarda mRNA-miRNA dupleksini içeren RISC kompleksi, P-cisimciği (P-body, processing body) adı verilen bir organel içerisinde daha sonra işlenmek üzere saklanabilir (Liu ve ark, 2005).

miRNA'ların esas etki mekanizması translyasyonun baskılanmasıdır. Birçok laboratuvarından elde edilen bilgilere göre miRNA'lar translyasyonun başlamasını baskılamaktadır (Kiriakidou ve ark, 2007). Normal bir translyasyon işlemi için öncelikle başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmaları ve bu yolla mRNA'nın ribozoma yerleştirilmesi gerekir. RISC kompleksinin mRNA'nın 3'-translyasyonu olmayan bölgeye (3'-UTR) yerleşerek miRNA-mRNA etkileşimini gerçekleştirmesi, başlangıç faktörlerinin mRNA'ya bağlanmasını bozarak translyasyonu baskılar. Bu esas mekanizmaya ek olarak, RISC translyasyonun başlamasından sonra da mRNA'ya bağlanabilir ve bu durumda da ribozomların ayrılmasıyla translyasyon erken sonlanır (Stefani ve Slack, 2008).

Nükleusta DNA tarafından transkribe edilişi doğal biyolojik bir süreç olan miRNA'lar, endonükleazlara karşı dirençli iken, yapay olarak üretilen siRNA'ların böyle bir özelliği yoktur. siRNA'lar geçicidir ve hedef genin uzun süreli susturulması için tekrarlanarak hücreye verilmeleri gerekir. miRNA'lar daha uzun ömürlüdür ve doğru viral vektörle kullanılmaları halinde tek seferde istenilen genin susmasını sağlayabilirler (Stefani ve Slack, 2008; Ecevit ve ark, 2013).

siRNA

Small ya da short interfering RNA olarak bilinen siRNA'lar 20-25 baz çifti uzunluğunda, *in vitro* sentezlenen çift iplikçikli RNA'lardır. İpliklerden biri rehber görevinde olup susturmayı yönetirken diğer iplik "yolcu"dur ve parçalara ayrılır. siRNA'lar

genellikle hedef mRNA ile tam bir uyum-eşleşme gösterir (Davidson ve McCray, 2011). siRNA'lar hücre içine girdiğinde "Dicer" enzimi tarafından tanınır ve 21-23 nükleotidlik küçük parçalara dönüştürülür ve bu parçalar, RISC'e katılır (Ecevit ve ark, 2013). Substratı siRNA olan RISC hedef mRNA ile birebir eşleşir ve eşleştiği bölgelerden mRNA endonükleazlarla kesilip ortamdan uzaklaştırılır ve transkripsiyon baskılanır (Grishok ve ark, 2001). siRNA'ların gösterdiği bu mükemmel eşleşme bu RNA'ların istenmeyen bir proteinin ifadesinin bastırılması, istenmeyen miRNA'ların engellenmesi gibi gen çalışmalarında kullanılmasına olanak sağlar (Cowland ve ark, 2007). siRNA'lar lipozom ve benzeri araçlar kullanılarak transfeksiyon işlemi ile hücre kültürüne, doğrudan canlı sistemlere, plazmid veya viral vektörler aracılığıyla ya da yalın halde, hedef gen ürününe daha iyi ulaşabilmeleri için kolesterol veya aptamerlerden oluşan bir kuyruk takılı olarak aktarılabilirler. Ayrıca siRNA molekülüne bir protamin-antikor kuyruğu eklenerek o hücre tipine özgü bir proteine karşı geliştirilmiş olan antikorun kullanılmasıyla hedefe daha kolay ulaşması sağlanabilir (Kim ve Rossi, 2007).

Antisens Oligonükleotidler

Lipozomlar aracılığıyla *in vitro* ve *in vivo* olarak hücre içine verilebilen antisens oligonükleotidler (ASO) 15-20 nükleotid uzunluğunda, tek iplikli ve spesifik hedef mRNA molekülüne komplementer olma özelliğine sahip DNA veya RNA iplikleridir. Antisens oligonükleotidlerin hedef mRNA molekülü ile moleküler baz eşleşmesi RNAASO heterodupleks yapısının RNaz-H aracılı olarak bölünmesine ve translyasyonun blokajına sebep olmaktadır (Juliano ve ark, 2005).

Ribozimler

İlk olarak *Tetrahymena thermophila*'da doğal olarak meydana gelen bir molekül olarak T.R. Cech tarafından keşfedilmiş olan ribozimler; iyi tanımlanmış üçüncül yapısı herhangi bir protein gerektirmeksizin kimyasal reaksiyonları katalizlemesine izin veren, 50-100 nükleotidten oluşmuş tek iplikli RNA molekülüdür ve 1989'da Cech'e Nobel Kimya Ödülü kazandırmıştır (Kruger ve ark, 1982; Garfield, 1990).

Ribozimler fosfodiester bağların hidrolizi, peptid bağı oluşumu (rRNA), ligasyon ve polimerizasyon gibi reaksiyonları katalizlerler (Chen ve ark, 2007). Ribozimlerin aracılık ettiği reaksiyonlar multiple-turnover (Enzimler, bir reaksiyonu hangi konformasyonla başlatırlarsa, aynı konformasyonla da tamamlarlar. Bu, bir enzimin aynı reaksiyonu tekrar tekrar katalizleyebileceği anlamına gelir. Bu durum multipl-turnover olarak adlandırılır) ve diziyeye özgüdür. Bu özellikler, ribozimleri terapötik uygulamalar için uygun bir aday yapar. Genellikle merkezi bir katalitik bölge ve hedef RNA ile komplementer her biri 6-12 nükleotidten oluşmuş iki yan kol ile karakterize olan hammerhead ribozimler kullanılır. Hammerhead ribozim 30-40 nükleotid uzunluğunda RNA molekülüdür. Hammerhead ribozimin katalitik bölgesi, hedef RNA molekülü ile daha sonra bu yapının NUX (N, herhangi bir baz ise X, A, C veya U dur.) üçlüsünü kesecek olan kovalent bağlantılar oluşturur (Ecevit ve ark, 2013). Bu durum hammerhead ribozimlerin, herhangi bir RNA'yı kesmek için dizayn edilebilmesini sağlar. Bu dizayn, ribozimin substrat tanıma kısımlarında yapılır. Böylece, hedef sekansa komplementer tanıma bölgeleri içermesi sağlanır. Substrat kesimi, hedef RNA'daki NUX sekansına göre ayarlanarak dizayn edilir. Ribozimler kolay bir şekilde sentez ve modifiye edilirler. Ayrıca, hedef mRNA'lara özgü olmaları ile hedef mRNA'ların ekspresyonunu düzenlerler (Akashi ve ark, 2005).

Post Transkripsiyonel Gen Sessizleştirme Bileşenleri

Dicer enzimi

RNase III ribonükleaz ailesine dahil olan dicer enzimi, RNAi aracılı gen sessizleştirmesinin ilk adımının başlatılmasında görev alır. Bu enzim, dsRNase aktivitesi sayesinde dsRNA'ları 21-23 nükleotitten oluşan siRNA'lara dönüştürürler (Zamore ve ark, 2000). Dicer enziminin, amino ucunda yer alan bir helikaz domaini, bir PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille proteinlerinden oluşan) domaini, iki adet RNase III domaini ve sonunda karboksil ucunda yer alan çift iplikli RNA bağlama domaini olmak üzere dört farklı domaininden oluştuğu bildirilmektedir. Dicer enzimi bunlardan RNase domaini sayesinde dsRNA'nın yıkılarak siRNA'lara ayrılmasını sağlamaktadır. Helikaz domaini oluşan siRNA'ların iplikçiklerinin açılması ve hedef mRNA'ya eşlenik tek zincirin RISC kompleksine bağlanmasında görev alır. PAZ domaini dsRNA'nın enzime bağlanmasında görev alan dsRNA bağlama domainidir (Aliyari ve Ding, 2009). Dicer enzimi farklı organizmalar arasında küçük değişiklikler göstermektedir. *Drosophila melanogaster*'de enzim aktivitesi enerjije gereksinim duyarken daha ileri yapıllı ökaryotik canlılarda enerjije gereksinim duymaz (Brennecke ve ark, 2005).

siRNA

Post transkripsiyonel hedef mRNA'nın yıkılması aracılı gen sessizleştirilmesi dsRNA'nın tanınması ile başlarken deneysel fonksiyonel gen sessizleştirme çalışmalarında sentetik siRNA'lar kullanılmaktadır. 30 baz çiftinden uzun siRNA'ların kullanımı interferon cevabını tetikleyerek gen ifadesinde özgül olmayan sessizleştirmeye ve apoptozis aracılı hücre ölümüne neden olabileceğinden çalışmalarda 30 baz çiftinden kısa siRNA'lar kullanılmalıdır (Rao ve ark, 2009). siRNA'ların hedef mRNA'ya spesifik tek iplikçığı post transkripsiyonel gen sessizleştirilmesinde rehber olarak görev alır. dsRNA'ların Dicer enzimi ile yıkılması sonrası 5'- fosfat ve 3'-hidroksil uçlarına sahip ve 3' hidroksil uçlarında 2-3 nükleotitlik çıkıntı bulunan yaklaşık 21-23 nükleotitten oluşan siRNA'lar oluşmaktadır. siRNA'ların sahip olduğu bu yapısal özellikler RISC kompleksine bağlanmasında önemlidir (Cullen, 2004).

RISC

Yapısında nükleaz ve helikaz aktivitesine sahip enzimleri içeren RISC, siRNA'lara bağlanarak bunların rehberliğinde hedef mRNA'nın yıkılmasına neden olmaktadır. RISC'in temel bileşeni olan Argonaute proteini mRNA'nın yıkılmasının gerçekleştirildiği bölge olup PAZ domaini siRNA'nın 3' ucuna bağlanmada rol alırken PIWI domaini hedef mRNA'nın yıkılmasında rol oynamaktadır (Bartel, 2004).

RNAi'nin Mekanizması

İnterferenste önemli nokta; hedef mRNA içinde doğru 21 nükleotitlik komplementer sekansın bulunmasıdır (21-base target site). RNA interferens iki önemli adımda gerçekleşir: Birinci adım; uzun dsRNA'ların 21-23 nükleotitlik küçük siRNA'ya ayrılmasıdır (başlangıç adımı). İkinci adım ise; hedef mRNA'nın belirlenmesi ve yıkılmasıdır (efektör adımı) (Akashi ve ark, 2001; Ecevit ve ark, 2013).

Başlangıç Adımı

RNA interferensin ilk aşamasında uzun dsRNA zinciri ATP bağımlı Dicer enziminin katalizlediği bir reaksiyonla 5'-fosfat ve iki nükleotitlik çıkıntıya sahip 3'-hidroksil uçlarına sahip 21-23 nükleotit uzunluğunda siRNA'lara yıkılır. Bu işlemler hücrenin sitoplazmasında gerçekleşmektedir. Dicer enziminin PAZ domaini dsRNA'yı tanıyıp bağlayarak RNase domaini tarafından 21-23 nükleotit uzunluğunda siRNA'lara yıkılmasını

sağlamaktadır (Bushati ve Cohen, 2007).

Efektör Adımı

Bu aşamada ilk olarak dsRNA'nın yıkılması ile oluşan 21-23 nükleotit uzunluğundaki siRNA'lar nükleaz aktiviteli multiprotein kompleksi olan RISC kompleksine bağlanmaktadır. *Drosophila melanogaster* de siRNA'nın RISC'e yüklenmesi için Dcr-2 (Dicer 2) ve R2D2 (dsRNA-binding protein) birlikte çalışmaktadır (Nishida ve ark 2013). Dcr-2 ve R2D2 siRNA'ya bağlanarak heterodimer formu oluşturmaktadır. Bu yapı RISC'e bağlanacak siRNA'nın seçilmesi için önemlidir. Oluşan Dcr-2/R2D2 heterodimeri daha sonra RISC'in temel bileşeni Ago2 ile yer değiştirir. Ago2 ile bağlı siRNA'nın hedef mRNA'nın yıkılmasında görev alacak iplik dışındaki diğer iplik kesilip uzaklaştırılır. Bu kesilip uzaklaştırma işlemi RISC'in aktivasyonu için önemlidir (Cheloufi ve ark, 2010).

RISC'in rehber zinciri eşlenik hedef mRNA'yı bulmak için kullanılmaktadır. RISC'in temel bileşeni Argonaute proteini mRNA'nın yıkılması için temel katalitik bölgedir. Argonaute proteinin PAZ domaini rehber zincirin 3' ucundaki 2 nükleotitlik çıkıntıyı tanıyarak 3' ucuna bağlanmaktadır. Argonaute'un diğer bir bileşeni olan PIWI domaini ise rehber zincirin 5' ucuna bağlanmaktadır. Argonaute proteini kesilecek mRNA'yı rehber zincirin 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotitler arasındaki fosfodiester bağını çözerek iki parçaya ayırır. Kesim sonrası oluşan iki parça RISC'den ayrılır. Ayrılan parçalar daha sonra eksonükleaz enzimleri tarafından parçalanmaktadır (Meister ve ark, 2004).

RNA interferensin mekanizması beş temel işlem halinde özetlenirse;

1. dsRNA tanıma ve tarama prosesi,
2. dicer-RDE-1 (RNAi deficient-1) yani bir RNase III familyası enzimi eşliğinde çift zincirli dsRNA'nın tanınması ve kesilmesi,
3. siRNA'ların üretimi: 21-23 nükleotit uzunluğunda RNA'ların oluşması,
4. siRNA-RISC kompleksi ikilisinin spesifik komplementer mRNA bölgesi ile bileşmesi,
5. RISC içindeki eksonükleazlar tarafından hedef mRNA'nın tahrip edilmesi ve RISC kompleksinin yeni bir işlem için başa dönmesi şeklindedir (Akashi ve ark, 2001).

RNAi yolağının hedef gen susturumundaki en yaygın kullanımı hücre içine 21-22 nükleotitli siRNA'ların transfeksiyonudur. Diğer bir kullanım yolu da daha uzun, Dicer enzimi ile siRNA'lara parçalanabilen 25-27 nükleotitli dupleksler (Dicer-ready siRNA) dir. İki yöntemde de hücre hatlarına transfeksiyon yöntemi oldukça başarılı olmaktadır (Davidson ve McCray, 2011).

RNAi yolağı memeli hücrelerinde deneysel olarak sentetize siRNA başlangıcı ile ya da short hairpin RNA (shRNA) kodlayan vektörler (bakteriyel ya da viral) ya da plasmidler aracılığıyla kullanılır. shRNA sitoplazmada Dicer enzimi sürecine ihtiyaç duyarken siRNA'lar bu aşamayı pas geçer ve direkt olarak RISC'e bağlanır. Ekzojen (shRNA ya da siRNA) ya da endojen (miRNA) olarak süreç bir kere RISC'e yüklendiğinde hedef mRNA'nın tanınması ve parçalanması temel olarak aynıdır (Rao ve ark, 2009).

RNAi mekanizmasının geniş çaplı görüntüleme için kullanımındaki göreceli kolaylıklar RNAi kullanımını akademik ve endüstriyel alanda hızlandırmıştır (Taylor ve Woodcock, 2015). Onkogenik sinyal yollarını tanımlamadan influenza için yeni potansiyel hedefler bulmaya hatta hücre döngüsünün gizemini aydınlatmaya kadar birçok alanda siRNA görüntülemeleri biyolojik sistemleri anlama ve hastalıklara terapötik avantajlar sağlamada katkıda bulunmuştur (Kassner, 2008).

RNAi Tedavisinin Potansiyel Kısıtlamaları

Son yıllarda RNAi nin etkili ve başarılı bir şekilde kullanımında bazı problemlerin olduğu belirlenmiştir (Davidson ve McCray, 2011). Hedef genin özgünlüğü, doğru hücre ya da dokulara

gönderilmesi, RNAi aktivitesinin dayanıklılığı ve ihtiyaç anında tekrar dozlanabilmesi ve hedef mRNA ve kodlanan proteinin kararlılıkları bu problemlerden bazılarıdır (Davidson ve McCray, 2011). Kimyasal olarak modifiye edilmiş siRNA'lar negatif yükleri ve hücreye penetrasyonunu önleyen boyutları nedeniyle taşıyıcılarıyla paketlenmiş halde sisteme verilir. Kompleks halde olmayan siRNA'lar sistemik dolaşımında bulunduktan sonra böbrekler ve ekskretler tarafından atılır. Genellikle duplesin sense zincirine bağlı kolesterol konjugatlar ya da lipid tabanlı taşıyıcılar aracılığıyla sisteme verilirler (Lares ve ark, 2010). siRNA'ların *in vivo* kullanımı IFN yanıtının aktivasyonu, spesifikite eksikliği ya da endojen miRNA mekanizmasının inhibisyonu gibi bazı önemli problemlerle karşı karşıyadır (Davidson ve McCray, 2011).

IFN (interferon) Yanıtının Aktivasyonu

Birçok virus çoğu durumda replikasyon siklusunun ara basamağında uzun dsRNA molekülleri üretmektedir. Uzun dsRNA'lar sağlıklı hücrelerde doğal ürünler olmadığından hücreler tarafından tanınması antiviral IFN yanıtının aktivasyonuna neden olur. dsRNA'nın tanınmasında sitoplazmadaki dsRNA dependent protein kinase (PKR), 2'-5' oligoadenilat sentetaz (OAS), retinoik asit indüklenebilir gen 1 (RIG-1) ve çoğunlukla hücre membranlarında lokalize olan Toll-like reseptörleri 3 (TLR 3) uygun hücrel faktörlerdir (Lares ve ark, 2010). PKR ve OAS nin sitoplazmik dsRNA tarafından aktivasyonu gen ifadesinin genel inhibisyonu ile sonuçlanır. OAS'nin aktivasyonu hücrel ve viral RNA'ları yıkan RNase L'ye bağlanan ve aktive eden 2'-5' oligoadenilatların oluşumu ile sonuçlanır. Aktive olmuş PKR, translayonun inhibisyonuna neden olan ökaryotik initiation faktör 2 alfa'yı fosforile eder ve IFN sekresyonuyla sonuçlanan sinyal yolunu başlatır. dsRNA'nın RIG-1'e bağlanması zincirleri birbirinden ayırır ve IFN ifadesini uyarır (Mello ve Conte, 2004). IFN komşu hücrelerde antiviral, antiproliferatif ve pro-apoptotik aktiviteler gibi farklı yolları uyarır. IFN, OAS ve PKR'nin ekspresyonunu aktive eder ve böylece IFN'a maruz kalmış hücreler sonunda hücrenin ölümüne neden olan dsRNA'nın çok düşük miktarlarına duyarlı hale gelirler. Lize olmuş hücrelerden salınan dsRNA birçok hücrenin membranında sunulan TLR 3 tarafından tanınabilir ve bu reseptörler aracılığıyla da yangısal sitokinlerin ve IFN'un ekspresyonu aktive edilebilir (Proud, 1995).

RNA interferens'in mekanizmasında olduğu gibi hücrede dsRNA'nın ekspresyonunu gerektiren stratejilerde IFN cevabının dikkate alınması gerekir. İlk deneyler uzun dsRNA'ların dışında siRNA'ların IFN cevabını aktive etmediğini göstermiştir. Daha sonra 30 baz çiftinden daha kısa dsRNA moleküllerinin antiviral savunma mekanizması tarafından tanınmadığı geniş bir şekilde kabul edilmiştir. Buna karşın yakın bir zamanda siRNA'ların ve shRNA eksprese eden vektörlerin PKR, OAS, TLR 1, RIG-1 ve IFN'u aktive edebileceği keşfedilmiştir. Hücrenin ekzojen dsRNA'lara karşı tepkisinin yolunun anlaşılması daha az immun uyarıcı dsRNA'ların dizaynına yardımcı olmuştur. siRNA'ların birçok kimyasal modifikasyonunda TLR-induced immun uyarıcı etkilerin zayıfladığı belirlenmiştir (Mello ve Conte, 2004).

Rasyonel siRNA tasarımı siRNA sekansını, susturma kısmının kimyasal yapısını, RNA'nın uzunluğunu ve 5' ve 3' sonların doğasını göz önünde bulundurmak gerekir. Çoğu siRNA'lar hedef genin ekspresyonunu azaltmada başarılı olsa da sekans bağımsız tarzda immunstimülatördürler çünkü Toll like reseptörler (TLRs) tarafından tanınırlar (Mello ve Conte, 2004). TLR3'ün aktivasyonu kan akımını ve lenfatik damar artışını inhibe eder, bu durum anjiyogenezin inhibe edilmesinden yana olan korneal vaskularizasyonda avantajlı bir durumdur. TLR aktivasyonu kanser tedavilerinde de avantaj sağlar çünkü uyarılan dendritik hücreler kanser hücrelerine immunolojik yanıt oluşturur (Cubillos-Ruiz ve ark, 2009). Son yıllarda yapılan çalışmalarda oligonükleotidlerin hem gen susturma hem de

immun sistem uyarıcı olarak bu şekilde TLR aktivasyonunun istem dışı uyarması kanser terapi çalışmalarında başarılı sonuçlar ortaya koymuştur (Kortylewski ve ark, 2009, Davidson ve McCray, 2011).

Spesifik Olmayan İnhibisyon

Başlangıçta RNA interferens gen ekspresyonunun inhibisyonu için yüksek derecede spesifik bir teknik olarak tanımlanmıştır. Çeşitli model sistemlerle yapılan birçok çalışmada bu görüş desteklenmiştir. Bu yüzden siRNA'lar tek bir nükleotidi hedeflenmeyen gende ayırt edebilen sadece patojenik allelin sessizleştirilmesi için tasarlanabilir. Hedef dizideki tek bir nükleotid değişikliği virusun RNA interferensten mutasyonlarının gerçekleştirildiği deneylerde bazı hatalı eşleşmelerin sessizleştirmeyi bozmaksızın tolere edilebileceği sonucunu ortaya çıkarmıştır. Bu hedef diziden çok az farklılık içeren hedef genlerin dışındaki genlerin de inhibisyonuna neden olabilir (Almeida ve Allshire, 2005).

Hücrel Sessizleştirme Mekanizmasının Doyurulması

Ekzojen siRNA'lar ve endojen miRNA'lar *in vivo* aynı hücrel mekanizmayı paylaşırlar. Hücrel siRNA'ların belirli bir sınırın üzerinde eksprese edilmesi hücre toksitesine yol açmasından ötürü sessizleştirme mekanizması sınırlı şekilde doyurulabilir. Bu, farelere farklı uzunluklarda siRNA eksprese eden AAV (Adeno-associated virus) rekombinant vektörün yüksek dozlarının inokulasyonu sonrası gösterilmiştir. Doyurma shRNA'ları ve pre-miRNA'ları sitoplazmaya taşıyan ekspresyon 5 düzeyinde meydana gelmiştir. shRNA'nın aşırı ekspresyonu sonucu miRNA düzeyindeki azalma ekspresyonun 5'in aşırı ekspresyonu sonucu düzeltilmiştir (Yi ve ark, 2003). Buna karşın Dicer ve RISC gibi mekanizmanın diğer bileşenlerinin sınırlı olduğu gösterilmiştir. Bu yüzden diğer bileşenler de doyurulabilir. Hücrel RNAi mekanizmasının doyurulması hücrede siRNA'nın düşük dozları eksprese edildiğinde önlenir. En iyi seçenek ilk olarak siRNA inhibitörlerinin fonksiyonel olduğu en düşük konsantrasyonların tespit edilmesidir. shRNA'ları taşıyan viral vektörler kullanıldığında en düşük fonksiyonel titrenin kullanılması gerekir. İdeal olarak shRNA'ların ekspresyonunu yöneten promotörlerin uyarılabilir olması gerekir. Böylece dışarıdan uyarıcı dozu azaltılmakla siRNA ekspresyonu azaltılabilir. Bu kurallara uyulduğunda *in vivo* endojen mekanizmanın doyurulması olmaksızın etkili inhibisyonun gözlenebileceği gösterilmiştir (Fagard ve ark, 2000).

RNA İnterferens Üzerindeki Viral Etkiler

Memeli viruslarının enfekte hücrenin RNA interferens mekanizmasını kendi yararları için kullanabildikleri gösterilmiştir. Bunu virus canlılığı için önemli viral miRNA'lar eksprese ederek ve hücrel miRNA profilini değiştirerek başarırlar. Bu yüzden virus çoğalması için önemli miRNA'ların ekspresyonu sağlanırken zararlı miRNA'ların fonksiyonları çeşitli yollarla azaltılır. Latent enfeksiyon oluşturan viruslarda konak hücre gen ekspresyonunu düzenleyen viral miRNA'ların varlığı çoğunlukla teyit edilmiştir. Birçok viral miRNA'nın varlığı Kaposi's sarcoma ilişkili herpesvirus (12 miRNA), onkojenik Epstein-Barr virus (17 miRNA), human cytomegalovirusun dahil olduğu herpesviruslarda tanımlanmıştır (Wies ve ark 2008). Adenovirus ve SV40 (Simian virus 40) gibi daha küçük DNA virusları da miRNA kodlayabilir. Sonuçlar viral miRNA'ların artmış enfeksiyon etkinliği ve hücrenin adezyon, migrasyon, anjiyogenez ve immun yanıtıyla ilişkili hem hücrel hem de viral genlerin ekspresyonunu kontrol edebildiğini göstermiştir (Plaisance-Bonstaff ve Renne, 2011). Viral enfeksiyona yardım eden hücrel miRNA'nın en iyi karakterize edilmiş

Tablo 1. Bazı hastalıklarla ilişkili miRNA lar (Bodur ve Demirpençe, 2010).

Hastalık	İlişkili miRNAlar
Kardiyak hipertrofi	miR-1 , miR-133 ↓ ↓
Alzheimer	miR-124a , miR-9↓, miR-128↑ ↑
Parkinson	miR-133b ↓
Şizofreni	miR-130b

örneği miR-122 dir. miR-122'nin fonksiyonuna bağlı olarak viral replikasyonu arttıran bu karaciğer-spesifik miRNA HCV (hepatitis C virus) genomunun 5' ucuna bağlanır. Bu yüzden HCV enfeksiyonun gen sessizleştirilmesi aracılığıyla önlenmesinde 5' UTR (untranslated region-yönetici sekans)'deki miR-122'nin bağlandığı bölge siRNA'lar için iyi bir hedefdir (Aliyari ve Ding, 2009).

Viral Sessizleştirme Supresörleri

Viruslar hücresel miRNA profilinin düzenlenmesi, RNAi'ten mutasyonel kaçış ve RNAi'in baskılanması gibi çeşitli yollarla RNAi'e karşı koruma sağlayan mekanizmalar geliştirmişlerdir. Viruslar RNAi tarafından tanınmayı engellemek için primer dizilerinde mutasyona yol açabilecekleri gibi dizinin sekonder yapısını da değiştirebilirler. Üstelik birçok virusun RNAi mekanizmasının fonksiyonunu azaltan viral faktörler eksprese ettiği belirlenmiştir (Aliyari ve Ding, 2009).

RNA interferens mekanizmasını farklı aşamalarda hedefleyen sessizleştirme inhibitörleri ilk bitki viruslarında tanımlanmıştır. Mosaic virustan Cmv2b siRNA yayılımını ve sessizleştirmesini DNA metilasyonu aracılığıyla bloke eder. Vaccinia virusun E3L proteini, influenza virusun NS1 proteini ve Ebolana VP35 proteini sessizleştirmenin inhibisyonunda rol oynayabilen dsRNA bağlama proteinleridir. HCV'nin çekirdek proteini Dicer'ı bloke edebilir. HIV Tat proteini Dicer'in işleme aktivitesini kısmen engelleyerek RNA interferensi suprese edebilir (Akashi ve ark, 2001).

RNAi ve Hastalıklarla İlişkisi

Yapılan çalışmalarda kanser ve birçok hastalık türünün miRNA mekanizmasındaki sorunlardan kaynaklandığı gözlemlenmiştir (Dyawanapelly ve ark, 2014). miRNA'ların genetik sebepli ifade değişikliklerine delesyonlar, amplifikasyonlar veya translokasyonlar gibi büyük ölçekli genom değişiklikleri sebep olmaktadır. Delesyonlar söz konusu miRNA'nın miktarını ileri derecede azaltırken, hedefi olan mRNA'nın ve ondan kodlanan proteinin artmasına sebep olur. Amplifikasyonlar ise miRNA miktarını artırırken hedef mRNA'nın etkinliğini ve bundan kodlanan proteini azaltır. Translokasyonların etkisi ise yer değiştiren DNA parçasının yerleşme yerine göre artırıcı veya azaltıcı yönde olabilir. Büyük ölçekli genom değişikliklerine ek olarak nokta mutasyonları da miRNA işlevini bozabilir (Bodur ve Demirpençe, 2010). Ayrıca epigenetik değişiklikler ve miRNA'nın kodlandığı genin promotor etkinliğindeki değişiklikler de miRNA ekspresyonunu etkileyebilir (Lee ve Dutta, 2009). Hücre büyümesi, farklılaşma, çoğalma gibi olaylarda görevli miRNA'ların mekanizmalarında meydana gelen aksaklıklar kanserin oluşumunda etkilidir. Çünkü bu miRNA'ların bir kısmı onkogenik bir kısmı ise tümör baskılayıcı tiptedir (Cho, 2007). miRNA kodlayan dizilerin, kırılgenom bölgelerinde normal genom bölgelerine göre daha yüksek oranda (dokuz kat) buldukları gösterilmiştir. Bu şekilde miRNA kodlayan genlerin bu bölgelerde diğer bölgelere göre daha fazla bulunmaları onları işlev bozukluğuna yatkın hale getirmektedir (Calin ve ark, 2004).

RNAi'nin keşfi araştırmacıları bu mekanizmayı biyolojik sorunlar ve hastalıkların tedavisinde faydalı bir şekilde kullanma yoluna itmiştir. siRNA gibi bazı ajanlar hücrelere, dokulara, organizmalara direkt uygulanabilirken; hairpin yapılar gibi süreç içerisinde siRNA'ları oluşturan mühendislik ürünleri de mevcuttur. RNAi kullanımındaki temel teori ilgililenen hedef gene uygun siRNA'lar ya da onları kodlayan genler dizayn edilebilmesidir (Davidson ve McCray, 2011).

Tedaviye yönelik ve deneysel amaçlarla özgül genlerin ifadesini düzenlemeye katkı sağlayan kontrol mekanizmalarından miRNA'lar ve siRNA'lar transkripsiyon sonrası gen ifadesini düzenler. Her iki 21-23 nükleotid uzunluğundaki RNA'lar spesifik mRNA'larla baz eşleşmesi yapar. miRNA'lar hedef mRNA'nın yazılımını engellerken siRNA'lar yıkılmasına neden olur. İnsanlarda ifade edilen on binlerce miRNA belirlenmiştir. Bunların çoğu embriyogenez sırasında veya doğum sonrası belirli zamanlarda özgül hücre tiplerinde ifade edilirler. İnsandaki genlerin en az %30'unun miRNA'lar tarafından düzenlendiği düşünülmektedir (Davidson ve McCray, 2011). Hedef mRNA'nın 3' ucundaki dizi ile miRNA arasındaki baz eşleşmesinin kusursuz olmasına gerek olmadığı için birden fazla mRNA sadece bir miRNA tarafından düzenlenebilir. Sentetik miRNA'larla yapılan araştırmalar bir miRNA'nın 5' ucundaki 6 veya 7 nükleotid ile hedef mRNA'nın translasyona uğramayan 3' bölgesi arasındaki eşleşmenin çok önemli olduğunu göstermiştir (Blenkiron ve Miska, 2007).

RNAi'nin klinik faydaları henüz tam olarak uygulanamasa da yapılan denemeler başarıya ulaşmada yarar sağlayacaktır. Bir veya birkaç toksik genin ifade edilmesi sonucu meydana gelen birçok hastalık bu toksik genlerin sessizleştirilmesi ile tedavi edilebilir. Bu yüzden RNAi kanser, viral enfeksiyonlar, baskın genetik hastalıklar veya bozukluğun hücresel bir genin aşırı ekspresyonu sonucu oluştuğu diğer hastalıklarda başarılı bir şekilde kullanılabilir. Son yıllarda retinal dejenerasyon, kalıtsal beyin ve deri hastalıkları, viral enfeksiyonlar, solunum hastalıkları, kanser ve metabolik hastalıklar gibi alanlarda yapılan çalışmalarla RNAi temelli prelinik ve klinik uygulamalarda ilerlemeler kaydedilmiştir (Keates ve ark, 2007). Son çalışmalarda terapötik bakterinin kanserli hastalarda tümör kitlesine girebildiği ve bu şekilde bakterilerin RNAi uygulamalarında vektör olarak kullanılabilmesi gösterilmiştir (Dyawanapelly ve ark, 2014). Rekombinant teknoloji ile üretilen *E.coli* memeli hücrelerine girebilmekte ve shRNA'lar transfer edebilmektedir ve yine benzer şekilde üretilen *Salmonella* etkenleri farelerde tümör yükünü azaltmış ve yaşama şansını artırmıştır (MacDiarmid ve ark, 2009).

miRNA'lar tümör belirteci olarak kullanılabilir. miRNA hedeflerini tanımlamakta kullanılan bilgisayar algoritmaları kritik eşleşmede rol alan 5' ucundaki sekiz nükleotidlik diziyi kullanır, ancak tam eşleşme söz konusu olmadığından gerçek miRNA hedeflerini tanımlamak çok zordur. Her miRNA molekülü çok sayıda farklı mRNA'ya bağlanabileceği gibi, her mRNA'ya da çok sayıda farklı miRNA bağlanabilmektedir. Bu durum transkripsiyon yoluyla miRNA'ların hücre kültürlerinde ifade etkinlikleri gösterilmesini ve bilişimsel yaklaşım ile önerilen miRNA hedeflerinin, bu yolla doğrulanmasını gerektirir (Bodur

ve Demirpençe, 2010).

RNAi temelli kanser tedavileri tümör büyümesi için gereken bir veya birkaç genin ekspresyonunun inhibisyonuna neden olabileceğinden gelecek vaat edici gibi görünmektedir. Buna karşın başarılı bir tedavi başarılmadan önce ele alınması gereken birçok konu vardır: tümör büyümesi için gerekli hedef genlerin tespit edilmesi gerekir ve arzulan hedeflere karşı siRNA'ların birçok tümör hücrelerine veya en azından tümör kök hücrelerine taşınması gerekir. Birçok çalışmada tümör oluşumu ve büyümesine neden olan hücresel yolları anlamak için deneysel araç olarak RNAi kullanılmıştır. Bu yollarla ilişkili tümör hücrelerinde ekspresyonu değişen genler RNAi temelli tedaviler için iyi bir adaydır. Bunlar azalmış hücre ölümlü ve artmış bölünme sonucu proliferasyona neden olan sinyal çeviri yolları ile ilişkili onkogenleri içerir (Blenkiron ve Miska, 2007). Hücre siklusunu regülasyonu, apoptozis ve yaşlanma ile ilişkili genlere karşı siRNA taşıyan viral vektörlerin anti-tümöral etkinliğinin klinik öncesi değerlendirmesinden gelecek vadeden sonuçlar elde edilmiştir. Buna karşın birçok kanserde, tek bir yolun inhibisyonu hastalığın eliminasyonu için yeterli değildir ve eş zamanlı birçok genin bloke edilmesi gerekir. RNAi temelli tedaviler aynı viral vektörden farklı shRNA'ların birlikte ekspresyonu ile aynı hücrede farklı hedeflerin sessizleştirilmesi için kullanılabilir (Christoffersen ve ark, 2010). Kompleks siRNA'ların kullanımı spesifik hücrelerin hedeflenmesinde, kanserde faydalar sağlar. İnsanlardaki ilk çalışma olarak transferrin-receptor-targeting ligandları kullanarak kanser hücrelerine karşı kullanımında hedef mRNA seviyelerinde azalma ve hedefte bölünmeler gösterilmiştir (Davidson ve McCray, 2011).

RNAi uygulamalarında iki temel alan vardır. Bunlardan birisi, RNAi temelli yeni ilaçların dizaynı çalışmalarıdır. Diğer 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 (Karagüzel ve ark, 2007). Özellikle gen sessizleştirilmesi; HIV/AIDS, influenza, insan papillomavirus enfeksiyonu, hepatit, SARS gibi viral hastalıklarda uygulanmış, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar ile romatoid artrit gibi otoimmün hastalıklar üzerinde de araştırmalar ve uygulamalar yapılmaktadır. HIV enfekte akyuvarlarda *ex-vivo* uygulamaları yapılmaktadır. Diğer 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 vardır (Dyawanapelly, 2014).

Birçok nörolojik hastalık mutasyona uğramış veya yanlış katlanmış toksik proteinlerin ekspresyonu ya da nörotoksititeye neden olan proteinlerin aşırı birikiminden oluşur. Ekspresyonlarını azaltmak için toksik genleri hedefleyen RNAi temelli tedavi uygulamaları bunlar için ideal ortamdır. Özellikle genin vahşi tip gerekli formunu hedeflemeyen mutant toksik formunu hedefleyen siRNA'lar seçilebilir (Kumar ve ark, 2007). RNAi temelli tedaviler genetik hastalıkları tedavi etmek için de kullanılabilir. Sickle cell anemia ve Duchenne muscular dystrophy'nin tedavisi için siRNA taşıyan viral vektörlerin kullanımı ile ilgili prelinik çalışmalar vardır. Aynı zamanda astım gibi immünolojik hastalıkların tedavisinde RNAi kullanılabilir. Astım ve alerjik hastalıklarla güçlü ilişkili Th2 (T helper 2)'nin anahtar transkripsiyonel faktörü olan GATA-3 (Trans-acting T-cell-specific transcription factor)'ü hedefleyen siRNA'ları taşıyan lentiviral vektörler kullanılmaktadır. Astımın bir fare modeli çalışmasında vektörlerin intratracheal verilmesi antijenin indüklediği hava yollarının yangısını azaltmıştır (Zheng ve ark, 2009).

RNAi aracılı sessizleştirme ile bakteri, virus ve parazit enfeksiyonları da tedavi edilebilir. Bakteriyel genler konak

hücrenin dışında eksprese edildiklerinden ve bakterilerde RNAi mekanizması olmadığından siRNA'lar tarafından sessizleştirilemezler. Buna karşın bakteriyel invazyon için gerekli konak genlerinin ekspresyonunun azalması aracılığıyla bakteriyel enfeksiyonların etkilenmesi hala mümkündür. Bakterilerin aksine Malaria gibi parazitlerde ve Malariyanın Afrika'daki temel vektörü *Anopheles gambiae*'de RNAi mekanizması belirlenmiştir. Bu yüzden Malaria temel parazit genlerinin sessizleştirilmesi ya da parazit enfestasyonu için gereken hayati olmayan vektör genlerinin ekspresyonunun azaltılması aracılığıyla tedavi edilebilir (Lares ve ark, 2010). RNAi temelli teknikler anti-viral olarak olağanüstü potansiyele sahiptir. Birçok patojenik virusun genom dizilimi mevcuttur. Aynı zamanda yeni çıkan viral enfeksiyonlar hızlı bir şekilde tespit edilebilir ve viral genomun dizilimi belirlenebilir. Viral genlerin ekspresyonunu bloke eden antiviral RNAi inhibitörlerinin tasarlanması için gen diziliminin bilinmesi yeterlidir. Aynı zamanda virus ve konak hücre ile etkileşimi hakkında daha fazla bilgi edinildiğinde, fonksiyonu virusun canlılığı için önemli ancak hayati olmayan hücresel genler de antiviral siRNA'lar tarafından hedeflenebilir (Dyawanapelly ve ark, 2014).

RNAi yolağında yer alan siRNA'ların hedef dizilerine mükemmel eşleşme göstermesi onları gen işlevinin araştırılmasına çok uygun araçlar haline getirir. RNAi uygulamasıyla istenmeyen bir proteinin ifadesi baskılanabileceği gibi istenmeyen miRNA'ların da engellenmesi sağlanabilir. Bu amaçla kullanılacak siRNA'lara "antagomir" adı verilmektedir (Cowland ve ark, 2007). Sadece siRNA dizilerinin verilmesi yerine plazmid kasetleri içerisinde veya viral vektörler aracılığıyla aktarım yapılabilir, basit bir izotonik tuz veya dekstro çözeltisi içinde sistemik olarak uygulanabilen siRNA parçacıkları yalın halde aktarılabilecekleri gibi, hedeflendikleri gen ürününe daha iyi ulaşabilmeleri için kolesterol veya aptamerlerden oluşan bir kuyruk takılı olarak da üretilebilir. Ayrıca siRNA molekülüne bir protamin-antikor kuyruğu eklenebilmekte, o hücre tipine özgü bir proteine karşı geliştirilmiş olan antikorun kullanılmasıyla özgüllük sağlanabilmektedir (Morris ve Rossi, 2006).

RNA interferens, transkripsiyon sonrası gen ekspresyonunun susturulması/baskılanması için etkili bir metoddur. Bu mekanizma doğada var olan bir mekanizma olup, aynı zamanda moleküler biyolojide gen-protein işlevi analizinde, fonksiyonel genomik araştırmalarında ve gen tedavisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Antisens etki gösteren yapıların, komplementer mRNA'yı degrade ederek ya da translasyonu baskılayarak hedef geni susturabilmeleri, gen ekspresyonunun kontrolü ve bu yolla hastalıkların mekanizmasında yer alan genlerin hedeflenerek özgün olarak tedavi edilebilmeleri açısından moleküler tedavide önemli bir kilometre taşı olarak görülmektedir. Dolayısı ile gelecekte, tedavi süreci uzun, zahmetli ve çoğu zaman başarısızlıkla sonuçlanan kanser, nörodejeneratif ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde umut vaat eden bir mekanizma olarak görülmektedir.

Kaynaklar

- Akashi H, Miyagishi M, Taira K. Suppression of gene expression by RNA interference in cultured plant cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 2001, 11(6), 359-67.
- Akashi H, Matsumoto S, Taira K. Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2005, 6(5), 413-22.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* (5th edition), New York: Garland Science, 2008.
- Alexander R, Krol VD, Lenting PE, Venestra J, Van Der Meer IM, Koes RE, Gerats AGM, Mol JNM, Stuitje AR. An anti-sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 1988, 333, 866-869.
- Aliyari R, Ding SW. RNA-based viral immunity initiated by the Dicer family of host immune receptors. *Immunological Reviews* 2009, 227, 176-188.

- Almeida R, Allshire RC. RNA silencing and genome regulation. *Trends Cell Biol* 2005, 15, 251-258.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 2004, 116, 281-297.
- Blenkiron C, Miska EA. miRNAs in cancer: approaches, aetiology, diagnostics and therapy. *Hum Mol Genet* 2007, 16, 106-13.
- Bodur E, Demirpençe E. Kodlamayan RNA'lar ve gen susturumu. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2010, 41, 82-89.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA target recognition. *PLoS Biol* 2005, 3, 404-418.
- Bushati N, Cohen SM. MicroRNA Functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007, 23, 175-205.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 2999-3004.
- Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ. A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 2010, 465(7298), 584-589.
- Chen X, Li N, Ellington AD. Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world. *Chem Biodivers* 2007, 4, 633-655.
- Cho WCS. Oncomirs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007, 6, 60-7.
- Christoffersen NR, Shalgi R, Frankel LB, Leucci E, Lees M, Klausen M, Pilpel Y, Nielsen FC, Oren M, Lund AH. p53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death and Differentiation* 2010, 17(2), 236-245.
- Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS* 2007, 115, 1090-106.
- Cubillos-Ruiz JR, Engle X, Scarlett UK, Martinez D, Barber A, Elgueta R, Wang L, Nesbeth Y, Durant Y, Gewirtz AT, Sentman CL, Kedl R, Conejo-Garcia JR. Polyethylenimine-based siRNA nanocomplexes reprogram tumor-associated dendritic cells via TLR5 to elicit therapeutic antitumor immunity. *J Clin Invest* 2009, 119, 2231-2244.
- Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004, 16, 861-865.
- Czech B, Hannon GJ. Small RNA sorting: matchmaking for Argonautes. *Nature Rev Genet* 2011, 12, 19-31.
- Dahm R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev Biol* 2005, 278, 274-288.
- Davidson BL, McCray PB Jr. Current prospects for RNA interference-based therapies. *Nat Rev Genet* 2011, 12(5), 329-40.
- Dickerson RE. The DNA Helix and How It is Read. *Scientific American* 1983, 249, 94-111.
- Dyawanapelly S, Ghodke SB, Vishwanathan R, Dandekar P, Jain R. RNA interference-based therapeutics: molecular platforms for infectious diseases. *J Biomed Nanotechnol* 2014, 10(9), 1998-2037.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003, 4, 457-67.
- Ecevit H, Motor S, İzmirlı M. Genden tedaviye yeni yaklaşımlar: kodlamayan nükleik asitler. *Mustafa Kemal Üniv Tıp Derg* 2013, 4, 13.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H. AGO1, QDE-2 and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi and RNA interference in animals. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97, 11650-11654.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998, 391(6669), 806-811.
- Garfield E. The 1989 Nobel Prize in Chemistry Goes to Sidney Altman and Thomas R. Cech for the Discovery of Enzymatic RNA. *Essays of an Information Scientist* 1990, 13, 266.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001, 6, 23-34.
- Jorgensen RA, 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. complex T DNA sequences. *Plant Mol Biol* 1996, 31(5), 957-73.
- Juliano RL, Dixit VR, Kang H, Kim TY, Miyamoto Y, Xu D. Epigenetic manipulation of gene expression: a toolkit for cell biologists. *J Cell Biol* 2005, 169, 847-857.
- Karagüzel A, Kalay E, Celep F. RNA interferens (RNAi): gen sessizleştirilmesi ve tedavi edici uygulamaları. *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi* 2007, 33(1), 41-44.
- Keates AC, Fruehauf JH, Xiang S, Parker PD, Li CJ. Cequent Pharmaceuticals, Inc.: the biological pitcher for RNAi therapeutics. *Pharmacogenomics* 2007, 8, 867-871.
- Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Rev Gen* 2007, 8, 173-84.
- Kiriakidou M, Tan GS, Lamprinakı S, De Planel-Sauger M, Nelson PT, Mourelatos Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell* 2007, 129, 1141-1151.
- Kortylewski M, Swiderski P, Herrmann A, Wang L, Kowolik C, Kujawski M, Lee H, Scuto A, Liu Y, Yang C, Deng J, Soifer HS, Raubitschek A, Forman S, Rossi JJ, Pardoll DM, Jove R, Yu H. In vivo delivery of siRNA to immune cells by conjugation to a TLR9 agonist enhances antitumor immune responses. *Nature Biotech* 2009, 27, 925-932.
- Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 1982, 31, 147-157.
- Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung KE, Kim MH, Davidson BL, Lee SK, Shankar P, Manjunath N. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature* 2007, 448(7149), 39-43.
- Lares MR, Rossi JJ, Ouellet DL. RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol* 2010, 28, 570-579.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993, 75, 843-854.
- Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2009, 4, 199-227.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biol* 2005, 7, 719-23.
- MacDiarmid JA, Amaro-Mugridge NB, Madrid-Weiss J, Sedliarou I, Wetzel S, Kochar K, Brahmabhatt VN, Phillips L, Pattison ST, Petti C, Stillman B, Graham RM, Brahmabhatt H. Sequential treatment of drug-resistant tumors with targeted minicells containing siRNA or a cytotoxic drug. *Nature Biotech* 2009, 27, 643-651.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G, Tuschl T. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell* 2004, 15, 185-197.
- Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004, 431(7006), 338-42.
- Mizuno T, Chou MY, Inouye M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). *Proc Natl Acad Sci USA* 1984, 81, 1966-1970.
- Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther* 2006, 13, 553-8.
- Napoli C, Lemieux C, 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.
- Nishida KM, Miyoshi K, Ogino A, Miyoshi T, Siomi H, Siomi MC. Roles of R2D2, a cytoplasmic D2 body component, in the endogenous siRNA pathway in *Drosophila*. *Mol Cell* 2013, 49(4), 680-91.
- Plaisance-Bonstaff K, Renne R. Viral miRNAs. *Methods Mol Biol* 2011, 721, 43-66.
- Portin P. The concept of the gene: short history and present status. *Q Rev Biol* 1993, 68, 173-223.
- Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J. siRNA vs. shRNA: Similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 2009, 61(9), 746-759.
- Ruitz F, Vayssie L, Klotz C, Sperling L, Madeddu L. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 1998, 9(4), 931-43.

- Saenger W. Principles of Nucleic Acid Structure, New York: Springer-Verlag, 1984.
- Sözbilir NB. Biyokimya. NB Sözbilir, N Bayşu(Ed.), Ankara: Güneş Tıp Kitabevi, 2008.
- Stefani G, Slack FJ. Small non-coding RNAs in animal development. Nat Rev Mol Cell Biol 2008, 9, 219-30.
- Taylor J, Woodcock S. A perspective on the future of high-throughput RNAi screening: will CRISPR cut out the competition or can RNAi help guide the way? J Biomol Screen 2015, 20(8), 1040-51.
- Veeramachaneni V, Makalowski W, Galdzicki M, Sood R, Makalowska I. Mammalian overlapping genes: the comparative perspective. Genome Res 2004, 14, 280-286.
- Wies E, Mori Y, Hahn A, Kremmer E, Stürzl M, Fleckenstein B, Neipel F. The viral interferon-regulatory factor-3 is required for the survival of KSHV-infected primary effusion lymphoma cells. Blood 2008, 111(1), 320-7.
- Yıldırım A, Bardakçı F, Karataş M, Tanyolaç B. Moleküler Biyoloji, A. Yıldırım(Ed.), Ankara: Nobel Yayın Dağıtım, 2010.
- Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. Genes Dev 2003, 17(24), 3011-6.
- Zamecnik PC, Stephanson ML. Inhibition of Rausarcomavirus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. Proc Natl Acad Sci USA 1978, 75, 280-4.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 2000, 101(1), 25-33.