



RNA İNTERFERANS (RNAi)

Ramazan GÜNDOĞDU¹, Venhar ÇELİK^{1,*}

¹Fırat Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Moleküler Biyoloji Anabilim Dalı, ELAZIĞ

ÖZET

RNA interferans, uygun çift zincirli RNA'nın hücreye girdiği zaman, endojenik komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açan, transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır. RNA interferans, Dicer adı verilen bir RNase III enzimi tarafından çift zincirli RNA'nın küçük engelleyici RNA'lara (siRNA) kesilmesi ile başlamaktadır. Bu siRNA'lar daha sonra, bir multiprotein-RNA nükleaz kompleksi olan, RNA- indükleyici baskılama kompleksine (RISC) bağlanır. RISC, siRNA'ları komplementer mRNA'yı bulmak için kullanır ve hedef mRNA'yı endonükleolitik olarak keser. Neticede spesifik mRNA'nın azalması uygun protein(ler)in azalmasına yol açar. RNA interferans ve RNA baskılamanın diğer formları olan transkripsiyon sonrası gen baskılama/co-supresyon ve quelling bitkiler, hayvanlar, fungus ve protozoa gibi geniş bir organizma çeşidinde gözlenmiştir. RNA interferans doğal bir mekanizma olmakla birlikte in vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak endojenik genlerin ekspresyonu baskılanabilmektedir. Bu yüzden RNA interferans moleküler biyolojide gen fonksiyonu analizinde ve aynı zamanda gen terapisinde geniş bir uygulama alanına sahiptir. Bu derlemede RNA interferans ve onun spesifik varyantları olan transkripsiyon sonrası gen baskılama/co-supresyon ve quelling'den, RNA interferansın mekanizmasından ve onun tedavi alanındaki uygulamalarından bahsedilmektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA İnterferans, RNAi, siRNA, Gen baskılama.

RNA INTERFERENCE (RNAi)

ABSTRACT

RNA interference is a post-transcriptional gene silencing process during which endogenous complementary messenger RNA is destroyed upon introduction of the corresponding double-stranded RNA into the cell. The initiation of RNA interference occurs with the processing of double-stranded RNA into small interfering RNAs (siRNAs), by an RNase III enzyme called Dicer. These siRNAs are then incorporated into the RNA-Induced Silencing Complex (RISC), a multiprotein-RNA nuclease complex. RISC uses these siRNAs to find complementary mRNA and endonucleolytically cleave target mRNA. Consequently, the reduction of specific mRNAs leads to the reduction of the corresponding protein(s). RNA interference and other forms of RNA silencing such as post-transcriptional gene silencing/co-suppression, quelling have been observed in a wide variety of organisms such as plants, animals, fungi, and protozoa. Although RNA interference is a natural phenomenon, it can be used to silence expression of endogenous genes using in vitro synthesized siRNAs. Therefore, RNA interference is promptly utilized as a gene function analysis tool in molecular biology and also in gene therapy. This review describes RNA interference and its specific variants, post-transcriptional gene silencing/co-suppression and quelling, mechanism of RNA interference and applications of RNA interference as therapeutic.

Keywords: RNA Interference, RNAi, siRNA, Gene silencing.

*E-posta: venharcelik@gmail.com

1. GİRİŞ

İnsan genomunun ve birçok model organizmanın dizi analizlerinin belirlenmesi, fonksiyonu henüz bilinmeyen çok sayıda geni açığa çıkardığı için, gen susturma için etkili metodlar, fonksiyonel genomik (gen fonksiyonu) alanında dikkat çekici bir artış göstermiştir [1]. Yıllardır çok sayıda gen susturma mekanizması ortaya çıkmıştır ve bunlar temel olarak genlerin kendisini veya onların kodladığı mRNA'ları hedef almaktadır. Doğrudan geni hedef alan bazı istisnai teknikler geliştirilmiş olmakla beraber, mRNA hedefli tekniklerde artış olduğu bu tekniklerle doğrudan bağlantılı olan çoğu tedavi amaçlı çabalardan anlaşılmaktadır. mRNA hedefli bu tekniklerde “antisense stratejileri” çok yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu antisense stratejileri, tamamen hedef alınan proteini kodlayan mRNA'ya revers komplementer olan bir DNA veya RNA nükleik asit zincirini hücrelere aktarmaya dayanır [2]. Geleneksel ilaçların çoğu proteine bağlanarak onların fonksiyonlarını değiştirirken tek zincirli DNA veya RNA antisense oligonükleotidleri, komplementer hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu engelleyebilir veya RNAase H gibi endojenik nükleazlar ya da ribozim, DNAzim gibi katalitik olarak aktif oligonükleotidler hedef mRNA'nın parçalanmasına yol açabilirler [1, 2, 3]. Antisense oligonükleotid çalışmaları, son yıllarda gen susturma mekanizması için yüksek derecede etkili bir metod olan RNA interferansın (RNAi) keşfedilmesine yol açmıştır [2, 4].

RNA interferans, çift zincirli RNA'nın (dsRNA) hücreye girdiği zaman komplementer mRNA dizisinin parçalanmasına yol açması ile sonuçlanan transkripsiyon sonrası gen susturma mekanizmasıdır [5]. Bu mekanizma doğal bir işlem olup, canlı organizmadaki biyolojik fonksiyonu, virüs kalıtım materyali ve transpozonlar gibi hareketli genetik elementlerin istilasına karşı genomu koruyarak hücrel savunmada rol almaktadır. Ayrıca ökaryotik organizmaların gelişimsel programlarının fonksiyonu için önemli olan transkripsiyon sonrası gen susturma ile gen regülasyonunda önemli rol oynamaktadır [3, 6, 7, 8]. RNAi doğal olarak meydana gelen bir yolak olduğu için bu tekniğin etki ve spesifitesi antisense oligonükleotid ve ribozimler gibi diğer nükleik aside dayalı susturma/baskılama tekniklerinden farklıdır [3]. Böylece RNAi diğer çoğu klasik antisense teknolojilerine önemli bir potansiyel alternatif olarak ortaya çıkmıştır [2].

mRNA seviyesinde gen ekspresyonunun durdurulması için kullanışlı bir metodun bulunması, son yıllarda moleküler biyologların rüyası olmuştur. Bugün RNA interferans, modern biyolojide ve

tıpta önemli gelişmelere yol açacak bir fenomen olarak düşünülmektedir. RNAi, fonksiyonel genomik araştırmalarında üzerinde yoğun araştırmalar yapılan yeni bir alandır [9]. RNAi, Science dergisi tarafından 2001’de “yılın molekülü” ve “2002 yılının en önemli bilimsel hamlesi” seçilmiştir. Yine 2006 yılında Andrew Z. Fire ve Craig C. Mello adlı araştırmacılar RNA interferans ile ilgili yaptıkları çalışmalarla Fizyoloji/ Tıp alanında Nobel ödülü almışlardır [10]. Ayrıca bilim insanları RNA interferansı son yılların en heyecan verici keşfi olarak tanımlamışlardır [9, 11, 12].

2. RNA’YA DAYALI GEN BASKILAMANIN KEŞFİ

2.1. Bitkilerde Transkripsiyon Sonrası Gen Baskılama (Post-Transcriptional Gene Silencing, PTGS) veya Co-Supresyon

Şimdilerde RNAi olarak adlandırılan gen baskılama mekanizmasının ortaya çıkması ile ilgili ilk işaretler 1980’li yılların sonlarında bitkilerin genetik modifikasyonu üzerine yapılan çalışmalarda ortaya çıkmıştır [13, 14].

Jorgensen ve arkadaşları genetik transformasyon çalışmaları ile petunyada pigmentasyonu katalizleyen bir enzim olan chalcone syntase (chs)’in ekspresyonundan sorumlu olan bir genin aktivitesini düzenleyerek daha mor petunyalar elde etmeye çalışmışlardır. Ancak petunya bitkisine ekzojenik transgenin aktarılması, beklenildiği gibi çiçek rengini daha koyulaştırmak yerine alacalı pigmentasyon ile daha beyaz petunyanın elde edilmesine neden olmuştur. Petunya bitkisine chs geninin ekstra kopyasının aktarılması, onun ekspresyonunda beklenen artışın aksine azalmaya neden olmuştur [13, 15]. Yapılan çalışmalar bu azalmanın sitozolik chs mRNA’sının transkripsiyonunun azalması ile ilgili olmadığını ve izole edilen nukleusta transkripsiyonun devam ettiğini göstermiştir [16]. Dolayısıyla bu durum transkripsiyon sonrası RNA parçalanmasını ifade eden transkripsiyon sonrası gen baskılama (post-transcriptional gene silencing, PTGS) olarak tanımlanmıştır. Jorgensen ve arkadaşları petunyaya aktarılan transgenin sadece kendi kendisini değil aynı zamanda her nasılsa endojenik chs geninin ekspresyonunu da etkileyen bu olay sonrası hem endojenik ve hem de transgenik mRNA’nın kaybını tanımlamak için co-supresyon terimini kullanmışlardır [13, 15]. Daha sonra yapılan çalışmalar transgenin ekspresyonunun çift zincirli RNA (dsRNA) oluşumuna yol açtığını ve böylece PTGS’yi /co-supresyon’ u başlattığını göstermiştir [17].

Bazı bitki laboratuvarlarında yapılan çalışmalar bu mekanizmanın biyolojik fonksiyonunun bitkilerin hedef viral RNA'nın parçalanmasını gerçekleştirerek RNA virüsleri tarafından enfeksiyona karşı verdikleri bir cevap olduğunu göstermişlerdir [18, 19, 20, 21]. Bitki sistemlerinde ekzojenik kaynaklardan gelen dsRNA'lar (bitkilerde eksprese edilen transgenlerin geniş bir kısmı, bakteriyal ya da viral diziler) gen baskılamanın potansiyel indükleyicileridir. Bitkilerdeki bu fenomen transkripsiyon sonrası gen baskılama (post-transcriptional gene silencing, PTGS)/co-supresyon ya da viral-indükleyici gen baskılama (viral-induced gene silencing, VIGS) olarak tanımlanmaktadır [22, 23].

2.2. Funguslarda Quelling (Homoloji Bağlı Gen Baskılama)

Bitkilerde PTGS raporları birikirken, fungal sistemde bağımsız olarak homolojiye göre gen baskılama fenomeni gözlenmiştir. Bu olay "Quelling" olarak adlandırılmıştır. Quelling, *Neurospora crassa* fungusunun turuncu renkli pigmentasyonunu sağlayan karotenoidlerin biyosentezi için gerekli albino1 (*all*) geninin ekspresyonunu desteklemeye çalışma sırasında meydana gelmiştir. Yabanil tip *all*⁺ geni içeren *N. crassa* soyuna *all* geni içeren bir plazmid aktarılmıştır. Birkaç transformant sabit olarak baskılanmıştır ve albino fenotipler gözlenmiştir. *all* baskılanmış soylarda, eklenmiş *all* mRNA düzeyi yabanil tip soyunkine benzerken doğal *all* mRNA'nın yüksek derecede azalmasının transkripsiyon oranının homoloji bağlı durumda olgun mRNA düzeyini etkilemesi ile ilgili değil quelling ile ilgili olduğu gösterilmiştir [24].

2.3. RNA İnterferans (RNAi)

Bitki ve funguslarda RNA baskılama mekanizmasının bulunmasının ardından RNA İnterferans'ın keşfedilme süreci başlamıştır. RNA baskılama mekanizmasında ekzojenik antisense RNA'nın ökaryotik endojenik genleri baskılamasının en çok kabul edilen izahı antisense RNA'nın mRNA ile hibridize olarak translasyonu inhibe etmesidir [25]. Bununla beraber 1995'de Guo ve Kempheus, Nematod türü bir solucan olan *Caenorhabditis elegans*'da gen ekspresyonunu baskılamak için sense RNA'nın da antisense RNA kadar etkili olduğunu tespit etmişlerdir [26]. Bu çalışma, RNAi'nin keşfedilmesi ile ilgili en büyük bilimsel hamle olan Fire, Mello ve arkadaşlarının Nobel ödüllü çalışmalarına öncülük etmiştir. 1998'de bu araştırmacılar sense ve antisense RNA'nın sinerjisini test etmek için yaptıkları çalışmada *C.*

elegans'a enjekte ettikleri dsRNA karışımının gen ekspresyonunu baskılamada sense ve antisense RNA'ların tek başına gösterdikleri etkinin on katından daha fazla bir potansiyel etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir [10]. Araştırmacılar, *C. elegans*'a bir kas proteinini kodlayan genin belli bir segmentine ait dsRNA enjekte etmişlerdir. Bu kas proteininden yoksun *C. elegans* solucanlarda fenotipik olarak görülen seğırtme fenotipi dsRNA enjekte edilen solucanlarda da gözlenmiştir [10]. Böylece araştırmacılar protozoa, meyve sineğı, nematod, böcek, parazit, bitki, insan ve fare hücre soylarını içeren hemen hemen bütün ökaryotlarda gözlenen RNA interferans fenomenini göstermişlerdir [6]. Bu keşifden sonra daha önce bitkilerde transkripsiyon sonrası gen baskılama (PTGS) [13], funguslarda gen "quelling" [24] ve antisense RNA ile gen baskılama [25] olarak rapor edilen mekanizmaların *C. elegans*'da gözlenen RNAi'nin farklı şekilleri olduğu anlaşılmıştır [10, 27].

3. RNA'YA DAYALI GEN BASKILAMANIN BİLEŞENLERİ

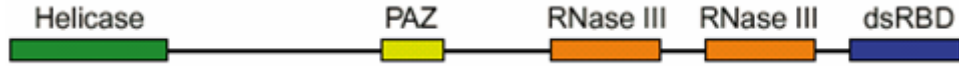
Yapılan genetik ve biyokimyasal çalışmalar RNAi, co-supresyon/PTGS ve quelling mekanizmalarının işlemsel olarak benzer olduğunu ve dsRNA indükleyici gen baskılama temeline dayanan bu biyolojik yolların hemen hemen bütün ökaryotik organizmalarda var olduğunu göstermiştir. RNA'ya dayalı gen baskılama mekanizmasının bileşenlerinin bazıları başlatıcı (initiator) olarak rol alırken, bazıları etki edici (effector), çoğaltıcı (amplifier) ya da iletici (transmitter) olarak görev yapmaktadır [6].

3.1. Dicer Enzimi

RNAse III ribonükleaz ailesine ait enzimler RNA interferansın ilk adımını başlatır. Bu nükleazlar sahip oldukları dsRNase aktivitesi ile dsRNA'ları siRNA (small interfering RNA) adı verilen 21- 23 nükleotid uzunluğunda küçük engelleyici RNA'lara parçalamaktadırlar [28, 29].

RNAse III enzimleri domain yapısına bağlı olarak üç sınıfa ayrılmaktadır: Bakteriyal RNAse III enzimi, tek bir katalitik RNase III domaini ve C-terminalinde dsRNA bağlama domaini (dsRBD) taşırken, Drosha nükleaz enzimi iki katalitik RNase III domaini ve dsRNA bağlama domaini (dsRBD) taşımaktadır. İlk olarak *Drosophila melanogaster*'den izole edilen Dicer enzimi ise RNAse III ailesinin üçüncü enzim sınıfı üyesidir [22, 30]. Dicer enzimi dört farklı domaine sahiptir: Bir N-terminal helikaz domaini, bir PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille proteinlerini içeren bir domain) domaini, iki katalitik RNase III domaini ve C-terminalinde dsRNA bağlama domaini

(dsRBD) bulunmaktadır [28] (Şekil 1). Dicer enziminin kesim aktivitesinin arka arkaya sıralı olan iki katalitik RNase III domaini tarafından sağlandığı düşünülmektedir [11]. Dicer enziminin sahip olduğu helikaz domaini ise, bu kesim aşamasından ziyade siRNA zincirinin açılması ve tek zincirinin RISC kompleksine aktarılması sırasında rol almaktadır. PAZ domaini bir nükleik asit bağlama domaini olup, dsRNA'nın enzime bağlanmasında rol almaktadır [30].



Şekil 1. Dicer enziminin domain yapısı [28].

Dicer enzimi RNA interferansın ilk adımı olan siRNA'ların elde edilmesi fonksiyonunun yanı sıra aynı zamanda daha sonraki adımda bu öncü moleküllerin RISC kompleksine yüklenmesinde de önemli rol oynamaktadır [11, 27].

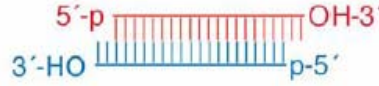
Dicer enzimi fungus, bitki ve memelilerde evrimsel olarak korunmuştur [6, 27]. Ancak bunlar bazı farklılıklar gösterebilmektedir. *Drosophila* gibi düşük ökaryotlarda Dicer enziminin kesim aktivitesi ATP gerektirirken memeli Dicer enzimi ATP gerektirmez [6, 11, 23, 30].

3.2. siRNA (Small Interfering RNA, Küçük Engelleyici RNA)

Hücrelerde RNAi mekanizmasını uzun dsRNA'lar başlatırken çoğu deneysel çalışmalarda etki edici moleküller olarak siRNA'lar kullanılmaktadır [31]. Örneğin *C. elegans* ve *Drosophila*' da in vitro şartlarda uzun dsRNA'lar kullanılırken memeli hücrelerine uzun dsRNA'ların (>30 bp) girişi gen ekspresyonunda spesifik olmayan inhibisyon ve apoptozis aracılığıyla hızlı hücre ölümü gibi antiviral interferon cevaba neden olmaktadır. Bu amaçla memeli hücrelerinde deneysel araştırmalarda 30 bp'den daha küçük siRNA'lar kullanılmaktadır [3, 23, 32].

siRNA'lar uygun mRNA degradasyonu için rehber RNA olarak görev alırlar [6]. Dicer enziminin nükleaz aktivitesi ile dsRNA'lar, 5'- fosfat ve 3'- hidroksil uçlara sahip ve 3'- hidroksil uçlarında 2- 3 nükleotidlik çıkıntı bulunan 21- 23 nükleotid uzunluğunda siRNA'lara parçalanırlar [29, 33] (Şekil 2). siRNA'nın bu yapısal özelliği RISC kompleksine bağlanması ve RNAi mekanizmasının sonraki aşamaları için önemlidir [22, 27]. Örneğin; antisense zincirin 5'

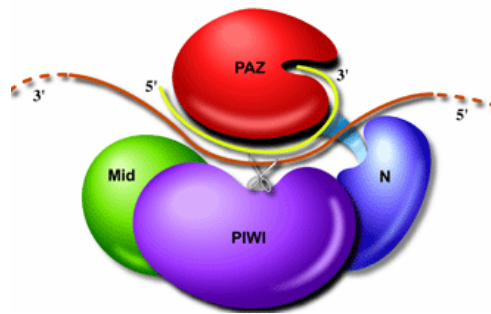
ucunun modifikasyonu siRNA aktivitesini inhibe ederken küt uçlu siRNA'lar sonraki aşamalarda çok yetersiz bir araçdırlar [27].



Şekil 2. siRNA'nın yapısı.

3.3. RISC (RNA- Induced Silencing Complex, RNA İndükleyici Baskılama Kompleksi)

RISC, nükleaz aktiviteli RNA-multiprotein kompleksi olup asimetrik olarak siRNA'lara bağlanarak uygun siRNA zincirinin rehberliğinde komplementer hedef mRNA'yı parçalamaktadır [6, 11]. Yapısında endonükleaz, ekzonükleaz ve helikaz enzimlerini içermektedir [9]. Bu kompleksin protein bileşenlerinden birisi Argonaute ailesi üyesi olarak tanımlanmıştır [6]. Argonaute proteinleri iki korunmuş domain yapısı içermektedir: PAZ domaini aynı zamanda Dicer enziminde de bulunurken PIWI domaini bu proteinlere özgüdür (Şekil 3). RISC'in temel bileşeni Argonaute proteini mRNA kesimi için temel katalitik bölge olup bu proteinin PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmada rol alırken, yapısal olarak RNase H'in aktif bölgesine benzeyen PIWI domaini hedef mRNA'nın kesiminde rol almaktadır [31, 34]. Yüksek derecede korunmuş olan argonaute protein ailesi üyeleri *Arabidopsis* Ago1 veya *Drosophila* Piwi proteinleriyle olan homoloji derecelerine bağlı olarak iki sınıfa ayrılmaktadır [11, 34].



Şekil 3. Argonaute proteininin domain yapısı.

4. RNA İNTERFERANSIN MEKANİZMASI

RNA interferansın keşfinden itibaren yapılan genetik, biyokimyasal ve biyoinformatik çalışmalar kullanılarak RNAi mekanizmasının anlaşılmasında önemli adımlar atılmıştır [34, 35].

RNAi mekanizması, uzun dsRNA'ların RNA nükleazlar tarafından ~22 nükleotidlik RNA fragmentlerine (siRNA) parçalandığı bir başlangıç adımı ve multinükleaz RISC kompleksine katılan siRNA'nın rehberliğinde komplementer mRNA'nın parçalanmasının gerçekleştiği bir efektör adımı olmak üzere iki adımlı mekanistik bir modeldir [6, 34].

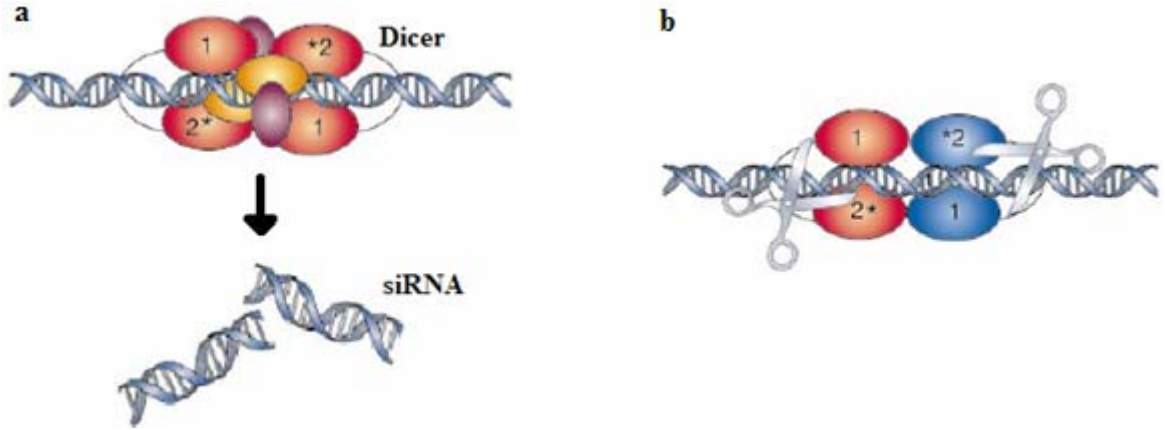
4.1. Başlangıç Adımı

RNAi mekanizmasının başlangıç adımı hücredeki uzun dsRNA öncü molekülünün RNase III enzimi Dicer tarafından 5'- fosfat ve dinükleotid çıkıntısı bulunan 3'- hidroksil uçlara sahip ~22 nükleotidlik siRNA moleküllerine parçalanması işlemidir. Bu işlem sitoplazmada gerçekleşmektedir [28, 29, 34]. Dicer enziminin PAZ domaini dsRNA'nın ucuna bağlanarak katalitik RNase III domainleri tarafından siRNA'lara parçalanması sağlanmaktadır [28] (Şekil 4a).

Dicer enziminin katalitik RNase III domaininin yapısına bağlı olarak ~22 nükleotidlik siRNA'ların elde edilmesi ile ilgili bir model sunulmuştur [36] (Şekil 4b): Dicer enziminin iki enzimli bir dimer gibi görev yaptığı düşünülmektedir. Tek bir dicer enziminin arka arkaya sıralı iki katalitik RNase III domaini dsRNA'ları siRNA'ların uzunluklarının yarısı kadar olan 12- 15 nükleotidlik dsRNA fragmentlerine parçalamaktadır. dsRNA üzerinde antiparalel olarak bulunan dicer enzimlerinin dört katalitik RNase III domaini (aktif bölge) bir araya gelmektedir. Dimeri oluşturan her dicer enziminin iç katalitik domainleri inaktiftir ve geriye kalan katalitik domainleri ~22 nükleotidlik siRNA'ların elde edilmesi için birbirlerinden gerekli uzaklıkta bulunmaktadır [6, 22, 36]. Evrimsel olarak korunmuş olan dicer enziminin yapısındaki küçük değişikliklerin katalitik domainlerin birbirlerine uzaklıklarını değiştirmesi siRNA uzunluğundaki türe özgü farklılığı açıklamaktadır [22].

RNA interferansın başlangıç adımı dicer enziminin ATP bağlı aktivitesinin olup olmadığına bağlı olarak organizmalarda farklılık göstermektedir. *Drosophila* gibi düşük ökaryotlarda dicer enziminin kesim aktivitesi ATP gerektirirken, memeli dicer enzimi ATP gerektirmez [6, 11, 23, 30]. ATP gereksinimi endonükleazlar arasında dicer enzime özgüdür. dsRNA'nın siRNA'lara

parçalanması sırasında ATP'nin rolünün ne olduğu bilinmemektedir. Ancak ATP'nin siRNA'ların serbest kalabilmesi için gerekli olabileceği düşünülmektedir [37].

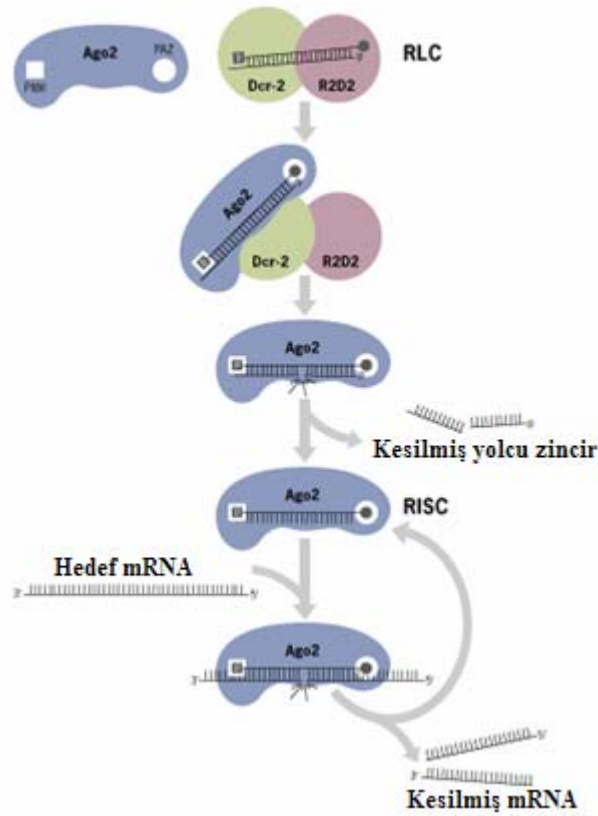


Şekil 4. a. RNA interferansın başlangıç adımı. **b.** Dicer enzimi kesim modelinin gösterilmesi. İki ayrı dicer enziminin (farklı renkte gösterilmiştir) ~22 nükleotidlik aralıklarla siRNA kesilmesi ile sonuçlanan 2. katalitik domainlerinin inaktivitesi [22].

4.2. Effektör Adımı

RNA interferansın efektör adımında, ilk aşamada üretilen çift zincirli siRNA'lar başlangıç substratı olarak rol alarak RISC adı verilen RNA- multiprotein nükleaz kompleksinin bileşenlerine bağlanmaktadır [6, 34]. *Drosophila*'da, RISC'in ilk alt birimi olan siRNA'nın RISC bileşenlerine bağlanması için dicer enzimi Dcr-2 ve küçük dsRNA bağlama proteini R2D2 birlikte çalışmaktadır. Dcr-2 ve R2D2, siRNA'ya bağlanan bir heterodimer formu oluşturmaktadır. Dcr-2, siRNA'nın termodinamik olarak daha stabil olan ucuna bağlanırken R2D2 daha az stabil olan ucuna bağlanmaktadır. Bu termodinamik stabilite ve bağlanma asimetrisi RISC kompleksine yüklenecek siRNA zincirinin seçilmesi için önemlidir. Bu duruma göre dubleks siRNA'nın 5' ucu daha az stabil olan zinciri rehber zincir olmaktadır. siRNA'nın 5' ucundaki fosfatın varlığı R2D2 bağlanmasını kuvvetlendirmektedir. Dcr-2/R2D2 heterodimeri daha sonra RISC'in temel komponenti Argonaute proteini Ago2 ile giderek yer değiştireceği yer olan RISC yükleme kompleksine (RISC loading complex, RLC) katılmaktadır [31, 34, 38, 39]. İlk sunulan modellere göre rehber zincirin RLC'de veya Ago2'ye transferi sırasında yolcu zincirden ayrıldığı düşünülmektedir [31]. Son çalışmalar siRNA'nın Dcr-2/R2D2'den Ago2'ye

bir dubleks olarak transfer edildiğini ve Ago2'nin hedef mRNA'yı kesmek için uygun olan rehber zincirin haricindeki yolcu zinciri RISC kompleksi substratı olarak parçaladığını göstermiştir [39, 40] (Şekil 5). Yolcu zincirin parçalanması Ago2 proteininden bu zincirin çıkarılması ve aynı zamanda RISC kompleksinin aktivasyonu için önemlidir [39]. Yolcu zincir parçalandıktan sonra ATP bağlı olduğu düşünülen bir aşamada rehber zincir, tamamen aktif forma dönüşen RISC'de Ago2 ile bağlantılı olarak kalmaktadır [34].



Şekil 5. RNA interferansın efektör adımı.

RISC, rehber zinciri Watson-Crick baz çiftleşmesi prensibine göre komplementer hedef mRNA'yı bulmak için kullanmaktadır. RISC'in temel komponenti Argonaute proteini mRNA kesimi için temel katalitik bölgedir. Argonaute proteininin PAZ domaini rehber zincirin 3' ucuna bağlanmaktadır [34, 39]. Yapılan çalışmalar RISC'in Argonaute bileşenine ait olan bu domainin bağlanırken tek zincirli RNA'nın 3' ucunu veya çift zincirli RNA'nın 2 nükleotidlik 3' çıkıntısını tanıdığını göstermiştir [31]. Argonaute'ın yapısal olarak RNase H'in aktif bölgesine benzeyen PIWI domaini ise rehber zincirin 5' ucuna bağlanmaktadır. Böylece argonaute proteini mRNA'yı

rehber zincirin 5' ucundan ölçerek 10. ve 11. nükleotidler arasındaki fosfodiester bağıını endonükleolitik olarak kesmektedir [34, 38, 39]. Kesilmiş hedef mRNA'nın her iki fragmentinin RISC kompleksinden serbest kalabilmesi için ATP gerekmektedir. Kesilmiş hedef mRNA'nın 3' ucu 5'→3' eksonükleaz XRN-1 (veya onun homologları) tarafından, geriye kalan 5' ucu eksozom olarak bilinen eksonükleazların bir kompleksi tarafından parçalanmaktadır [32, 34]

5. RNA İNTERFERANSIN TEDAVİDEKİ UYGULAMA ALANLARI

RNA interferans canlı organizmada mevcut olan doğal bir işlem olmakla birlikte aynı zamanda in vitro olarak sentezlenen siRNA'lar kullanılarak endojenik genlerin ekspresyonunu baskılamak için kullanılmaktadır. Endojenik genlerin ekspresyonlarının baskılanması fonksiyonel genomik alanında gen fonksiyonunu araştırmada önemlidir [11, 41]. İnsan genomunun ve yaygın olarak çalışılan birçok model organizmanın genomlarının belirlenmesi, fonksiyonu henüz bilinmeyen çok sayıda geni açığa çıkarmakla beraber RNAi diğer tekniklere göre daha hızlı ve ucuz bir metod olarak fonksiyonel genomik araştırmalarında çok ideal bir teknik olarak etkin bir şekilde kullanılmaktadır [1, 41].

RNAi tekniği kullanılarak gen ekspresyonunun baskılanması sadece gen fonksiyonunu araştırmada değil aynı zamanda gen terapisinde de önemlidir [11, 41]. Örneğin; eğer bir hastalık normal bir proteinin fazla miktarda ekspresyonundan ya da mutant bir proteinin ekspresyonundan kaynaklanıyorsa RNAi spesifik proteinin düzeyini azaltmak veya onun zararlı etkilerini düzeltmek için kullanılabilir [42]. İlk uygulamalar onkogenler ve viral enfeksiyonlarda rol oynayan hedef viral genler üzerinde yapılmıştır. RNAi'nin tedavi alanındaki değeri yapılan çok sayıda in vitro çalışma ile gösterilmiştir. Özellikle RNAi'nin, kanser hücrelerindeki hücre döngüsü için önemli olan genlerin ve/veya anti-apoptotik genlerin ekspresyonlarını baskılayarak kanserin tedavisinde ve tanısında kullanılması için çalışmalar yapılmaktadır [8]. Bununla birlikte HIV/AIDS, hepatit, SARS, influenza, insan papillomavirus enfeksiyonu gibi viral hastalıklar, Parkinson ve Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklar, diyabet ve obezite gibi metabolik hastalıklar, malaria ve romatoid artrit üzerinde araştırmalar ve uygulamalar vardır [8, 9]. Yine mevcut antimalariaların tedavide yetersiz olduğu malaria için yeni antimalarial ilaç tasarım çalışmaları yapılmakla [43] birlikte RNAi tekniğinin de vektör-

parazit arasındaki ilişkinin genetik faktörlerini belirlemede etkili olabileceği ve böylece yeni ilaç geliştirilmesinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir [8].

6. SONUÇ

RNA interferans, 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.

KAYNAKLAR

1. Kurreck J., Antisense Technologies Improvement Through novel Chemical Modifications, *European Journal of Biochemistry*, 270, 1628- 1644, 2003.
2. Gewirtz A.M., On Future's Doorstep: RNA Interference and The Pharmacopeia of Tomorrow, *The Journal of Clinical Investigation*, 117 (12), 3612- 3614, 2007.
3. RNA Interference, 2005/2006 Dharmacon Applications Handbook and Catalog, pp. 3- 5, 2005.
4. Mallery C., RNAi. Interference RNA, Department of Biology, University of Miami, Coral Gables, FL 33124, <http://fig.cox.miami.edu/~cmallery/150/gene/siRNA.htm>, March. 2007.
5. Atalay A., RNA İnterferans Kursu, s. 25, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü Yaşam Bilimleri Kursları Serisi, Ankara, 2007.
6. Agrawal N., et al., RNA Interference: Biology, Mechanism, and Applications, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67 (4), 657- 685, 2003.
7. Zeng Y., Cullen B.R., RNA Interference in Human Cells is Restricted to The Cytoplasm, *RNA*, 8, 855- 860, 2002.
8. Reddy L.S., Sarojamma, V., Ramakrishna, V., Future of RNAi in Medicine. A Review, *World Journal of Medical Sciences*, 2 (1), 1- 14, 2007.
9. Karagüzel A., Kalay E., Celep F., RNA İnterferans (RNAi): Gen Sessizleştirilmesi ve Tedavi Edici Uygulamaları, *Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi*, 33 (1), 41- 44, 2007.
10. Fire A., et al., Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*, *Nature*, 391, 806- 811, 1998.
11. Khanna D., Balgir P.P., Gurloveen K., RNA Interference: An Ancient Mechanism For Novel Therapeutics, *The Internet Journal of Genomics and Proteomics*, 2 (2), 1- 45, 2007.
12. Couzin J., Breakthrough of The Year: Small RNAs Make Big Splash, *Science*, 298 (5602), 2296- 2297, 2002.
13. 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*, 2, 279- 289, 1990.

14. Alexander R., et al., An Anti-sense Chalcone Synthase Gene in Transgenic Plants Inhibits Flower Pigmentation, *Nature*, 333, 866- 869, 1988.
15. Jorgensen R.A., Altered Gene Expression in Plants Due to Trans Interactions Between Homologous Genes, *Trends Biotechnology*, 8, 340- 344, 1990.
16. Van Blokland R., et al., Transgene-Mediated Suppression of Chalcone Synthase Expression in *Petunia hybridia* Results From An Increase in RNA Turnover, *Plant Journal*, 6, 861- 877, 1994.
17. Metzloff, M, et al., RNA-Mediated RNA Degradation and Chalcone Synthase A Silencing in *Petunia*. *Cell*, 88, 845- 854, 1997.
18. Ruiz M.T., et al., Initiation and Maintenance of Virus- induced Gene Silencing, *Plant Cell*, 10, 937- 946, 1998.
19. Angell S.M., Baulcombe D.C., Consistent Gene Silencing in Transgenic Plants Expressing A Replicating Potato Virus X RNA, *EMBO Journal*, 16, 3675- 3684, 1997.
20. Dougherty W.G. et al., RNA-Mediated Virus Resistance in Transgenic Plants: Exploitation of A Cellular Pathway Possibly Involved in RNA Degradation, *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7, 544- 552, 1994.
21. Kumagai M.H. et al., Cytoplasmic Inhibition of Carotenoid Biosynthesis With Virus-Derived RNA, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92, 1679- 1683, 1995.
22. Hannon G.J., RNA Interference, *Nature*, 418, 244- 251, 2002.
23. Betz N., RNAi: RNA Interference, *Promega Notes*, 83, 33- 36, 2003.
24. Romano N., Macino, G., Quelling: Transient Inactivation of Gene Expression in *Neurospora crassa* by Transformation With Homologous Sequences, *Molecular Microbiology*, 6, 3343- 3353, 1992.
25. Fire A., et al., Production of Antisense RNA Leads to Effective and Specific Inhibition of Gene Expression in *C. elegans* Muscle, *Development*, 113, 503- 514, 1991.
26. Guo S., Kemphues K.J., *par-1*, A gene Required For Establishing Polarity in *C. elegans* Embryos, Encodes A Putative Ser/ Thr Kinase That is Asymmetrically Distributed, *Cell*, 81, 611- 620, 1995.
27. Szweykowska- Kulinska Z., et al., RNA Interference and Its Role in The Regulation of Eucaryotic Gene Expression, *Acta Biochimica Polonica*, 50 (1), 217- 229, 2003.
28. Bernstein E., et al., Role For A Bidentate Ribonuclease in The Initiation Step of RNA Interference, *Nature*, 409, 363- 366, 2001.
29. Zamore P.D., et al., RNAi: Double-Stranded RNA Directs The ATP Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals, *Cell*, 101, 25- 33, 2000.
30. Zhang H., Biochemistry and Modeling of Human Dicer, A Key Protein Involved in RNA Interference, Ph.D. Thesis, Philosophisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Basel, 2004.
31. Filipowicz W., RNAi: The Nuts and Bolts of The RISC Machine, *Cell*, 122, 17- 20, 2005.
32. Black D., Newbury S., RNA Interference: What It is and What It Does, A Potent Gene Regulator, *The Biochemist*, 26 (5), 7- 10, 2004.
33. Elbashir S.M., et al., RNA Interference is Mediated by 21- and 22- Nucleotide RNAs, *Genes & Development*, 15, 188- 200, 2001.

34. Ambion, Applied Biosystem, <http://www.ambion.com/techlib/resources/RNAi/overview/2.html>, 2008.
35. Kim K., et al., Conversion of Pre-RISC to Holo-RISC by Ago2 During Assembly of RNAi Complexes, RNA, 13, 22- 29, 2007.
36. Blaszczyk J., et al., Crystallographic and Modeling Studies of RNase III Suggest A Mechanism For Double-Stranded RNA Cleavage, Structure (Camb.), 9, 1225- 1236, 2001.
37. Zhang H., et al., Human Dicer Preferentially Cleaves dsRNAs at Their Termini Without A Requirement For ATP, EMBO Journal, 21, 5875- 5885, 2002.
38. Hutvagner G., Small RNA Asymmetry in RNAi: Function in RISC Assembly and Gene Regulation, FEBS Letters, 579 (26), 5850- 5857, 2005.
39. Rand T.A., et al., Argonaute2 Cleaves The Anti-Guide Strand of siRNA During RISC Activation, Cell, 123, 621- 629, 2005.
40. Gregory R.I., et al., Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing, Cell, 123 (4), 631- 640, 2005.
41. Downward J., RNAi and Cancer Research, The Biochemist, 26 (5), 12- 14, 2004.
42. Eggleston A., RNAi Therapy Collection, Nature Collections, p. 54, Sept. 2005.
43. Çelik V., Analysis of Active Site Loop Amino Acids of Enzyme *Plasmodium falciparum* Lactate Dehydrogenase by Site-Directed Mutagenesis Studies, Fırat Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2004.