

GENDEN TEDAVİYE YENİ YAKLAŞIMLAR: KODLAMAYAN NÜKLEİK ASİTLER

New Approaches from Gene to therapies: Non-Coding Nucleic Acids

Hasret Ecevit^{}, Sedat Motor^{**}, Müzeyyen İzmirli^{***}*

**Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Moleküler Biyokimya ve Genetik AD, Hatay*

***Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Hatay*

****Mustafa Kemal Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD, Hatay*

Özet

Posttranskripsiyonel (transkripsiyon sonrası) gen susturma (PTGS) olarak da adlandırılan RNA interferans, RNA molekülünün, spesifik mRNA molekülünün yıkımına sebep olarak, gen ekspresyonunu inhibe ettiği biyolojik bir süreçtir. 2006 yılında, Andrew Fire ve Craig Mello, *Caenorhabditis elegans* nematodunda 'Ribonükleik asit interferansı' (RNAi) üzerine yaptıkları çalışma ile (1998 yılında yayınlanan) Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel ödülüne layık görüldüler. Gen ifadesinin susturulmasını sağlayan RNAi yolları, small interfering RNA (siRNA), mikro RNA (miRNA), ribozim ve antisens oligonükleotitler adı verilen küçük, protein kodlamayan ve gen ifadesinin negatif düzenleyicisi olan RNA ve DNA parçacıklarının aracılığıyla gerçekleşmektedir. Son yıllarda, bu küçük RNA ve DNA dizileri biyolojik araştırmalarda gen susturulması için kullanılan çok güçlü bir yöntem haline gelmiştir. Bu derlemede, RNAi yolağında kilit rol oynayan moleküllerin mekanizmasına değinerek RNAi hakkında okuyucunun bilgilendirilmesi amaçlanmaktadır.

Anahtar kelimeler: RNAi, miRNA, siRNA, ribozim, antisens oligonükleotit

Abstract

RNA interference (RNAi) also called post transcriptional gene silencing (PTGS), is a biological process in which RNA molecules inhibit gene expression, typically by causing the destruction of specific mRNA molecules. In 2006, Andrew Fire and Craig C. Mello shared the Nobel Prize in Physiology or Medicine for their work on RNA interference in the nematode worm *C. elegans*, which they published in 1998. It is formed of several different pathways that facilitate gene silencing and negative regulation of expression through non-coding small RNA or RNA particles like small interfering RNA (siRNA), microRNA (miRNA), ribozyme and antisense oligonucleotides. Recently, these small sequences have become a powerful tool for gene silencing in biological studies. The aim of this review is informing the readers about RNAi by explaining the mechanism of molecules which play major role in.

Key words: RNAi, miRNA, siRNA, ribozyme, antisense oligonucleotide

Geliş Tarihi / Received: 10.02.2013, Kabul Tarihi / Accepted: 22.03.2013

Giriş

Post transkripsiyonel (transkripsiyon sonrası) gen susturma (PTGS) olarak da adlandırılan RNA interferans, 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. 1980'li yıllara kadar ribonükleik asitin (RNA) sadece deoksiribonükleik asit (DNA) ve protein sentezi arasında bilgi akışını sağlayan bir aracı olduğu düşünülüyordu. Daha sonra bu yapının katalitik özelliklerinin de bulunması, Tom Cech ve Sidney Altman'a 1989 yılında bir Nobel ödülü getirdi. 2006 yılında Andrew Fire ve Craig Mello, *Caenorhabditis elegans* nematodunda çift sarmallı RNA'nın (dsRNA) 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 (1,2).

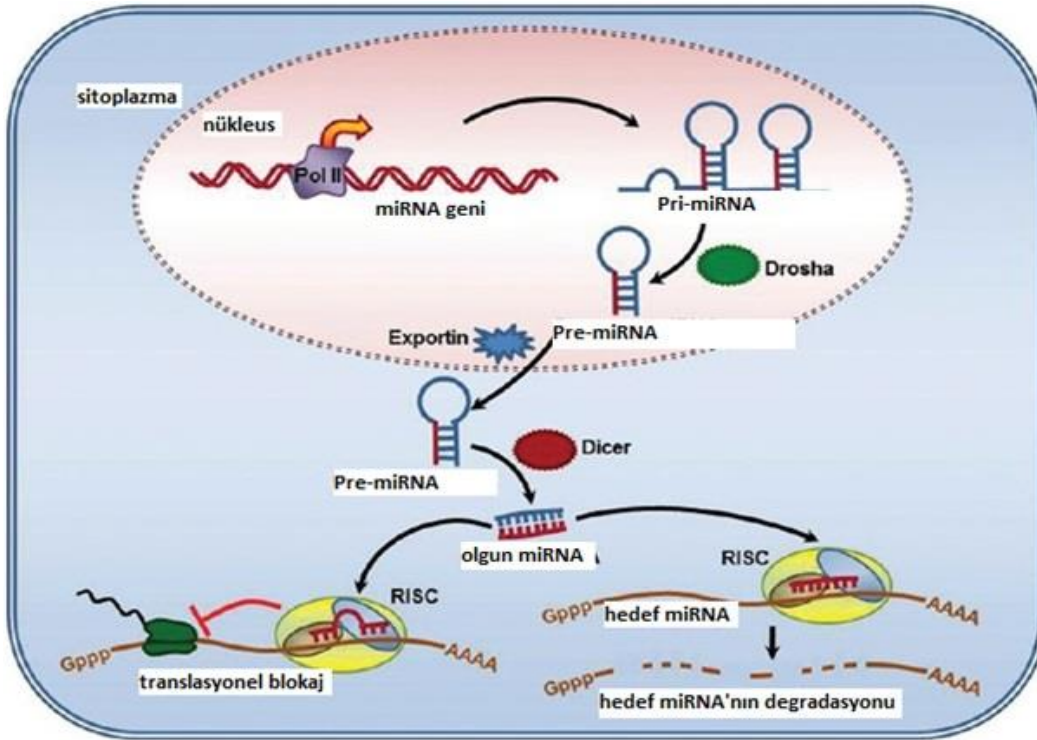
Antisense etki gösteren moleküllerin hedef mRNA'ya bağlanması, genin eksprese olmasını engellemektedir. Bir genin bir hücrede hücrenel bir mekanizmadan dolayı ifade edilmemesine "Knockdown" ya da "Knockout" denir (3). Bu mekanizma mayalardan memelilere kadar tüm ökaryotlarda gözlenmektedir (4). Keşfinden bu yana RNAi alanındaki gelişmeler hızla ilerlemekte ve RNAi moleküler genetik, farmakoloji gibi farklı disiplinlerde yaygın olarak kullanılan bir araç haline gelmektedir.

RNAi mekanizması, antisens etkiyi gösteren moleküller olan miRNA, siRNA, oligonükleotitler ve ribozimler olmak üzere dört ana başlık altında incelenmektedir.

1. miRNA

Hücre içerisinde, genom tarafından RNA polimeraz enziminin katalizlediği reaksiyonla kodlanan çift iplikçikli miRNA'lar, RNAi mekanizmasının temelini oluşturmaktadır. Bu mi-RNA'lar hücre içerisindeki gen susturma kompleksi olan RNA ile indüklenen susturum kompleksini (RISC; RNA-induced silencing complex) aktive edecek özelliğe ulaşabilmek için birtakım aşamalardan geçerler (5). İlk aşamada, RNA bağımlı RNA polimeraz II, kalıp olarak endojen veya ekzojen kaynaklı bir RNA'yı kullanarak çift zincirli RNA molekülünü sentez eder (6,7). Bu yapı intron bölgelerinden saç tokası şeklinde kıvrılıp eşleşir (8). Böylelikle, transkripsiyon sonrası pri-miRNA olarak adlandırılan ilk miRNA molekülü oluşur (9). Daha sonra RNaz III grubu bir endonükleaz olan Drosha, Pri-miRNA molekülüne etki ederek bu kıvrılmış RNA parçasını zincirin geri kalan kısmından ayırır ve pre-miRNA molekülünü oluşturur (9,10). Pre-miRNA eksportin 5 (XPO5) aracılığı ile sitoplazmaya taşınır (5). Bu aşamadan sonra miRNA ve siRNA aynı işlemlerden geçer.

Sitoplazmada bulunan diğer bir RNaz III enzimi olan Dicer, ATP bağımlı bir etkileşim ile RNA'ya bağlanır ve önce RNA'nın ucundaki kıvrımlı kısmı koparır (10). Daha sonra dubleks RNA molekülünü helikaz aktivitesi ile açar ve 21-23 nükleotid uzunluğunda kısa RNA parçacıkları halinde keser (11). Dicer enzimi tarafından bu şekilde oluşturulan RNA'lar daha sonra yine ATP bağımlı bir biçimde RISC'e aktarılır (9). Bu aşamada RISC'in substrat seçiciliğinden sorumlu olan 'argonat' (AGO2; Argonaute) proteinleri çok önemli rol oynar (13). Olgun siRNA veya miRNA zincirinin mRNA ile etkileşimi de RISC kompleksi içinde gerçekleşir. RISC yapısı içinde bulunan substrat siRNA ise, hedef mRNA dizisiyle birebir eşleşir ve mRNA molekülü eşleşme bölgelerinden endonükleazlar ile kesilir (6). Eğer rehber miRNA dizisi hedef mRNA dizisiyle tamamen eşleşirse, AGO2'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), translasyonel bir baskılama olur ve bu, aynı zamanda diziyeye özgü olmayan, P cisimcikleri adı verilen yapıların oluşumuyla mRNA'ların degradasyonuna neden olur (11). Şekil 1'de miRNA mekanizması gösterilmektedir.



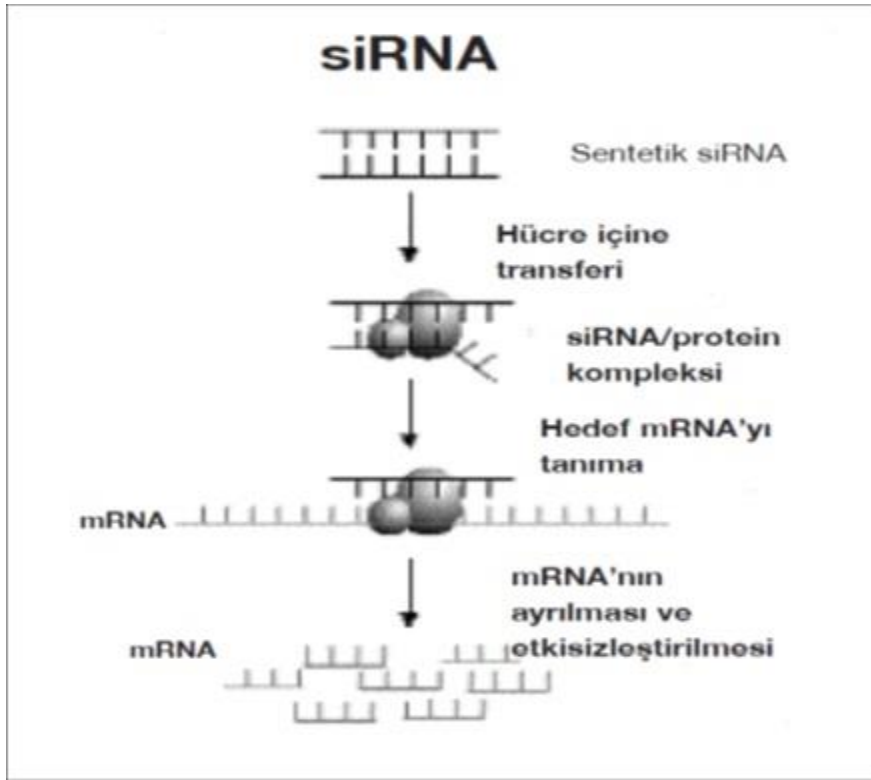
Şekil 1. miRNA mekanizması (12).

2. siRNA

Small interfering RNA yada short interfering RNA olarak bilinen siRNA'lar 20-25 baz çifti uzunluğunda, in vitro sentezlenen çift iplikçikli RNA'lardır (14). Bu RNA'lar hücre içine girdiğinde 'Dicer' enzimi tarafından tanınır ve yaklaşık 21-23 nükleotidlik küçük parçalara

dönüştürülürve bu parçalar, RNA aracılı baskılama kompleksine (RISC) katılır (10).Oluşan kompleks RISC'in hedef mRNA'ya bağlanmasını sağlar. Tüm bu süreçler sonunda RISC'in endonükleaz aktivitesi ile hedef mRNA parçalanır ve transkripsiyon baskılanır (15).

RNAi mekanizmasında yer alan siRNA'ların hedef dizilerle mükemmel eşleşme göstermesi bu yapıları gen çalışmalarında uygun araçlar haline getirir. siRNA'lar kullanılarak istenmeyen bir proteinin ifadesi bastırılabilceği gibi, istenmeyen miRNA'larda engellenebilir (16,17). Bu yapılar lipozom ve benzeri araçlar kullanılarak transfeksiyon işlemi ile hücre kültürüne verilebileceği gibi, doğrudan canlı sistemlere de uygulanabilir (18,19). Plazmid veya viral vektörler aracılığıyla da aktarım yapılabilir (18). siRNA'lar yalın halde aktarılabilecekleri gibi, hedef gen ürününe daha iyi ulaşabilmeleri için kolesterol veya aptamerlerden oluşan bir kuyruk takılı olarak da üretilebilir (20). Ayrıca, siRNA molekülüne bir protamin-antikor kuyruğu eklenebilmekte, o hücre tipine özgü bir proteine karşı geliştirilmiş olan antikoron kullanılmasıyla hedefe daha kolay ulaşması sağlanabilmektedir (20). Şekil 2'de siRNA çalışma mekanizması gösterilmektedir.



Şekil 2. siRNA'nın çalışma mekanizması (21).

Nükleusta DNA tarafından transkribe edildiği 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.

3. Antisense Oligonükleotidler

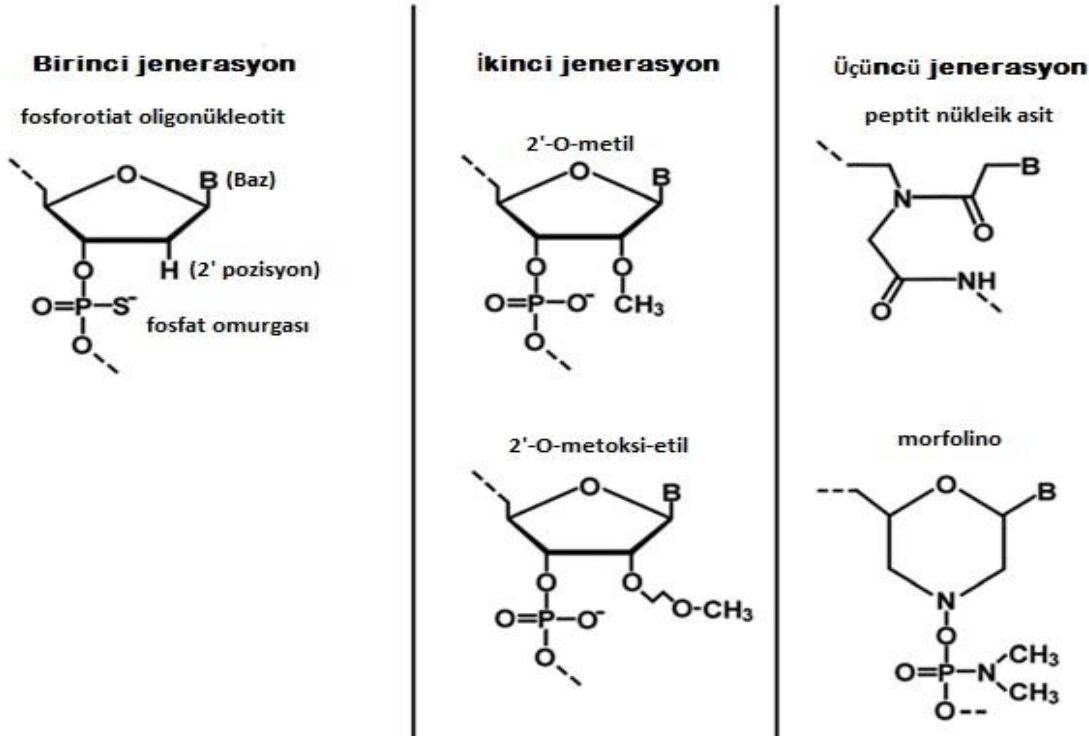
Sentetik oligonükleotitler, bir diğer antisens etkisi olan yapılardır. Antisens oligonükleotitler (ASO) genellikle 15-20 nükleotit uzunluğunda, tek iplikli ve spesifik hedef mRNA molekülüne komplementer olma özelliğine sahip DNA veya RNA iplikleridir. Lipozomlar aracılığıyla in vitro ve in vivo olarak hücre içine verilirler(22).

Antisens oligonükleotitlerin hedef mRNA molekülü ile moleküler baz eşleşmesi RNA-ASO heterodubleks yapısının RNaz-H aracılı olarak bölünmesine ve dolayısıyla translasyonun blokajına sebep olmaktadır (22). Bu yapıların antisens etkisi 1970 yıllarında Zamecnik ve Stephenson tarafından gösterilmiştir. Bu araştırmacılar Rous Sarcoma virusün (RSV) 35SRNA' sının 5' ve 3' uçlu nükleotid sekansını kullanarak viral integrasyonda önemli olarak görünen 21 nükleotidlik tekrarlayıcı sekansları tanımlamışlar ve viral sekansın bir kısmına komplementer olan d(AATGCTAAAATGG)13 mer' lik oligonükleotidi sentezlemişlerdir. Bu oligonükleotit RSV ile enfekte olmuş fibroblast hücre kültürüne verilmiş ve viral üretimin büyük ölçüde inhibe olduğu gözlemlenmiştir (23). ASO'ların hedef mRNA'lara karşı affinitesini sürdürürken, endojen nükleazlara karşı dirençli olup onlara yem olmasını engellemek, ASO'lar üzerinde birtakım modifikasyonlar yapılmasını gerektirmiştir. Dolayısı ile ASO'ların birçok jenerasyonu geliştirilmiştir.

İlk jenerasyon olan fosforotiat oligonükleotit, fosfodiester oligonükleotit ile kıyaslandığında yaklaşık on kat daha fazla serum yarı ömrüne sahip olduğu gözlenmiştir (24). Fosforotiat oligonükleotit, DNA nükleotidlerinde olmayan, RNA nükleotidlerindeki 2'(OH) hidroksil grubu bulduran riboz şekerinin modifiye edilmesiyle elde edilmiş, ribozun fosfat bağlarında köprü oluşturmayan oksijen atomlarından birinin sülfür ile yer değiştirmesiyle oluşturulmuştur (23).

Ribozun 2'(OH) hidroksil pozisyonundan alkillenmesi ile elde edilmiş olan ikinci jenerasyon modifiye ASO'ların, birinci jenerasyon ile kıyaslandığında komplementer mRNA'ya karşı affinitesinin arttığı ancak; 2'-O-metil ve 2'-O-metoksi-etil modifikasyonlarının hedef RNA üzerinde RNaz-H aracılı degradasyonu, uyardığı gözlenmiştir (24). Bu durum, sadece nükleazlara dayanıklılık açısından uygun olan fakat RNaz-H kesimini sağlayamayan 2'-O-alkil modifikasyonuna ek olarak, her iki şartında sağlanması için (hem nükleazlara dayanıklı hem de RNaz-H kesimini sağlayabilen) araştırmacıları antisens formda hibrid bir oligonükleotit oluşturmaya yönlendirmiştir. (23).

Yapay olarak sentezlenen, DNA veya RNA'ya benzeyen bir polimer olan peptidnükleik asit (PNA) ve morfolino içeren üçüncü jenerasyon ASO'lar ise, poliamid bağlantılar yada fosforotiat bağlantılı morfolino parçaları bulunduran bir deoksiriboz omurga ile ifade edilir. Bu ASO'lar RNAaz-H aktivitesini iyileştirmemiştir (3).Şekil 3'te,modifiye oligonükleotitler şematize edilmiştir.



Şekil 3. Modifiye oligonükleotitler (25).

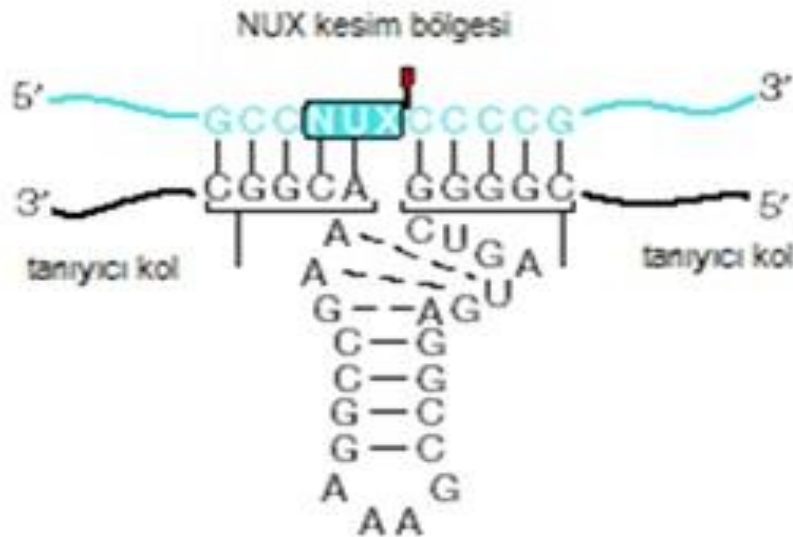
İn vivo gen baskılamada bütün ASO tipleri test edilmemiştir. İlk jenerasyon olan fosforotiat ASO'lar hayvan deneylerinde (26) ve klinik çalışmalarda (3) en yoğun çalışılmış durumda olan oligonükleotitlerdir.

4. Ribozimler

Ribozimler 50-100 nükleotitten oluşmuş tek iplikli RNA molekülleridir. İyi tanımlanmış üçüncül yapısı herhangi bir protein gerektirmeksizin kimyasal reaksiyonları katalizlemesine izin verir (27,28). İlk olarak T.R. Cech, ribozimi *Tetrahymena thermophila*'da doğal olarak meydana gelen bir molekül olarak keşfetmiş ve 1989'da Kimya Nobel Ödülü almıştır (29). Ribozimler fosfodiester bağların hidrolizi, peptid bağı oluşumu (rRNA), ligasyon ve polimerizasyon gibi reaksiyonları katalizlerler (30,31).

Ribozimlerin aracılık ettiği reaksiyonlar multiple-turnover (Enzimler, bir reaksiyonu hangi konformasyonla başlatılırsa, 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. Bu amaçla genellikle, merkezi bir katalitik bölge ve hedef RNA ile komplementer her biri 6-12 nükleotitden oluşmuş iki yan kol ile karakterize olan hammerhead ribozimler kullanılır (32). Hammerhead ribozimler 30-40 nükleotit uzunluğunda RNA molekülleridir. Çekiç gibi olan görüntüleri sebebiyle bu ismi almışlardır. Diğer ribozimler gibi hammerhead ribozimlerde antisens etkiye sahiptir. 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 (33). Dolayısı ile, hammerhead ribozimler, herhangi bir RNA'yı kesmek için dizayn edilebilir. 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 ekspresiyonunu düzenlerler(34). Şekil 4'te ribozimin çalışma mekanizması gösterilmektedir (35).



Şekil 4. Ribozimin çalışma mekanizması

Sonuç olarak, antisens etki gösteren yapıların, komplementer mRNA'yı degrade ederek yada 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

1. 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; 391:806-11.
2. Paulson H, Gonzalez-Alegre P. RNAi gets its prize. Lancet Neurol. 2006; 5:997-9.
3. Kurreck, J. Antisense Technologies. Improvement through novel chemical modifications. Eur J Biochem. 2003; 270:1628-1644
4. Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. Nat Rev Mol Cell Biol. 2003; 4:457-67.
5. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonauts. Nat Chem Biol. 2007;3(1):36-43.
6. 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.
7. Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. Nature. 2004; 431:338-42.
8. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. Annu Rev Pathol Mech Dis. 2009; 4:199-227.
9. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. Proc Natl Acad Sci USA. 2003; 100:5779-84.
10. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. Nature. 2000; 404:293-6.
11. 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; 101:25-33.
12. http://www.pulmonarycirculation.org/viewimage.asp?img=PulmCirc_2011_1_3_357_87301_f2.jpg 05.12.2013.
13. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. Genes Dev. 2002; 16:2491-6.
14. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. Science. 1999; 286(5441):950-2.

15. Aigner A. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: strategies based on the direct application of siRNAs. *J Biotechnol.* 2006; 124(1):12-25.
16. Cowland JB, Hother C, Gronbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS.* 2007; 115:1090-106.
17. Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M. Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs’. *Nature.* 2005; 438:685-9.
18. Morris KV, Rossi JJ. Lentiviral-mediated delivery of siRNAs for antiviral therapy. *Gene Ther.* 2006; 13:553-8.
19. Grimm D, Kay MA. Therapeutic short hairpin RNA expression in the liver: viral targets and vectors. *Gene Ther.* 2006; 13:563-75.
20. Kim DH, Rossi JJ. Strategies for silencing human disease using RNA interference. *Nature Rev Genet.* 2007; 8:173-84.
21. Ozvaran MK. Malign Mezotelyomada Gen Tedavisi. *Toraks Dergisi,* 2004; 5(2):110-115.
22. 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.
23. Zamecnik PC, Stephanson ML. Inhibition of Raus sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. 1978;75:280-4.
24. Zamaratski E, Pradeepkumar PI, Chattopadhyaya J. A critical survey of the structure-function of the antisense oligo/RNA heteroduplex as substrate for RNase H. *J Biochem Biophys Methods.* 2001; 48:189–208.
25. Maeda Y, Sheffield AM, Smith RJ. Therapeutic regulation of gene expression in the inner ear using RNA interference. *Adv Otorhinolaryngol.* 2009; 66:13-36.
26. Dass CR. Liposome-mediated delivery of oligodeoxynucleotides in vivo. *Drug Deliv.* 2002; 9:169–180.
27. Lilley DM. Structure, folding and mechanisms of ribozymes. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005; 15:313-323.
28. Serganov A, Patel DJ. Ribozymes, riboswitches and beyond: regulation of gene expression without proteins. *Nat Rev Genet.* 2007; 8:776-790.
29. 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.

30. Chen X, Li N, Ellington AD. Ribozyme catalysis of metabolism in the RNA world. *Chem Biodivers.* 2007; 4:633-655.
31. Strobel SA, Cochrane JC. RNA catalysis: ribozymes, ribosomes, and riboswitches. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2007; 11:636-643.
32. Opalinska JB, Gewirtz AM. Nucleic-acid therapeutics: basic principles and recent applications. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1:503-514.
33. Kore AR, Vaish NK, Kutzke U, Eckstein F. Sequence specificity of the hammerhead ribozyme revisited; the NHH rule. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26:4116–4120.
34. Akashi H, Matsumoto S, Taira K. Gene discovery by ribozyme and siRNA libraries. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2005; 6(5):413-22.
35. Karaboz I, Çolak C. Antisens Teknolojisi. *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.* 2007; 5(2):14-37.