



Derleme

Antiviral RNA İnterferenz (RNAi) ve Yeni Bir Gen Düzenleme Metodu CRISPR/Cas Mekanizması ile Karşılaştırılması

B. Taylan Koç¹, T. Çiğdem Oğuzoğlu²

¹Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı (ADÜ Faculty of Veterinary Medicine Department of Virology) 09016 Isıklı-Aydın, ²Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı (AÜ Faculty of Veterinary Medicine Department of Virology) 06110 Dışkapı-Ankara

Ö Z E T

Öz bilgi: RNA İnterferenz (RNAi) mekanizması son 20 yılda genom üzerinde değişiklik yapmayı sağlayan en önemli biyoteknolojik yöntemdir. Bu metot ile biyoteknolojinin birçok alt dalında denemeler yapılmış ve oldukça fazla veri elde edilmiştir. Tam da bu verilerin terapötik olarak değerlendirileceği sırada yine RNAi'ye benzer bir mekanizma keşfedilmiştir. Virus ve fajlara karşı bakterilerde savunma sağlayan bu mekanizmaya CRISPR adı verilmiştir. Bu yeni teknolojinin RNAi'ye göre bazı durumlarda avantajı olması günümüzde onu oldukça öne çıkarmıştır.

Sonuç: Özellikle virüslere karşı mücadelede önemli silah olan RNAi bu derlemenin temelini oluştururken, daha yeni olan CRISPR mekanizması ve farklılıkları da bu derlemede konu edilmiştir. Derleme sonunda karşılıklı etkileşim gösteren bu iki yöntemin yakın gelecekte biyoteknoloji alanına damga vurucağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: RNAi, CRISPR, Virus, Genom Düzenleme.

Antiviral RNA Interference and Its Comparison with CRISPR/Cas Mechanism, A Novel Gene Editing Method

ABSTRACT

Background: RNA Interference (RNAi) mechanism is assumed among the most important biotechnological methods, that allows to edit the genome in the last two decades. The experiments have been performed through by this method in many sub-fields of biotechnology, and quite a lot of data were obtained. A mechanism, similar of RNAi, was discovered just then obtained data was going to evaluate as therapeutics. This mechanism that provided immunity to viruses and phages was named as CRISPR. To possess an advantage of the new method, compared to RNAi in some circumstances, is nowadays come into prominence significantly.

Conclusion: RNAi, being an important tool in struggling with viruses, which forms the basis of this review and newer mechanism CRISPR and its differences are subjected in. At the end of the review, it was concluded that both methods, showing the interaction between themselves, would be impact on biotechnology branches in the near future.

Keywords: RNAi, CRISPR, Virus, Genome Editing.

Correspondence To: B. Taylan KOÇ, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Viroloji Anabilim Dalı (ADÜ Faculty of Veterinary Medicine Department of Virology) 09016 Isıklı-Aydın. E-mail:btokoc@adu.edu.tr

Giriş

“Genom düzenleme”, intrinsik ya da ekstrinsik faktörler tarafından indüklenen mekanizmaların genom üzerinde meydana getirdiği değişikliklere ve bu değişikliklere bağlı oluşan gen ifadesi farklılıklarına verilen genel bir tanımlamadır. “Genom düzenleme” çok yeni bir bilimsel ifade olmasına karşın, bünyesinde barındırdığı mekanizmaların önde geleni olan RNA İnterferenz (RNAi)’in ortaya çıkışı çeyrek asır öncesine dayanmaktadır. Özellikle “Gen Susturumu” veya “Gen Sessizleştirme” olarak anılan RNAi mekanizmasının yanına yeni mekanizmaların eklenmesiyle daha geniş kapsamlı bir ifade olan “genom düzenleme” biyoteknoloji literatürüne girmiştir. RNAi mekanizması; intrinsik olarak mikro RNA (miRNA)’lar; ekstrinsik olarak ise küçük interfere RNA (small interfering RNA; siRNA) veya kısa saç tokası RNA (short hairpin RNA; shRNA)’lar ile ilişkilendirilmiştir. RNAi mekanizmasına benzer şekilde diğer gen düzenleme mekanizmaları da intrinsik ve ekstrinsik olarak sınıflandırılmaktadır. Bu temel metotlar şunlardır:

- Düzenli Ara Boşluklarla Kümelenmiş Palindromik Tekrarlar (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats: CRISPR-Cas)
- Çinko Uzantılı Nükleazlar (Zinc Finger Nuclease; ZFN)
- Transkripsiyon Aktivatör Benzeri Etkinleştirici Bazlı Nükleazlar (Transcription Activator-Like Effector-based Nucleases; TALEN)’dir.
- Dizayn edilmiş nükleazlar ve yeniden dizayn edilmiş intrinsik endonükleazlar (engineered meganuclease re-engineered homing endonucleases)(Gaj, 2013).

Temel anlamda gen düzenleme metotları birbirlerine benzerlik gösterebilirler de, RNAi ve bahsi geçen diğer metotlar arasında temel proses farkı olarak nükleaz varlığı söz konusudur. Bu durum genom üzerinde değişiklik meydana getirebilen RNAi benzeri (RNAi-like) metotlar ve nükleaz temelli gen düzenleme metotları olarak 2 ana mekanizma başlığı altında incelenmesine neden olmaktadır. Ancak nükleaz temelli mekanizmalardan ZFN ve TALEN tekniklerinde her bir DNA sekansı için ayrı protein üretimi söz konusudur. Bu da hem maddi hem de zaman açısından ciddi dezavantajlar doğurmaktadır. Bundan dolayı CRISPR mekanizması en önemli nükleaz temelli interferenz yöntemi olarak öne çıkmaktadır. Bu derlemede; RNAi temelli antiviral mekanizma hakkında bilgi verilecek olup, CRISPR mekanizması ile karşılaştırılması yapılacaktır (Gaj, 2013).

RNA İnterferenz

RNAi canlıların hücresel işlevlerinde oldukça önemli bir yer tutmaktadır. Fire ve Mello (1998) tarafından RNAi mekanizmasının hücrede var olduğu ve oldukça önemli görevleri olduğu keşfedilene kadar, genetik bilginin sadece DNA üzerindeki kodlanan kısım olan ekzonlar tarafından oluşturulduğu kabul edilmekteydi.

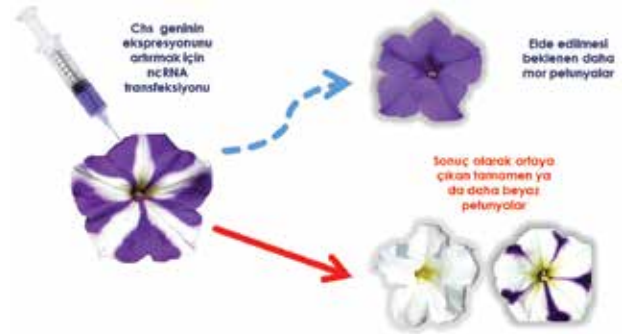
Diğer kodlanmayan bölgeler olan intronların ise genetik bilgi aktarımında herhangi bir görevi olmadığı düşünülmekteydi. Hatta bu kodlanmayan kısımlar gereksiz DNA (junk DNA) olarak anılmaktaydı. Bilim dünyasında ezber bozan RNAi mekanizmasının ortaya konulmasından itibaren, intron bölgelerinin gen ifadelerinde en az ekzonlar kadar, hatta ekzonlara göre daha büyük oranla önemli olduğu görüşü hakim olmuştur. İtron bölgelerinde kodlanmayan bu RNA’lar ile canlıların hücresel düzeyde tüm yaşamsal faaliyetleri için gerekli gen ifadelerinin düzenlenmesi sağlanmaktadır.

Kısa bir tanımlama ile RNAi:

Yaklaşık 20-25 nükleotid uzunluğunda endojen veya ekzojen kaynaklı küçük çift iplikli RNA (dsRNA) fragmanlarının gen ifadesinden önce hedef mesajcı RNA (mRNA) üzerindeki spesifik bölgeyi kapatarak transkripsiyon sonrası gen sessizleştirilmesi olayıdır.

RNAi mekanizmasının varlığı mantarlardan memelilere kadar çoğu ökaryotik hücreye sahip canlıda tespit edilmiştir. Sağlıklı bir ökaryotik hücrede RNAi mekanizması sayesinde mikro RNA (miRNA) olarak görev yapan küçük RNA’ların, istenmeyen genetik bilgiyi taşıyan diğer kodlanmayan RNA’ların (non-coding RNAs, virus, transpozoon gibi) transkribe olmasını engelleyerek, hücrede moleküler bir pasif bağışıklık görevi üstlendiği izlenilmiştir (Bagasra ve Prilliman, 2004).

RNAi mekanizması ilk olarak Napoli ve Jorgensen (1990) tarafından yapılan genetik transformasyon çalışmalarında açığa çıkmıştır. Botanik konusunda çalışan araştırmacıların amaçları, petunya bitkisindeki *chalcone synthase (chs)* genini ekleyerek aşırı ifadesini sağlamak ve daha mor petunyalara üretmekti. *Chalcone synthase (chs)* geni, petunyalarda bir flavonoid bileşik olan anthocyanin maddesinin biyogenezinde önemli rol oynamaktadır. Anthocyanin maddesi özellikle insan sağlığı açısından yararlı olması bakımından önemlidir. Araştırmacılar bu özelliğinden dolayı terapötik potansiyelini görmek amacıyla öncelikle yüksek oranda anthocyanin içeren petunyalara elde etmek istemişlerdir (Anthocyanin, yapısında mor pigment olması ve *chs* enzimi ile bunun ifadesinin artmasından ötürü bitkiler daha mor renkte olmaktadır). Araştırmacılar, sens teknoloji ile daha yüksek oranda *chs* geni ifade ettirmeyi hedefleyerek yaptıkları çalışmada; daha mor petunya elde etme beklentilerinin aksine, beyaz renkli veya alacalı petunyalara elde etmişler (Şekil 1.1) ve bu olaya “co-suppression” (birlikte baskılama) adını vermişlerdir. (Jorgensen ve ark., 1996).



Şekil. Petunyada *chs* geninin beklenen aşırı ifadesinin aksine gen sessizleşmesi sonucu daha beyaz petunyalara elde edilmesi (Şekil, Fire’in 2007 senesinde yapmış olduğu derlemeden modifiye edilmiştir.)

RNAi’nin net ortaya konması ve bilim çevreleri tarafından kabul edilmesi 2000’li yılların başlarına denk gelmektedir. Nitekim RNAi “Science” dergisi tarafından 2001 senesinde “yılın molekülü” ve 2002 senesinde ise “yılın en önemli bilimsel hamlesi” seçilmiştir. Bu olayların arkasında hiç şüphesiz Andrew Fire ve Craig Mello’nun 1998 senesinde bir parazit olan *C. elegans*’ta RNAi varlığını ortaya koymaları çok büyük etkidir. Bu başarıları sayesinde araştırmacılar 2006 senesinde Nobel Tıp ödülüne layık görülmüşlerdir. Fire ve Mello *C. elegans*’ı şeffaf olması ve yapılan transgenetik çalışmalarının rahat izlenebilmesinden dolayı seçmişlerdir. Sens ve antisens RNA’nın sinerjistik etkinliğini test etmek amacıyla *C. elegans*’a dsRNA (*unc-22*) enjekte ederek, gen ekspresyonunda etkisi olup olmadığını araştırmışlardır. Bu doğrultuda sens ve antisens RNA’nın birlikte kullanımıyla, tek başlarına yapılan

uygulamaya göre çok daha fazla verim alındığını, bu sinerjistik etkinin antisens uygulamaya göre 10 kat daha çok etkili olduğunu belirtmişlerdir. *C. elegans*'ın kas kasılma hareketlerini düzenleyen *unc-22* geninin belli bir segmentine dsRNA enjekte etmeleri sonucu daha yüksek kas hareketleri sağlamışlardır. Bunun yanında kas proteinini kodlayan genden (*unc-22*) yoksun (knock-out) *C. elegans*ta fenotipik olarak gözlemlenen kasılma yeniden tespit edilmiştir. Bu sayede nematodtan insana birçok ökoryatik hücre barındıran canlıda RNAi mekanizması ortaya konmuştur (Fire, 2007).

Hayvanlar ve tüm ökaryotlarda RNAi mekanizmasının başlangıç noktası 21-25 nükleotidlik küçük çift iplikli RNA (dsRNA)'nın oluşumudur. Küçük dsRNA'lar orijinine ve fonksiyon yerlerine göre 3'e ayrılır. Bu küçük dsRNA'lar endojen karakterdeki "miRNA" (mikro RNA), "piRNA" (piwi ilişkili RNA)'lar ve ekzojen karakterdeki "siRNA" (küçük interferenzli RNA)'lardır. miRNA'lar bütün ökaryot hücrelerinde gen regülasyonunda görev almaktadır. piRNA, üreme ve kök hücrelerinde, miRNA'ya benzer bir görev üstlenir. siRNA ise endojen karakterdeki diğer küçük RNA'lardan ayrı, ekzojenik olarak (viral genom, transpozon, vb.) köken alabilir. 21- 25 nükleotidlik küçük dsRNA'nın oluşumu için dsRNA'nın bir dizi işlemde geçmesi gerekmektedir.

dsRNA, hücre çekirdeğinde, yapısında Ribonükleaz III türü bir enzim barındıran mikroprosesör kompleks (Drosha) ile 60 - 70 nükleotidlik küçük RNA fragmanları haline getirilir. Oluşan bu fragmanlar küçük dsRNA'ların prekürsörleridir. miRNA prekürsörleri için "pre-miRNA", siRNA prekürsörleri için ise genellikle "pre-shRNA" (short hairpin RNA=kısa saç tokası RNA) terimleri kullanılır. Pre-miRNA/pre-shRNA çekirdek zarında bulunan Exportin 5/RAN-GTP yardımıyla sitoplazmaya geçer (Kim, 2009).

Sitoplazmaya gelen pre-miRNA/pre-shRNA, RISC (RNA- induced silencing complex) adı verilen protein kompleksi tarafından işleme tabi tutulur. RISC bünyesinde çeşitli proteinler (AGO, RBP;RNA bağlayan proteinler vb.) ve enzimler (RdRP; RNA bağımlı RNA polimeraz vb.) ihtiva eder. RISC prosese katılmadan önce, RNaz III sınıfı bir enzim olan Dicer, çekirdekten gelen pre-miRNA/pre-shRNA'yı 21-25 nükleotidlik kısımlara ayırır. Daha sonra elde edilen bu 21-25 nükleotidlik RNA fragmanlarını RISC'e taşır. Bu işlemin ardından bir RISC bileşeni olan Argonat Proteinleri (AGO) devreye girer. AGO proteini çift iplikli miRNA/siRNA'nın tek iplikli miRNA/siRNA'ya dönmesi sırasında susturum yapacak olan tek iplikli miRNA/siRNA'nın seçimini yapar. Bu seçimin termodinamik bağlanma stabilitesi ve Dicer tarafından kesilen miRNA/siRNA asimetrik yapısından ileri geldiği düşünülür. Ayrıca çift iplikli miRNA/siRNA'nın ayrılmasını sağlayan enzimin RISC bünyesinde bulunan RNaz H enzimi olduğu da düşünülmektedir. AGO proteini tarafından gerçekleşen bu bağlanma ve tek iplikli miRNA/siRNA oluşumunda başka proteinler de görev yapmaktadır (dsRBP; çift iplikli RNA binding protein: memelilerde bağlanma proteini olan R2D2, *Drosophila*'da ise Loquacious gibi). Bunun yanında RISC bünyesinde halen tam olarak görevi bilinmeyen ve isimlendirilememiş bir takım aksesuar proteinlerde söz konusudur. AGO'nun bünyesine katılan ve susturum yapacak olan miRNA/siRNA'ya rehber miRNA/siRNA denir. Diğer tek iplikli miRNA/siRNA (yolcu miRNA/siRNA) ise RNaz sınıfı enzimler tarafından parçalanır (Agrawal ve ark., 2003; Wilson ve Doudna, 2013).

AGO proteini rehber miRNA/siRNA ile RISC te bulunur ve bu şekilde susturum yapacakları hedef mRNA'ya bir kompleks şekilde ulaşırlar. Susturum yapacak olan miRNA ve siRNA

burada işlemsel farklılık gösterirler. Rehber miRNA'da 5' ucunda 2-8. nükleotidlere denk gelen kaynak bölge (seed region), hedef mRNA'yı tanıyarak ve tam bir karşılıklı baz eşleşmesi olmadan gen bölgesini kapatır. siRNA'da ise hedef mRNA'nın kapatılacak bölgesindeki sekansla rehber siRNA'nın tam bir uyum göstermek zorundadır. Rehber miRNA'yı barındıran RISC ve hedef mRNA birleşerek sitoplazmada P-cisimciği (Processing Bodies) meydana getirirler. P cisimciğinde bulunan birçok protein ve enzim yardımıyla transkripsiyonel baskılanma ya da mRNA'nın degradasyonu meydana gelir. Fakat, bazen hedef miRNA bu aşamada istenilen sessizleşirmeyi sağlamayabilir, bunun sonucu da mRNA transle olabilir. siRNA ise hedeflenen gen bölgelerini baz eşleşmelerinde tam bir uyum olması sayesinde kapatır ve mRNA'nın translasyonu sonucu kapanan bölgelere ait genlerin ifade olmadığı görülür. siRNA böyle bir uyum ile susturum yaptığı için sadece spesifik genin ifadesini engeller (Agrawal ve ark., 2003; Wilson ve Doudna, 2013).

Antiviral RNA İnterferenz

RNA interferenzin antiviral mekanizması ilk olarak bitkilerde ve omurgasızlarda ortaya konmuştur (Feinberg ve Hunter, 2003). Bütün RNA virüsleri (retrovirüsler hariç) bitki ve omurgasızlarda uzun dsRNA'lar meydana getirir. DNA virüsleri da benzer bir transkripsiyonel yolla dsRNA meydana getirirler. Yalnız aralarında DNA kökenli dsRNA'larla hem daha uzun hem de daha tamamlayıcı olmasından ötürü farklılık vardır. İleri aşamada bu gibi uzun dsRNA'lar Dicer enzimi ile 22 bp'lik fragmanlara ayrılıp, bir kısa dsRNA havuzu oluştururlar. Oluşan 22 bp'lik dsRNA'lara siRNA dubleksleri denir. siRNA dublekslerinin oluşumunda, Dicer enzimi tarafından yapılan bu ayırma işlemi bakımından, miRNA oluşumu ile benzerlik vardır. Bundan sonraki aşamada ise miRNA'da olduğu gibi siRNA dubleksini oluşturan iplikler ayrılır ve tek ipliği RISC'e bağlanarak rehber iplik olarak mRNA'ya bağlanır. Burada hedef olan mRNA'lar, viral mRNA'lar ve/veya genomik RNA'lardır. RISC'in bağlanmasıyla mRNA'da bölünme veya degradasyon meydana gelir. Böylece viral replikasyon inhibe edilebilmektedir. Bitkiler ve nematodlarda bu antiviral mekanizmaya ek olarak bir ikinci siRNA etki dalgası mevcuttur. Bunu da sağlayan Dicer aşamasının iki bölümlü olmasıdır. Böylece iki defa Dicer işlemine giren dsRNA antiviral etki bakımından da daha güçlü olur. Çünkü Dcr -1 enzimi daha kısa dsRNA'ları işlerken, Dcr-2 uzun dsRNA'ları işler, böylece mRNA degradasyonu için daha uyumlu sekansa sahip siRNA oluşumu sağlanır (Aoki ve ark., 2007). İnspektlerde (özellikle *Drosophila*) ise bu antiviral etki artırma mekanizması bitki ve nematodlarla aynı şekilde ilerlemez. İnspektlerde antiviral mekanizmanın artması virüsle enfekte hücrelerden serbest kalan viral dsRNA'ların bu prosese girişi ve yoğunluğuna bağlıdır, böylece efektif bir antiviral etki artışı söz konusu olabilmektedir (Saleh ve ark., 2009).

Günümüzde, IFN mekanizması yanında memelilerde önemli bir moleküler pasif immunizasyon sağladığı düşünülen RNAi ön plana çıkmaktadır. Maillard ve ark. (2013) ve Li ve ark. (2013) bu konu hakkındaki araştırmalarına kadar, birçok çalışmada memeli hücrelerinin kendi yapısında bir RNAi mekanizması meydana getiremediği ve buna bağlı olarak siRNA'lar oluşturamadığı görüşü hakimdi. Bu düşünce ilk olarak Pfeffer ve ark. (2005) yaptığı geniş bir çalışmada ortaya atılmış, deney hayvanları kullanarak 9 farklı viral etkenle yapılan enfeksiyonların hiçbirinde viral miRNA ya da siRNA oluştuğu görülmemiştir. Bu çalışmayı destekleyen makalelerin birinde ise (Tam ve ark., 2008) birçok virus ile enfekte edilen memeli somatik hücresindeki siRNA ekspresyonu izlenmiş, ancak herhangi bir virüsle karşılaşılan spesifik siRNA saptanamamıştır. Babiarsz ve ark., (2008) in vitro ortamda fare oositlerinde ve

embriyonik kök hücrelerinde klonlanan endojen siRNA'ların, in vivo olarak farelere verildiğinde hücrede Dicer prosesine girip siRNA oluşturduğu ortaya konulmuştur. Maillard ve ark., (2013) ve Li ve ark., (2013)'ünün yaptığı çalışmalarda ise memelilerde intrinsik antiviral RNAi varlığından bahsedilmekte ve IFN mekanizması ile etkileşimli çalıştığı öne sürülmektedir. Bu çalışmalarda farelerden elde edilen farklılaştırılmış embriyonik kök hücreler (mESCs) Nodamuravirus (NoV) ile enfekte edilmiş, NoV tarafından kodlanan B2 RNAi supresör proteininin, vahşi tip NoV (WT-NoV) çoğalmasında Dicer proteinini baskılamıştır. Denedeyde; B2 geni knock-out yöntemiyle tamamen susturulmuş NoVB2 ile etkinliği farklılaştırılmış NoVmB2 ile WT-NoV antiviral etkinliği bakımından karşılaştırılmıştır. Sonuçta NoVB2 ve NoVmB2 verilen 7 günlük süt emen farelerde antiviral yanıt olarak RNAi oluşurken IFN mekanizması çalışmamıştır ve bu durum, antiviral RNAi mekanizmasının baştan düşünülmesine yol açmıştır. Araştırmacılar, aslında RNAi ve IFN temelli iki antiviral mekanizma olduğunu ancak hangi durumlarda nasıl kendi aralarında bir düzenleme yaptıklarının halen soru işaretleri barındırdığını belirtmektedirler. Li ve ark. (2013) da, FHV ve NoV etkenlerine karşı verilen antiviral RNAi yanıtının; meyve sineği, nematod ve memelilerde benzer olmasına odaklanarak memelilerde, antiviral RNAi varlığının olabileceğine dikkat çekmiştir. Ayrıca SRS proteinlerinin bitki ve omurgasızlardaki gibi memelilerde oluşu, pasif antiviral RNAi mekanizmasının varlığını desteklemektedir.

2015 yılında Avrupa Birliği 7. Çerçeve Programında desteklenen önemli projelerden biri de RNAi mekanizmasının memelilerde antiviral olarak görev yapıp yapmadığının tam olarak kanıtlanmasına yöneliktir (The interplay between innate immunity and RNA interference in mammals, http://cordis.europa.eu/project/rcn/188197_en.html).

Memelilerde antiviral RNA interferenz varlığı halen net olmamasına karşın, memeli hücrelerinde saptanan bazı miRNA'ların antiviral immunitede görev aldığı saptanmıştır. Örneğin; daha önce keşfedilen ancak hücredeki görevi bilinmeyen miR-29'un IL-21 uyarımına neden olduğu ve STAT-3 yolağıyla interferon sistemini harekete geçirerek antiviral immunité sağlandığı saptanmıştır (Adoro ve ark, 2015). miR-132'nin antiviral immuniteyi regüle etmesinin yanısıra, tümör proteinleri üzerinde de supressor etki gösterdiği belirtilmiştir (Lagos ve ark., 2010).

Günümüzde miRNAların görevleri ve viruslarla olan ilişkileri halen araştırılmakta ve güncelliğini korumaktadır. Araştırmacılar ekzojen siRNA ya da shRNA dizaynı ile Viroloji alanında birçok virusun replikasyonunu engellemeye yönelik çalışmalar yapmıştır.

Bazı viral hastalıklara karşı uygulanan Antiviral RNAi Terapileri

İn vitro ortamda RNAi mekanizmasından faydalanarak, kedilerde önemli enfeksiyonlardan olan ve Retroviruslar içinde yer alan Feline Leukemi Virus (FeLV)'un etkinliği önlenmeye çalışılmıştır (Ornelas ve ark., 2012). Çalışmada FeLV gag genine karşı eksprese olan shRNA (short hairpin RNA: kısa saç tokası RNA) denenmiştir. P27 proteinin inhibisyonu amaçlanarak virusun hücreye tutunma kabiliyetinin engellenmesine çalışılmıştır. Nitekim bu çalışmada dizayn edilen üç shRNA'dan biri, anti-p27 antikorunu üretmiş ve istenilen seviyede koruma sağlanabileceğini göstermiştir. Fakat klinik uygulamalar için çok erken olduğu ve başarının sadece %20'ler civarında olduğunu hatırlatan araştırmacılar, herşeye rağmen FeLV gen terapisinde önemli bir yol alındığı kanaatinde.

Kedilerde bir diğer önemli enfeksiyon etkeni olan Feline Herpesvirus 1'e ait glikoprotein D (gD)'ye karşı in vitro şartlarda (Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK)) dizayn edilen 6 siRNA fraksiyonu denenmiştir (Wilkes ve Kanja, 2009). gD proteini gC proteini ile birlikte herpesvirusların konakçı hücre penetrasyonunda görev yaparlar, yokluğunda penetrasyon oluşmadığından enfeksiyon meydana gelmez. Ayrıca glikoprotein D yüksek antijenik özellik göstermesi ve hemaglutinasyon özelliği olması bakımından FHV-1'in enfektif gücü için önemlidir. FHV-1 ile enfekte CRFK hücrelerine yapılan transfeksiyon sonucu, 6 siRNA partikülünden 2'si yüksek oranda gD'yi susturmuş ve etkisini inhibe etmiştir (Wilkes ve Kanja, 2009).

Siğirilerde önemli verim kayıplarına neden olabilen Bovine Ephemeral Fever Virus (BEFV)'a karşı da RNA interferenz kullanılarak yapılan çalışmada BEFV'in yapısında bulunan ve yüksek antijenik karakter gösteren glikoprotein G'ye karşı araştırmacıların tasarladıkları 5 siRNA partikülünden 2'si ile bu glikoproteinin in vitro ortamda susturulması başarılmıştır (Chuang ve ark., 2007). BHK-21(Baby Hamster Kidney -21) hücresinde BEFV'nun meydana getirdiği sitopatojenik etkiyi azaltmış veya yok etmişlerdir (Chuang ve ark., 2007). Araştırmacılar yeterli optimizasyon sağlanabildiğinde BEFV için yeni bir aşı veya tedavi şekli geliştirilebileceğini vurgulamışlardır.

Şap Hastalığı için de gen susturma mekanizması kullanılarak antiviral etki denenmiştir. 7 serotipin 3D ve 2B1 bölgelerine karşı 2 adet siRNA dizayn edilmiştir. Bu iki gen bölgesi sırasıyla, biri yapısal proteini iken, diğeri de viral replikasyondan sorumludur. Plazmid bazlı transfeksiyon ardından BHK-21 hücrelerinde sitopatojenik etki azalmıştır. Ayrıca geçici olarak 48 saatlik periyotta dizayn edilen siRNA'lar etkisini kaybetmemiştir. Yapılan titrasyon testiyle de kontrole göre daha düşük titrede kaldığı araştırmacılar tarafından görülmüştür (Pengyan ve ark., 2008).

Ülkemizde ve dünyada yaygın olarak görülen ve siğirilerde yüksek verim kaybına neden olan BVDV enfeksiyonuna karşı da antiviral RNAi mekanizmasından faydalanmak suretiyle enfeksiyonun engellenmesi amaçlanmıştır. Lambeth ve ark. (2007) yaptığı çalışmada sitopatojen BVDV (cpBVDV) suşunun 5' UTR ile N^{pro}, C, NS4B ve NS5A proteinlerini kodlayan bölgelerine hedefli siRNA/shRNA'lar tasarlayarak bu enfeksiyonu in vitro ortamda inhibe etmeyi düşünmüşlerdir. Çalışmanın sonunda deneme başında tespit edilen DKID₅₀ ile siRNA/shRNA transfeksiyonu sonrası değeri karşılaştırılmış, siRNA'lar ortalama DKID₅₀'yi 10 ila 25 kat oranında azaltırken, shRNA 6,5 ila 10 kat oranında azalttığı tespit edilmiştir.

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats)

CRISPR/Cas mekanizması son yıllarda ortaya çıkan bir teknik olmasının yanında, günümüzde en çok kullanılan gen düzenleme metotlarının başında gelmektedir. Bu sistemle ilgili son 5 yıldır yoğun çalışılmakla birlikte, geçmişi RNAi'nin keşfi kadar eskidir. 1987 yılında Japon bilim insanı Yoshizumi Ishino tarafından *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinde bu mekanizmanın varlığı ortaya konulmuş, ancak görevinin ne olduğunu saptanamamıştır. Palindromik tekrarları fark eden bir başka bilim insanı Mojica ise, mekanizmanın bugünkü adını biyoteknoloji literatürüne kazandırmıştır (Lander, 2016).

CRISPR/Cas, prokaryotlarda ve arkealarda hücreye giren yabancı genomların tanınarak kendi genomları üzerinde değişikliğe mahal vermeden uzaklaştırılması işleminin genel adıdır. Prokaryotların bu mekanizmayı en fazla virusları ve fajları

uzaklaştırmak için kullanıyor olması, özellikle dikkat çekmiştir. RNAi mekanizmasına benzeyen CRISPR işleminde amaç; protein sentezi başlamadan önce herhangi bir istenmeyen gen bölgesinin prokaryotik veya arkeatik genom yapısında barındırılmamasıdır. CRISPR mekanizmasında görev alan temel komponentler şunlardır (Barrangou ve ark., 2015):

Cas (CRISPR-associated proteins)	sgRNA (single guide RNA)
PAM (Protospacer adjacent motifs)	Tamir Kalıbı (Repair Template); HDR (homology direct repair) ya da NHEJ (non-homologous end joining)
crRNA (CRISPR RNA)	
tracrRNA (trans-activating RNA)	

Bakteri ve arkea genomlarının önemli bir kısmını teşkil eden (Bakteride %45; Arkeada %85) CRISPR mekanizması; prokaryotik ya da arkeatik genom üzerinde yer alan boşluklara, bu mikroorganizmaları enfekte eden virusların, transposable elementlerinin veya yabancı genom ürünlerinin uygun parçacıklar haline getirilerek entegre edilmesi ve daha sonra tanınabilen bu yabancı genomların çift zincir kırılması (Double Strand Break) DSB olayını takiben DNA tamir mekanizmasıyla sözü geçen konakçı genomunun bütünlüğünün korunmasının sağlanmasıdır (Grissa ve ark., 2007).

CRISPR mekanizması, Cas proteinlerinin farklılığına, CRISPR bölgelerinin çokluğuna ve CRISPR/Cas sisteminin horizontal transfer yoğunluğuna göre 3 sınıfa ayrılmıştır. Tip-1, -2 ve -3 olarak sınıflandırılan CRISPR sisteminde en öne çıkmış ve antiviral olarak en çok çalışılan Tip-2 türüdür. Laboratuvar ortamında dizayn edilen sgRNA'lar (single guide RNAs), tracrRNA ve crRNA'lar ile kombine edilerek ekzojen anlamda CRISPR'ı uyarmak için plasmid ya da viral vektörle bakteriyeye gönderilir. Aynı doğal bir virus veya faj enfeksiyonunda olduğu gibi mekanizma bahsi geçen sgRNA'ları inerferenz işlemine hazırlar (Rath ve ark., 2015). Ekzojen olarak kimerik sgRNA ile indüklenen mekanizma "CRISPRi" adını alır.

Tüm CRISPR mekanizmalarının işleyişinde 3 temel bölüm mevcuttur. Bunlar; elde etme (Acquisition), crRNA işlemi (crRNA processing) ve İnterferenz (Interference)'dir. Tip-2 üzerinden CRISPR işleyişinden bahsedecek olursak; bakteriyeye giren yabancı genom (ör. Virus genomu) önce boşluklara uygun ara genom parçaları haline getirilir. Bu işlemi bir nevi nükleaz ve helikaz türü enzimler olan Cas 1 (genoma entegrasyonu sağlayan integraz özelliği de mevcuttur) ve Cas 2 tarafından gerçekleştirir. Bu ilk aşamaya Elde etme (acquisition) veya ara parça kazanımı (spacer acquisition) denir. Bu ara parça crRNA işlemi sırasında "Protospacer" adını almaktadır. Bunun nedeni ise elde etme işlemi sırasında kesimin gelişigüzel bir şekilde olmayıp, ara parçacığın boyutlarını ve özelliğini belirleyen 3-5 nükleotitlik PAM (protospacer adjacent motifs) bölgesine göre kesim işleminin yapılmasıdır (Rath ve ark., 2015).

Genoma yerleştirilen yabancı parçalar transkripsiyon sırasında tracrRNA'ların bağlanması ile çift iplikçikli RNA halini alır. Çift iplikçik yapısı Cas9 ve RNaz III enzimi ile ayrılarak tek iplikçik RNA haline yani crRNA'lara dönüşür. İnterferenz meydana getirecek olan crRNA'lar Cas proteinlerine bağlı olarak hedef gen bölgesinde degradasyon meydana getirir. Bu genelde çift iplikçik yapısının kırılması şeklinde olur.

CRISPR interferenzi (CRISPRi) sonrası genom DNA tamir mekanizması ile düzenlenir ve yabancı genom tamamen bertaraf edilir. DNA tamiri genelde 2 şekilde meydana gelir

ki bunlar: Homology Directed Repair (HDR) ya da Non-Homologous End Joining (NHEJ) mekanizmalarıdır. (Barrangou ve ark., 2015).

Bakterilerde antiviral mekanizması olduğu bilinen CRISPR, RNAi çalışmalarına benzer şekilde virusun üremesini engelleyici çalışmalar yapılmıştır. Ancak henüz veteriner viroloji anlamında yaygın bir çalışma mevcut olmayıp, laboratuvar ortamında in vitro ve in vivo olarak hayvan modellemeleri üzerinden bu çalışmalar sürdürülmektedir. Bu mekanizma sadece antiviral anlamda değil, kanser, genetik bozukluklar, otoimmün hastalıklar gibi tedavisi kısıtlı birçok hastalık için de denemeler yapılmaktadır.

CRISPR tüm biyoteknoloji alanında uygulaması giderek yaygınlaşsa da halen en büyük uygulama alanı viruslara karşı mücadeledir. Barrangou ve ark. (2007)'nin yaptığı çalışmada, Kanada'da peynir üretimi yapan bir firmanın kültür olarak kullandığı bakterilerde (*Streptococcus thermophilus*), viruslara karşı direnç kazanmada CRISPR, mekanizmasının oldukça gelişmiş olduğu saptanmıştır.

RNAi ve CRISPR arasındaki temel farklılıklar

Hem RNAi hem de CRISPR genomda düzenleme yapmamızı sağlayan çok değerli genetik araçlardır. Ancak bu iki genom düzenleme metodunun bazı farklılıkları söz konusudur.

Moleküler sonuç açısından: RNAi sadece susturum sağlarken (knock-down), CRISPR, istenmeyen genomun tamamen uzaklaştırılmasını sağlar (knock-out). Bu yüzden CRISPR daha yüksek oranda DNA genomunda değişiklik meydana getirir. Araştırmacılar ekzojen karakterde oluşturdukları sgRNA+dCas9 kompleksi ile hedeflenmesi CRISPRi mekanizmasını kullanmışlardır. Böylece RNAi'de ki gibi geçici, kısmi ve reverzibilite etki sağlanmıştır.

Etkinlik olarak; siRNA ile meydana getirilen interferenz 2-7 gün aralığında etkinlik gösterir. CRISPR'da ise etkinlik kalıcıdır. Ancak günümüzdeki ilaçların etkinliğinin geçici olduğu göz önünde bulundurulursa, genom düzenlemeye yönelik dizayn edilecek yeni nesil ilaçların etkinliğinin de öncelikle geçici olması araştırmacılar tarafından arzu edilmektedir. Çünkü genom düzenleme ile yapılan tedavinin uzun dönemde yüksek canlılar üzerinde nasıl bir etki meydana getireceği net değildir. Diğer yandan, dizayn edilen sgRNA'lar, siRNA'larda olduğu gibi hedef dışı bağlanması oldukça düşüktür. Çünkü sgRNA'lar transkripsiyon sırasında DNA'yı hedefler ve translyasyon sonrası hedeflenen başarı oldukça yüksektir. siRNA'lar ise mRNA'yı hedefler, bu sırada hücrede protein sentezinde görev alan endojen miRNA, non-coding RNA (nc-RNA)'larda interfere edilebilir ve istenmeyen etkiler ortaya çıkabilir.

Uygulanabilirlik olarak ise; RNAi günümüz teknolojiyle CRISPR'a göre hem maddi hem de iş yükü anlamında daha avantajlıdır. CRISPR, RNAi'de olan transfeksiyon ve transdüksiyon olaylarının yanı sıra, verifikasyon ve açılım adımlarını da içermektedir. Zaman anlamında da daha fazla vakit alan bir uygulamadır. Bu farklılıklar, RNAi ve CRISPRi'nin seçiminde araştırmacının hedefini baz alması esasını ortaya çıkarmaktadır.

Sonuç

Hem RNAi hemde CRISPR gen ifadesinin spesifik ve güçlü bir şekilde susturulması için farklı hücre türlerinde bulunan ve evrimsel olarak muhafaza edilmiş en önemli gen regülasyon mekanizmalarıdır. Yakın zamanda tanımlanmış olmalarına rağmen biyoteknoloji ve tıp alanında oldukça geniş bir araştırma

alanı bulmuşlardır. RNAi ve CRISPR mekanizmalarının en çok uygulandığı ve ileride uygulanacağı alanlar oldukça fazladır ki bunlar; kanser biyolojisi ve tedavisi, yeni nesil antivirallerin geliştirilmesi, nörolojik hastalıklara karşı tedavi seçenekleri sunulması, gen regülasyon bozukluklarının tedavisi ve ziraatte zararlılar ile mücadele, yeni nesil pestisit, insektisit geliştirilmesi olarak sayılabilmektedir.

RNAi'nin keşfi tarihsel açıdan daha eski olmasından ötürü daha çok çalışılmış ve birçok veri elde edilerek nasıl bir yol izlenmesi gerektiği bilinci daha yüksektir. CRISPR ise çok yeni kullanılan bir mekanizma olmasına karşın RNAi'den kazanılan tecrübelerle daha hızlı ilerlemeler kaydedeceği aşikardır. Yakın gelecekte, bu iki mekanizma ile araştırmacılar virüsler başta olmak üzere birçok patojene ve hastalık etkenine karşı daha etkin biyolojik silahlara sahip olacaklardır.

Kaynaklar

- Adoro S, Cubillos-Ruiz JR, Chen X, Deruaz M, Vrbanac VD, Song M, Park S, Murooka TT, Dudek TE, Luster AD, Tager AM, Streeck H, Bowman B, Walker BD, Kwon DS, Lazarevic V and Glimcher LH (2015). IL-21 induces antiviral microRNA-29 in CD4 T cells to limit HIV-1 infection. *Nat. Commun.*, 6:7562 doi: 10.1038/ncomms8562.
- Aoki K, Moriguchi H, Yoshioka T, Okawa K and Tabara H (2007). In vitro analyses of the production and activity of secondary small interfering RNAs in *C. elegans*. *The EMBO journal*, 26(24): 5007-5019.
- Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK, Mukherjee SK (2003). RNA interference: Biology, Mechanism, and Applications. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4): 657.
- Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & development*, 22(20): 2773-2785.
- Bagasra O, Prilliman KR (2004). RNA interference: The molecular immune system. *J. Mol. Hist.* 35: 545-553.
- Barrangou R, Birmingham A, Wiemann S, Beijersbergen RL, Hornung V and van Brabant Smith A (2015). Advances in CRISPR-Cas9 genome engineering: lessons learned from RNA interference. *Nucleic acids research*, doi: 10.1093/nar/gkv226.
- Chuang ST, Ji WT, Chen YT, Lin CH, Hsieh YC, Liu HJ (2007). Suppression of bovine ephemeral fever virus by RNA interference. *J. Virol. Met.*, 145(1): 84-87.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669): 806-811.
- Fire AZ (2007). Gene Silencing by Double-Stranded RNA (Nobel Lecture). *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46: 6966 – 6984.
- Feinberg EH and Hunter CP (2003). Transport of dsRNA into cells by the transmembrane protein SID-1. *Science*, 301(5639): 1545-1547.
- Gaj T, Gersbach CA and Barbas CF (2013). ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in biotechnology*, 31(7), 397-405.
- Grissa I, Vergnaud G and Pourcel, C. (2007). CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. *Nucleic acids research*, 35(suppl 2), 52-57.
- Jorgensen RA, Cluster PD, English J, Que Q and Napoli CA (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant molecular biology*, 31(5), 957-973.
- Kim VN, Han J, Siomi MC (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 10(2): 126-39.
- Lagos D, Pollara G, Henderson S, Gratrix F, Fabani M, Milne RS, Gotch F and Boshoff C (2010). miR-132 regulates antiviral innate immunity through suppression of the p300 transcriptional co-activator. *Nature cell biology*, 12(5), 513-519.
- Lambeth LS, Moore RJ, Muralitharan MS and Doran TJ (2007). Suppression of bovine viral diarrhoea virus replication by small interfering RNA and short hairpin RNA-mediated RNA interference. *Veterinary microbiology*, 119(2), 132-143.
- Lander ES (2016). The Heroes of CRISPR. *Cell*, 164(1), 18-28.
- Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, and Ding SW (2013). RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science*, 342(6155): 231-234.
- Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, Li Y, Jay F, Ding SW, Voinnet O (2013). Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science*, 342(6155): 235-238.
- Ornelas SS, Barra GB, Kanzaki LIB (2012). Inhibition of feline leukemia virus replication in chronically infected cell line utilizing RNA interference. *Retrovirology: Res. Treat.*, 14: 13-20.
- Pengyan W, Yan R, Zhiru G, Chuangfu C (2008). Inhibition of foot-and-mouth disease virus replication in vitro and in vivo by small interfering RNA. *Viol. J.*, 5: 86.
- Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, Sheridan R, Sander C, Grässer FA, van Dyk LF, Ho CK, Shuman S, Chien M, Russo JJ, Ju J, Randall G, Lindenbach BD, Rice CM, Simon V, Ho DD, Zavolan M, Tuschl T (2005). Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nature methods*, 2(4): 269-276.
- Rath D, Amlinger L, Rath A and Lundgren M (2015). The CRISPR-Cas immune system: Biology, mechanisms and applications. *Biochimie*, 117:119-128.
- Saleh MC, Tassetto M, Van Rij RP, Goic B, Gausson V, Berry B, Jacquier C, Antoniewski C, Andino R (2009). Antiviral immunity in *Drosophila* requires systemic RNA interference spread. *Nature*, 458(7236): 346-350.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hannon GJ (2008). Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature*, 453(7194), 534-538.
- Wilkes RP, Kania SA (2009). Use of interfering RNAs targeted against feline herpesvirus 1 glycoprotein D for inhibition of feline herpesvirus 1 infection of feline kidney cells. *Am. J. Vet. Res.*, 70(8), 1018-1025.
- Wilson RC, Doudna JA (2013). Molecular mechanism of RNA interference. *Annu. Rev. Biophysics.*, 42: 217-239