Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi
Yıl: 2007 Cilt: 05 Sayı: 2 Sayfa: 14-31
www.mikrobiyoloji.org/pdf/702070203.pdf

Antisens Teknolojisi

İsmail Karaboz[1], Caner Çolak[2]

Giriş

Antisens teknolojisi insan, hayvan ve bitkilerdeki hastalıkların daha spesifik tedavisi ve yeni keşifleri için ayrıca, fonksiyonel genomik çalışmalar için çok güçlü silahlardan oluşan uygun tekniklerdir. Antisens teknoloji olarak bilinen yöntemde, antisens RNA moleküllerinin hedef genin RNA mesajına spesifik olarak bağlanarak gen ifadesinin moleküler düzenlenişine engel olunmaktadır. Hastalıkların oluşumunda büyük bir paya sahip olan proteinlerin üretimini durdurmak için bu teknoloji, oligonükleotidler olarak adlandırılan modifiye olmuş ya da olmamış DNA/RNA segmentlerinin kullanımını içermekte ve hücre içinde, nukleus ve protein üretim bölgeleri arasındaki genetik bilginin iletimini bloke etmektedir (1). Antisens nükleik asit sekanslarının hedef olacak spesifik mRNA'ya bağlanması veya hibridizasyonu, genin genetik mesajının kesilmesine yol açmaktadır. Bir genin genetik mesajının hücresel proses ile kesilmesi "Knock-Down" veya "Knock-Out" olarak isimlendirilir. Bu proses, bu genin işleyişini saptamak için araştırıcılara olanak sağlamıştır. Diğer bir önemli antisens teknolojisi ise "RNA interferens" olarak adlandırılır. Antisens alanındaki araştırmalar RNAi (RNA interferens)'nin keşfi ile hız kazanmıştır. Doğal olarak oluşan bu mekanizma sekansa spesifik olup ilk kez *Caenorhabtidis elegans* nematodunda keşfedilmiştir.

Çoğu ilaç (Drug) proteinlere bağlanırken, antisens moleküller kendilerine komplementer hedef RNA ile eşleşirler. Antisens oligonükleotidler mRNA'nın translasyonunu bloke eder veya RNAaz-H ile mRNA'nın degredasyonuna neden olurlarken, ribozim ve DNA enzimleri hedef RNA'yı keserler. RNAi yaklaşımları, RISC ile etkileşen siRNA (small interfering RNA) molekülleri ile gerçekleştirilir (2).

Antisens Oligonükleotidler

Oligonükleotid bazlı antisens tekniklerin birçok ortak yanı vardır ve genetik mesajın eleminasyonu veya baskılanması üzerine çok başarılı yöntemler uygulanmıştır. Sentetik oligonükleotid sekansın antisens etkisi 1970 yıllarında Zamecnik ve Stephenson tarafından gösterilmiştir.

[1] Prof. Dr., [2] Biyolog. Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova-İzmir. Yazışmadan sorumlu yazarın elektronik posta adresi: ismail.karaboz@ege.edu.tr

Bu araştırmacılar Rous Sarcoma virusün (RSV) 35SRNA'sının 5' ve 3' uçlu nükleotid sekansını kullanarak viral integrasyonda önemli olarak görünen 21 nükleotidlik tekrarlayıcı sekansları identifiye etmişler ve viral sekansın bir kısmına komplementer olan d(AATGCTAAAATGG)13 mer'lik oligonükleotidi sentezlemişlerdir. Bu sentetik oligonükleotid sekansı RSV ile enfekte olmuş fibroblast hücre kültürlerine verildiğinde, viral üretim büyük ölçüde inhibe olmuştur. Böylece araştırmacılar önemli sekanslara hibridize olarak onları bloke eden oligonükleotidlerin viral integrasyonu inhibe ettiği sonucuna varmışlardır. Hücreye verilen bu oligonükleotide "hibridon" adı verilir (1).

Sentetik oligonükleotidler, genetik proseslerde bir ajan olarak kullanılmak isteniyorsa bir takım konular aydınlatılmalıdır. Bu konuların en önemlisi "Kalıcılık"tır. Sentetik oligonükleotidler yabancı bir hücreye verildiklerinde hemen endonükleazlara yem olurlar. Onun için bu oligonükleotidlerin endonükleazlardan korunması gerekir. Mümkün olan koruma modifikasyonları 2003 yılında Kurreck tarafından 3 tip olduğu ortaya çıkmıştır.

Birinci sınıf modifikasyon, DNA ve RNA nükleotidlerindeki baz veya fosfat bağlarının değişimidir. DNA nükleotidlerinde olmayan, RNA nükleotidlerindeki 2'(OH) hidroksil grubu olan (Riboz) modifiye edilebilir. Bu modifikasyon, nukleaz degredasyonuna karşı bir tür kamuflajdır. 1969 yılında araştırıcılar fosfat bağlarında köprü oluşturmayan oksijen atomundan birini sülfür ile yer değiştirmişlerdir. Bu modifikasyon insan serumunda 10 saatin üzerinde nükleazlara karşı dayanıklı bir şekilde kalmış, aynı sekansa sahip modifiye olmamış oligonükleotid ancak 1 saat kalabilmiştir. Bu modifikasyona fosforotiat denmiştir. 1990 yıllarında başka araştırıcılar kültüre edilmiş hücrelerde HIV replikasyonuna karşın fosforotiatın etkili bir hibridon olduğunu bulmuşlardır. Diğer yandan, fosforotiatlı nükleotidler azda olsa hibridizasyon kinetiği düşük ve spesifik olmayan proteinlere bağlanarak sitotoksik etkiye neden olan özelliklere sahiptirler (1).

İkinci sınıf modifikasyon, Riboz şekerinin 2'pozisyonundaki alkil modifikasyonlar içeren RNA nükleotidleridir. Bu modifikasyonların en önemli ikisi, 2'-O-metil (OMe) ve 2'-O-metoksi-etil (MOE)RNA'larıdır. Modifikasyona uğramış antisens oligonükleotidlerin hibridizasyon afinitesi arttırılmış ve daha düşük bir toksik etki yaratmışlardır. 2'-O-alkil modifikasyonlarının en önemli eksikliği, en güçlü antisens mekanizması olan RNAaz-H kesimine elverişli olmamasıdır. Buna karşın avantajı da, istenmeyen çeşitli kesimleri baskılayarak bazı proteinlerdeki beklenen değişik kesimlerin ifadesini arttırmasıdır. Antisens etki için, RNAaz-H kesimi, nukleazlara dayanıklılık için 2'-O-alkil modifikasyonlarının tercih edilmesi araştırıcıları yeni bir modele ihtiyaçları olduğu gerçeğini ortaya çıkarmış ve araştırmacılar, bu her iki karakteristiği bir araya getirerek antisens oligonükleotid formunda hibrid bir oligonükleotid oluşturmuşlardır.

Bu oligonükleotid nukleazların degredasyonundan internal bloğu koruyan 2'-O-metil ile modifiye olmuş ribonükleotidler ile, RNAaz-H kesimini uyarmak için deoksinükleotidlerin merkezi bloklarını içermektedir (1). Bu model diğer antisens konularına cevap oluşturmak için henüz gelişmemiştir.

Modifiye olmamış oligonükleotidler, DNA:DNA ve DNA:RNA dublekslerini oluştururken, DNA ve RNA hedeflerinin tanınmasına yüksek afinite sağlayan çeşitli modifikasyonların sentezleri büyük çaba gerektirmektedir.

Modifiye olmamış DNA:DNA ve DNA:RNA dubleksleri ile karşılaştırıldığında, DNA ve RNA'lara hibridize olduğunda termal stabilitesi yükselmiş bir çeşit nükleik asit analoğu geliştirilmiştir. Bu modifikasyon üçüncü sınıf antisens oligonükleotidleri oluşturur. Bu sınıf 4'e ayrılır. Peptid nükleik asitler (PNAs), 2'-floro N3-P5' -fosforoamidler, 1', 5' -anhidroheksitol nükleik asitler (HNAs) ve locked nükleik asitler (LNA)'dır. 3. sınıf modifikasyonlar ile hibridizasyonda termal stabilite artmış ve hedefin tanınması zenginleşmiştir. Bu tipler arasında en çok bilinen PNA'dır (1991). Şeker fosfat bağları poliamid bağları ile tümüyle değişmiştir. Bu oluşumlar stabiliteyi arttırıcı ve yüksek hibridizasyon kinetiği sağlarken, hücreye verilimi ve RNAaz H kesim mekanizması için elverişli değildir. PNA'lar, fosforotiat ve 2'-O-alkil RNA'lardan sonra üzerinde çalışılmış ve başarı sağlanmış oluşumlardır (2002). Bu 3. sınıf oluşumlar arasında en yeni olan LNA'lardır. LNA'larda da termal stabilitenin arttığı ve hedef tanınmasının zenginleştiği görülmüştür (1).

RNA İnterferens (RNAi)

İlaç sanayi, tedavi amaçlı gen baskılanması için her geçen gün kendini yenilemektedir. Daha önceki araştırmalar, antisens oligonükleotid ve ribozimleri kapsayan sekansa-spesifik RNA baskılanması üzerineydi. Bazı pozitif sonuçlar, bu ilaç platformunda elde edilirken, stabilite, hedefi bloke etme potansiyeli, hücreye iletimi ve hedef sekans seçimi gibi teknik konular, klinik olarak ilaçların etkinliğinin gelişimini yavaşlatmıştır. Son yıllarda, nükleik asit bazlı gen inhibisyon yaklaşımlarının klinik olarak gelişiminde yeniden bir etki yaratma potansiyeline sahip olan RNA interferens (RNAi), gen regülasyonunun yeni bir mekanizması olduğu gerçeğini ortaya çıkarmıştır (3).

RNAi, bitkilerde, solucanlarda, mayalarda ve insanlar arasında yüksek oranda korunmuş, doğal olarak oluşan biyolojik bir prosestir. Hücre içinde iki bölümden oluşan bir yol izine sahiptir. Hücrede oluşan öncül dubleks RNA molekülü ilk olarak, Dicer endonukleaz ile 21-23 nükleotidlik kısa fragmentlere ayrılır. siRNA (short interfering RNA) olarak bilinen bu efektör RNA'lar, RNA uyarıcı protein kompleksi ile etkileşir (RNA inducing silencing protein compleks; RISC). Bu protein kompleksi, siRNA'nın bir ipliğini lider sekans olarak kullanarak, hedef homolog RNA'ları kesmektedir. Bitkilerde, RNAi hücre savunmasında rol oynar; virus infeksiyonundan, transpozonlardan (sıçrayıcı gen) ve tekrarlayıcı sekansların uygun olmayan ifadelenmesinden, hücreyi korumaktadır.

Memeli hücreleri de benzer savunma sistemine sahiptir. Bu endogenik RNA'lar, veya miRNA (microRNA), dicer tarafından siRNA efektörlerine dönüştürülür ve çeşitli hücresel proseslerde örneğin, çoğalma, apoptozis ve farklılaşmada görev yapan genlerin ifadesinin düzenlenmesinde rol oynar. siRNA molekülleri, kimyasal olarak sentezlenip ekzogenik olarak memeli hücrelerine verildiğinde, hücresel RISC kompleksine maruz kalır ve siRNA'ya homolog olan RNA'ların parçalanmasına aracılık eder (3).

RNAi, gen işleyişinin validasyonu ve hızlı identifikasyonunda, hedef ilaç keşfinde, biyolojik kaynak olarak devrim yapmış, hatta 2002 yılında, "Science Magazine" tarafından "yılın keşfi" olarak nitelendirilmiştir ve bazı şirketler, RNAi bazlı tedaviler geliştirme yönünde adımlar atmıştır (3).

RNAi Tedavisinin Avantajları

Spesifitesi

Sekans bazlı gen inhibisyon teknolojilerinin potansiyel avantajlarından birisi, herhangi bir gen için tedavi amaçlı dizayn edilebilmesidir. Özellikle, tek bir allelde mutasyonla oluşan onkoloji ve genetik nörolojik hastalıklar alanında sadece defektif genin ifadelenmesini seçici olarak bloke etme fırsatı yaratılmıştır. Bunun yanında, tek bir polimorfizim ile ayırd edilebilen hedef sekansı identifiye etmek önemsiz değildir. Ayrıca, optimal siRNA'nın hedef seçimi limitli olsada, RNAi aktivitesi önemli sayılmaktadır. Kanser ve nörolojik hedefler de, allele spesifik olacak kadar yeterli bir spesifiteye sahiptir (2).

Oluşan onkoloji ve genetik nörolojik hastalıklar alanında sadece defektif genin ifadelenmesini seçici olarak bloke etme fırsatı yaratılmıştır. Bunun yanında, tek bir polimorfizim ile ayırt edilebilen hedef sekansı identifiye etmek önemsiz değildir. Ayrıca, optimal siRNA'nın hedef seçimi limitli olsa da, RNAi aktivitesi önemli sayılmaktadır. Kanser ve nörolojik hedefler de, allele spesifik olacak kadar yeterli bir spesifiteye sahiptir (2).

Potansiyel Etkinliği

Optimal dizaynı ve hedef sekans seçiminde kurallardaki farklılıklardan dolayı gen inhibisyon teknolojisinin etkinliğini direk olarak karşılaştırmak zor olmakla birlikte, RNAi bazlı inhibisyon, antisens oligonükleotidler ile başarılmış çalışmalardan daha etkindir (2).

Değişkenliği

RNAi hedef bölgelerini identifiye etme kolaylığı, RNAi'nin süper etkinliği ile ilişkili olabilir. Optimal RNAi etkinliliği için gerekli olan kurallar saptanmış olsa da, CG içeriği ve 3' uçlarının kompozisyonu temel parametreler olarak karşımıza çıkmaktadır. Diğer yandan, ribozim ve antisens oligonükleotid hedef sekanslarını identifiye etmek, kesim için gerekli olan özel sekans motiflerinin uygunluğu ile sınırlandırılmıştır. Bir grup gende bulunan multipli sekansları uyarabilen RNAi-bazlı inhibisyon ile değişkenlik daha kolaydır (2).

RNAi Tedavisinde Öne Çıkan Noktalar

Hücreye İletimi

Hücreye verilim problemi, sadece RNAi tedaviye özgü değildir fakat, RNAi bazlı ilaçların klinik olarak kullanımına önemli bir engel olarak görülmemektedir (2).

RNAi Efektörleri

RNAi efektörleri, 2 farklı yaklaşımla hücreye verilmektedir. İlki, laboratuvarda sentezlenmiş siRNA'lar bir ilaç gibi verilir.

Diğeri ise, gen terapi yaklaşımı yani, shRNA (small hairpin RNA) kodlayan DNA, hücrelere verilir ve böylece shRNA'nın hücre içi ifadelenmesi başlatılmış olur. Daha sonra shRNA'lar, konukçu hücre tarafından aktif siRNA'ya dönüştürülür. DNA yaklaşımının potansiyel avantajı, verilen plasmid DNA'ların yüksek stabilite içermesidir yani, her bireysel DNA kalıbından sentezlenmiş olan shRNA'ların büyük miktarını içeren hücresel amplifikasyon basamağından oluşmaktadır. İlaveten, ister genoma integre olan, ister epizomal formda replike olabilen DNA'yı stabil ifade vektörü şeklinde vermek de mümkündür (2).

Lokal Verilimi

Antisens ilaçların başarılı lokal uygulamasına en iyi örnek olarak "göz" verilebilir. Göz içine direk olarak siRNA'ların lokal injeksiyonu ile, yaşla ilişkili oluşan makular dejenerasyonun RNAi bazlı tedavisi geliştirilmiş ve ayrıca, merkezi sinir sistemi içine direk iletimi de mümkündür (2).

Sistemik İletimi

Sistemik verilim, siRNA'nın stabilizasyonuna, efektörün istenen dokuyu hedef alması ve hücresel alınımın kolaylığına gereksinim duyar. siRNA ilaçlarının hücresel alınımı ve stabilitesini geliştirmek için gerekli olan yaklaşımlar, nükleik asidin kimyasal değişimi ve koruyucu partiküller içine efektörün çeşitli yöntemler ile paketlenmesini içeren antisens oligonükleotid uygulaması için de geçerlidir. Efektörün özel hücre tiplerini hedef alması için, farklı ligand ve antikorların RNAi efektörü ile konjuge olması gereklidir. Viral vektörlerin kullanımı, RNAi efektörünün sistemik verilmesi için kullanılabilir fakat, viral vektörler klinik olarak hücreye iletilmesi için gerekli olan dokuya spesifik tropizm ve transdüksiyonu sağlasa da, her tip viral vektör, risk ve güvenlik sorunlarını beraberinde getirmektedir (2).

Güvenlik

İstenen etkilerin oranını en üst düzeye çıkarmak, her tedavinin ana temelini oluşturur. Kemoterapi, interferens tedavisi ve yüksek oranda aktif antiretroviral tedavilerde bu oran ideal değildir ve tedavi ile birlikte toksisite önemli bir seviyeye ulaşabilir. RNAi, hedeflenen genin spesifitesini arttırma yetisine sahip olurken, hücrenin herhangi bir ekzogenik (siRNA veya iletim ajanı) moleküle maruz kalması, normal hücresel işleyişini bozabilir (2).

Hedef Dışı Etkileri

Spesifite, en önemli avantajlardan biri olmasına karşın, hedef dışındaki etkileri hala sorundur çünkü, genin inhibisyonunda aracılık eden siRNA'ların minumum homoloji seviyesini saptayan parametreler henüz bilinmemektedir. İnhibisyon sonucunda siRNA'nın sekansına bağlı olarak tek iplikli RNA ile 11 baz çiftlik bir homoloji gösterdiği bulunmuştur (2).

Spesifik Olmayan Etkileri

Spesifik olmayan etkileri konusunda RNAi için toksisite 2 kattır. Çünkü, hem hücreye verilmesi hem de siRNA'nın kendisi beklenmedik hücresel tepkiler doğurabilir. İlk olarak, bazı katyonik lipozomlar, siRNA'nın hücreye verilmesinde kullanılmış ve interferon molekülleri uyarılmış; aynı şekilde, shRNA ifade kasetlerini hücre içine transport etmek için kullanılacak herhangi bir viral vektör, istenmeyen bir tepki ile karşılaşabilir. İkinci olarak, siRNA efektörlerinin kendileri, çift iplikli RNA hücresel savunma mekanizmasını tetikleyebilir. Bazı durumlarda, terapi için interferon indüksiyonu yararlı olmasına karşın; başlangıç defans mekanizmasının kontrolden çıkması durumunda sitotoksik olabilmekte ve bu yüzden sorun yaratmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar, siRNA'nın interferonu uyarması ile oluşan farklılıkları sistematik olarak analize etmeye başlamıştır. Örneğin, interferon sinyalini uyaran bir siRNA efektörünün içeriğinde,"tehlikeli motif" olarak adlandırılmış 9 baz çifti identifiye edilmiş ve interferon indüksiyonunu başlatan siRNA'nın 5' fosfat ucu olduğu belirlenmiştir (2).

Stabilitesi

Bazı veriler siRNA'nın, serumda ve memeli hücrelerinde antisens oligonükleotid ve ribozimlerden daha stabil olduğunu gösterse de, birçok araştırma in vivo'da siRNA'nın yarı ömrünü arttımak için siRNA'nın farmokinetik özelliğini değiştirmeyi hedeflemiştir. Özellikle, geniş spektrumlu kimyasal modifikasyonlar ile uyumlu siRNA'ların gen ekspresiyonunu inhibe ettiği kanıtlanmıştır. Araştırmacılar, enjekte edilen siRNA'nın %1'inden daha azının hedef organa ulaştığını kaydetmişlerdir (2).

Tedavi Amaçlı Uygulamaları

Viral İnfeksiyon

Birçok şirket viral infeksiyonu inhibe etmek için, RNAi bazlı tedaviler geliştirmeye başlamışlardır (2).

Hedeflenen Viral RNA'lar

Birçok makalede, invivo ve invitro'da birçok virusun replikasyonunu veya ekspresiyonunu inhibe etmek için virusa spesifik siRNA'ların kullanıldığı belirtilmiştir. Özellikle RNAi'nın potansiyel antiviral yararları üzerine araştırmalar, HIV ve Hepatit viruslarına ışık tutmuştur. Her özelliği tanımlanmış HBV (hepatit B virusu)fare modelleri bu viruslara popüler bir hedef konsepti hazırlamıştır. Başlangıçta invivo'da transfeksiyon deneyleri, fare karaciğerine HBV'ye spesifik siRNA ve HBV ekspresiyon plazmidlerinin aynı anda verilmesinin HBV'nin gen ekspresiyonunu ve replikasyonunu bloke ettiğini ortaya çıkarmıştır. Bu çalışmaları genişletmek için, araştırıcılar fare modellerini kullanarak HBV tedavisi için, RNAi'nin ileri tedavi etkinliğini incelemişlerdir. Bazı viral RNA'lar, baskılanmaya dirençlidir ve HIV'e benzer bazı memeli virusları, RNAi aktivitesini engelleyen proteinlere sahiptir. HBV konusunda, RNAi efektörlerinin, viral gen ekspresiyonu ve replikasyonunu bloke ettiği görülmüştür. Aynı şekilde İnfluenza virusunun inhibisyonu, coxsackievirus B3 ve respiratör syncytial virus infeksiyonları, farede infeksiyon oluşumundan sonra verilen siRNA ile inhibe olmuşlardır (2).

Konukçu Hücre Genlerinin Hedeflenmesi

Bunun nedeni, virusların siRNA'lar kendi genomlarını hedeflediklerinde hızlı bir şekilde kaçış mutasyonları oluşturmasıdır; diğer bir potansiyel RNAi antiviral strateji ise, infeksiyonu devam ettiren hücresel faktörlerin ekspresiyonunu inhibe etmeye yöneliktir. Özellikle CD4 ve CCR5 gibi, HIV hücresel reseptörlerinden inhibisyon için yararlanılmaktadır. Viral temizlik için etkinliğe göre RNAi'nin viral RNA'ları parçalaması, viral infeksiyonu tamamen elemine etmeye benzemez. Eğer, konukçu immün yanıt, infeksiyon ile başarılı bir şekilde mücadele ederse, viral replikasyon ve virusun yayılması etkili bir şekilde azaltılmakta, böylece etkili bir antiviral olduğu kanıtlanmış olmaktadır. Örneğin, HBV konusunda, hatta kronik olarak infekte olmuş hastalarda infeksiyon süresince virusa spesifik sitotoksik T-lenfosit üretimi sürmektedir. Bu immün yanıt, virusu temizlemek için güçlü olmasa bile, HBV antijenlerini ifadeleyen hücreleri yok etmektedir (2).

Nörolojik Hastalıklar

Parkinson, hungtington, amyotrophic lateral sclerosis (ALS) ve spinobulbar muscular atropi, RNAi bazlı terapilerin yararlı olduğunu kanıtlayan sinirsel hastalıkların önde gelenlerindendir. Sekansa spesifik RNAi'ler, mutant olan hedef genin ifadesini bloke etmektedir. Örneğin, siRNA'lar, ALS modelinde gösterilmiş mutant ve yabani tip RNA'lar arasındaki farklılıkları tek nükleotidte fark eder. ALS, tedavisi olmayan letal bir motor nöronun dejenere olduğu bir hastalık olup, Cu/Zn süperoksid dismutazı (SOD1) kodlayan gende tek bir nükleotid'teki mutasyon sonucu oluşmaktadır. Diğer bir örnek, Alzheirmer, β-amiloid üretiminde artış ile tetiklenir. β amiloid, β sekretaz (BACE1) tarafından kesilir ve bu enzim, hastaların beyinlerinde yüksek seviyede regüle edilir. β-sekretazın regülasyonunu inhibe eden siRNA'lar, işleyişi bloke eder. Bunu kanıtlamak için, Kao adında bir araştırıcı primer fare nöronlarında β sekretaz ekspresiyonunu bloke etmiş ve böylece, β amiloid üretiminde azalma gözlemlemiştir (2).

İnflamasyon ve Apoptozis

Bazı hastalıklarda hücresel proseslerin aktivasyonunun neden olduğu patoloji gözlemlenmiş hatta bunun gelişiminde önemli rol oynayan kilit moleküllerin hedeflenmesi ile hücresel proseslerin kontrol altına alınması anlamında RNAi tedavisi yarar sağlayabilmiştir. Örneğin, Tümör nekrozis faktör (TNF-α), rheumatoid arthritisin kronik patojenitesinde gerekli olan pro-inflatör sitokindir. TNF-α işleyişini bloke etmede kullanılan ilaçlar, inflamasyonun azalmasında etkili olduğu ve hastalığın yavaşladığı gözlemlenmiştir. Bazı riskler tabiki mevcuttur, TNF-α bloke edicilerin kullanılması ile ilişkili ciddi infeksiyonlar, lenfoma, sistemik eritomozus gibi hastalıklarda risk unsuru bulunmuştur. Son yıllarda lokal injeksiyon ve TNF-α'ya spesifik siRNA'ların elektroporasyonu, faredeki paw inflamasyonunu inhibe ettiği görülmüştür (2).

siRNA

Gen ifadelenmesini spesifik olarak kesintiye uğratan moleküller, güçlü araştırma kaynaklarıdır. Bu moleküllerin gelişimine yönelik çalışmalar sonucunda farklı potansiyelde ajanlar ortaya çıkmıştır.

siRNA'lar, sekansa spesifik silencing ajanı olarak ortaya çıkan en son keşiftir. Çoğu kilit organizmanın sekansı ortaya konmuş ve nükleik asit bazlı yaklaşımlarla gen işleyişinin incelenmesi için fırsat doğurmuştur. Bu nükleik asit molekülleri, tedavi amaçlı olarak geliştirilmiş ve hastalığa sebep olan virusları hedef almıştır. siRNA'lar, RNAi yol izinin efektör molekülleridir. Nematodlardaki RNAi'nın keşfi, bitkilerde post-transkripsiyonel gen silencing ve funguslarda "Quelling" gibi prosesler dubleks-RNA ile tetiklenir. Uygulamalarda, uzun dubleks RNA'lar kullanılmış fakat, bu RNA'lar çoğu memeli hücreleri için etkin değildir çünkü, antiviral interferon (IFN) yanıtını uyarmaktadır. Antiviral interferon yanıtı, hücre ölümüne neden olur. Farklı organizmalarda var olan RNAi mekanizmasının genetik ve biyokimyasal incelemeleri, bu hücresel mekanizmanın korunduğu gerçeğini ortaya koymaktadır. Bu mekanizma, dubleks RNA'yı keserek 21-28 nükleotid uzunluğundaki, siRNA'ya dönüştürür ve bu siRNA mRNA'ların sekansa spesifik degredasyonuna yol açmaktadır (5).

Nükleik Asit Bazlı Gen Silencing

mRNA'ların spesifik sekanslarını hedefleyerek gen ifadesini inhibe edecek birkaç farklı molekül istenilen düzeyde dizayn edilebilir. Başlıca 3 tip nükleik asit bazlı gen silencing molekülü vardır. Bunlar, kimyasal olarak modifiye olmuş antisens oligodeoksiribonükleik asitler (ODN), ribozim ve siRNA'lardır (5). Antisens ipliği içeren RISC'lerin oranını etkileyen siRNA veya siRNA'ların sens ipliklerinin ilk birkaç baz çiftinin termodinamik stabilitesi, Sens ipliğin 5' ucundaki yüksek termodinamik stabilite ile antisens ipliğin 5' ucundaki düşük termodinamik stabilite karşılaştırıldığında termodinamik stabilite ile ilişkili olarak antisens iplik RISC ile etkileşime girmek için daha yatkındır.

ODN: Genellikle 20 nükleotid uzunluğunda olup, pre-mRNA ve mRNA'ya hibridize olarak ribonükleaz-H için bir substrat oluştururlar. Bu enzim, RNA-DNA dublekslerinden, RNA ipliğini degrede eder. RNAaz-H aktivitesini engellemek için, modifiye olmuş ODN'ler mRNA'ların translasyonunu veya pre-mRNA'nın kesilmesine mani olmaktadır. ODN'ler ve modifikasyonları bu yüzden, çift iplikli DNA'yı hedef alarak, 3' lü heliks oluşumu ile transkripsiyonu inhibe etmek için kullanılmaktadır (5).

siRNA'nın mekanizması: Uzun çift iplikli RNA (dsRNA) RNAaz pol III enzimi olan Dicer tarafından tanınır ve 21-23 nükleotid uzunluğundaki siRNA dublekslerine dönüştürülür (1). Sentetik siRNA (2) veya endogenik siRNA'lar (3) RISC ile etkileşirler bundan dolayı Dicer prosesi bypass olmuş olur. siRNA'lar multiprotein kompleksi olan RISC ile etkileşir (4). RISC kompleksindeki bir helikaz siRNA dubleksini açar ve tek iplikli siRNA'yı içeren RISC mRNA'ya komplementerize olur (5). (6) RISC içinde identifiye olmamış bir RNAaz (silecer) mRNA'yı degrede eder (6).

Ribozimler: Ribozimler, RNA'ya Watson-Crick modeli ile bağlanır ve fosfodiester bağlarının hidrolizini katalizleyerek, hedef RNA'yı degrede etmektedir. Ribozimler birkaç sınıf olup, en çok kullanılan "çekiç başlı" adı ile anılan hammerhead ribozimlerdir.
Hedef mRNA'ya hibridize olduğunda, tek bir sekonder yapı oluştururlar. Ribozimlerde katalitik olarak önemli parçalar, hedef RNA kesim bölgesinin içinde bulunduğu hedef-komplementer sekans ilişkisi ile bağlantılıdır. Ribozim ile kesim magnezyum gibi divalent

iyonlara, hedef RNA yapısına ve hedefe ulaşılabilirliğine gereksinim duyar. Hücre içinde bu hedef RNA ile ribozimin birlikte lokalizasyonu, silencing etkinliğini arttırıcı sinyaller doğurur. Hammerhead ribozimler, kimyasal olarak sentezlenmesi veya vektörlerden transkribe olabilmesi için yeteri kadar kısadır ve hücre de ribozimin devamlı üretimine olanak sağlar (5).

siRNA: RNAaz III (Dicer)enzimi ile dubleks RNA'nın stoplazmik prosesinden türevlenmiştir. Dicer, uzun dubleks RNA'yı keserek, 21-28 nükleotid'lik bir siRNA dubleksini oluşturur. Bu dubleks, 5' fosfat ucunda 2-nükleotid eksik iken, 3' hidoksil (OH) ucunda 2-nükleotid fazla şeklindedir. RNAi mekanizmasının bileşenleri spesifik olarak siRNA'yı tanır ve (RISC) RNA-uyarıcı silencing kompleksi olarak bilinen protein kompleksi ile siRNA'nın tek ipliği ilişkiye girer. mRNA'ları kesen RISC kompleksi, tek iplikli siRNA'nın 5' ucundaki 10 nükleotide komplementer sekanslar içerir. Ribozimler gibi, siRNA'lar da sentetik olarak üretilebilir veya transkribe olan kısa çift iplikli hairpine benzer RNA'lar vektörlerden ifadelenip, daha sonra siRNA'ya dönüşmektedir. siRNA'lar, ODN ve ribozimler gibi memelilerde hedef pre-mRNA'nın degredasyonunda etkin değildir. Birkaç organizmanın, kromatin modifikasyonlarını ve transkripsiyonel olarak bloke edici genlerini hedef almak için, RNAi ile ilişkili mekanizmaları kullandığı hakkında deliller ortaya çıkmıştır. siRNA'lar, kod oluşturmayan RNA molekülleri olan miRNA'lara benzerler. Bu miRNA'lar, gen ekspresiyonunu regüle etmek için hücreler tarafından doğal olarak kullanılır. Olgun bir miRNA tek iplikli 21-22 nükleotid uzunluğunda ve stoplazmada, 70 nükleotid'lik hairpinden meydana gelir. Olgun miRNA'lar, protein kompleksi (miRNP) ile ilişkiye girmekte ve bu kompleks ribozom ile ilişkili olup, miRNA'ya bir kısım komplementer sekanslar içeren mRNA'ların translasyonunu inhibe etmektedir. Mükemmel bir substrat ile sıkı bir komplementerlik oluşursa, miRNA, siRNA gibi davranıp, mRNA degredasyonuna aracılık etmektedir (5).

Gen Silencing Yaklaşımlarının Karşılaştırılması

Bazı araştırıcılar, kültür modellerinde ODN ve siRNA'nın aracılık yaptığı gen tutuklanmasının farklı yönlerini karşılaştırmışlardır. Bu çalışmalardan çıkan sonuçlar pek belirgin değildir, çünkü gen tutuklanmasının etkinliği, ajanın konsantrasyonuna, transfeksiyon tekniğine, hücre tipine, hedef bölge seçimine, kimyasal modifikasyonlarına ve analize edilecek bilgilerin süresine bağlıdır. RNA'ya bağlanan proteinler ve mRNA'da oluşan tersiyer, quarterner yapılar, ODN'ler ile hedef RNA molekülü arasındaki hibridizasyonu etkilediği ve bu varyasyonların siRNA'ların etkisini etkilediğine inanan araştırıcılar incelemelere başlamışlardır. Bu çalışmaların çoğunda, mRNA üzerindeki hedef pozisyonuna bağlı olarak ODN ve siRNA'ların etkinliği arasında bir korelasyon bulunmuştur. Modifiye olmuş fosfotiat ODN'ler toksik olabilir, çünkü, endogenik proteinlere bağlanarak spesifik olmayan bir tavır sergilemektedirler. CpG (sitidin fosfat guanozin) motifi içeren ODN'ler, IFN'nun ifadesini veya diğer başka immün yanıtta oluşan molekülleri uyardığı görülmüştür. Bu uyarı, Toll-Like reseptör (TLR)'e bağlanılması ile oluşur. ODN'lerin bu spesifik olmayan özelliği, bazı ODN'lerin tedavi amaçlı olması sonucunda keşfedilmiştir. Ribozimler, ODN'ler gibi hedeflerine herhangi bir molekülün yardımı olmaksızın hibridize olurlar ve bu hibridizasyon, genlerin baskılanması için ihtiyaç duyulan yüksek konsantrasyon ile ilişkilidir ayrıca, kimyasal olarak modifiye olmuş ribozimler spesifik olmayan etkiler oluştururlar.

RNA lokalizasyon sinyallerinden yararlanma veye RNA şaperon'ları bu problemi çözebilir. Böylece, ribozimin düşük konsantrasyonu ile ilişkili etkili bir gen baskılanmasını sağlamaktadırlar. En son bilgiler, insan ve farelerde ifadelenen TLR'nin, üridin / guanozin veya üridin bakımından zengin olan tek iplikli RNA oligonükleotidler tarafından aktivite olduğunu ispatlamıştır (5). Tek iplikli RNA ile bu TLR'lerin aktivasyonu, plazmositoid dendritik hücrelerin endozomal kısımlarında oluştuğu ve böylece, IFN-γ ve diğer sitokinlerin ifadelenmesine neden olduğu görülmüştür. Kimyasal olarak modifiye olmuş siRNA veya ribozimler, invivo'da hücreye verilip denature olduğunda, siRNA sekansına bağlı olarak, bu özel TLR'leri aktive etmekdedir. Etkili bir gen baskılanması sağlamak için gerekli olan, siRNA'nın düşük konsantrasyonudur. Buna bağlı olarak siRNA'lar spesifik ve hızlı bir şekilde RISC kompleks ile etkileşmekte böylece, spesifik olmayan proteinlere bağlanma potansiyeli azalmaktadır.

Bazı çalışmalar, normal konsantrasyondaki siRNA'ların transfeksiyonunun, gen ekspresiyonunda spesifik olmayan global etkilere neden olmadığını göstermiştir. Memelilerdeki RNAi uygulamaları, gen ekspresiyonunu spesifik olmayan şekilde etkiler, tabiki siRNA konsantrasyonuna, hücre tipine, siRNA ekspresiyonunun moduna ve ajanın hücreye veriliş şekline de bağlıdır. Bu spesifik olmayan etkiler, IFN yanıtının oluşmasından sorumlu genlerin stimülasyonunu içerir hatta, bu çalışmalardaki IFN'yi oluşturan genlerin indüksiyonu, hücresel büyümeyi engellemese de böyledir. Eğer, tam bir IFN yanıtı oluşursa, büyümeyi engelleyebilir. Uzun dubleks RNA ile transfekte olmuş, veya IFN tip 1 ile yada yüksek konsantrasyondaki siRNA ile tedavi edilmiş HeLa hücrelerinin mikroarray gen profillerinin bir kısmı birbiri ile çakışmaktadır. Bu çalışmalarda, tedavi ve araştırma çalışmalarındaki siRNA uygulamalarının potansiyel yan etkileri belirlenmiş ve tanımlanmış efektif siRNA'ların önemi üzerinde durulmuştur. Gen baskılanması için mümkün olan en düşük konsantrasyon kullanılmalıdır. Farelerin, kısa RNA hairpini üreten vektörler ile tedavi edildiğinde, IFN oluşturan genleri uyarması çok ilginç bulunmuştur.

Spesifik olmayan etkileri yanında, nükleik asit bazlı gen baskılayan moleküller, hedefin etkilerini bloke etmeye hazırdır. Hedef etkilerinin yok edilme seviyesi, nükleik asit hibridinin stabilitesine ve baskının moduna bağlıdır. ODN'ler, hedef etkisini bloke etmeye eğilimlidir, çünkü 6 veya 7 sıralı DNA / RNA baz çiftleri RNAaz-H tarafından tanınmaktadır. Bu problemi çözmek için, antisens oligonükleotid gamper adında bir yapı geliştirilmiş, böylece ODN'lerin yaklaşık 10 nükleotidinden sadece bir tanesi RNAaz-H yanıtı göstermiştir. siRNA'lar dikkatlice seçilmez ise, bir mRNA hedefine kısmen komplementer olan siRNA'lar, endogenik miRNA'lar gibi davranıp translasyonu baskılar. Aynı transkripte karşı hedeflenmiş farklı siRNA'lar ile oluşmuş gen ekspresiyon profilleri karşılaştırıldığında, hem siRNA hem de mRNA ipliklerinin 5' uçları arasındaki en az 11-14 nükleotidlik komplementerlik, transkript düzeyinde hızlı bir düşüşe sebebiyet verir. Antisens sekanslar olarak seçilmiş ODN, ribozim DNAzim ve siRNA'lar, seçici olarak tek bir nükleotid ile hedefi diğerlerinden ayırabilir (5).

siRNA'ların Hücrelere Verilimi

ODN'ler ve ribozimler, farklı stratejiler kullanarak in vivo'da başarılı bir şekilde hücrelere verilir. Klinik denemelerde, ODN'lerin en popüler modu, intravenöz injeksiyonudur.

siRNA-, siRNA üreten plasmid veya siRNA üreten virüslerin memeli model organizmalara verilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (5). Bu yöntemler içinde, elektroporasyon ve hem lokal hem de sistemik injeksiyonu yer almaktadır. Çok etkili bir silencing için hücreye verilim yöntemi hakkında genelleme yapmak zordur çünkü hücre içine injeksiyonda, farklı dokuların farklı istekleri söz konusudur. Özellikle farklı boyutlardaki hücreler için fare dokularına siRNA'ların verilmesinde ilk prosedür, fizyolojik solusyondaki siRNA'ların, damar ucuna injeksiyonudur. Bu yöntem ile karaciğerde %90 oranında hedef gen ekspresiyonunun azaldığı görülmüştür. Bu oran akciğer, böbrek ve pankreas'ta daha azdır. Silencing süresi, 1 haftadan fazla sürer ve silencing seviyesi tam net değildir çünkü hayvandan hayvana varyasyonlar mevcuttur. siRNA üreten virusların gelişmesi, özellikle insan hastalıkları için gen terapinin alternatif modudur.

Birkaç çeşit virus, siRNA'ların üretimi için dizayn edilir. Virus çoğunlukla epizomal form'da bulunur yani, konukçu genomuna entegre olması düşüktür. siRNA üreten AAV (Adeno associated vektör)'nin fare beyni içine injeksiyonundan 7 hafta sonra etkili bir silencing sonucu alınmıştır. siRNA üreten Adenovirusun fare karaciğerine damar yolu ile veya fare beynine direk injeksiyonu ile verilimi gen ekspresiyonunda etkili bir baskılanma yaratmıştır. siRNA'lar tedavi amaçlı deneylerde kullanılıcaksa, in vivo'da siRNA'ların hücreye verilmesinde pozitif sonuç elde edilmesi ve Amerika'da FDA tarafından "yetim ilaç" statüsü verdiği kimyasal olarak modifiye edilmiş ODN'lerin hücrey verilimini de kapsayan yöntemler için çalışmaların sürdürülmesi gerekmektedir. Son yıllarda ODN'lerin de içinde bulunduğu birkaç makromolekülün transdermal penetrasyonunu sağlayacak küçük moleküller keşfedilmiş. Akciğerler içine gen enjeksiyonu için kullanılmış aerosol yöntemler, yakın gelecekte siRNA'ların hücrelere iletiminde de benzer şekilde kullanılacaktır (5).

siRNA Bazlı Tedaviler

Birkaç ODN ve ribozim molekülleri klinik denemelerde test edilmiştir. Gözdeki sitomegalovirusun infeksiyonunun tedavisi için, FDA tarafından onaylanmış bir antisens ODN (fomivirsen) geliştirilmiştir. Klinik deneylerde kullanılmış antisens oligonükleotidlerin çoğu, modifiye olmuş fosforatiat ODN veya "gamper" dedikleri ODN'lerdir (5). Fakat bunların hedef RNA'lara afinitesi düşük ve yüksek konsantrasyonda toksisiteye neden olan problemleri vardır. Kimyasal modifikasyonların tiplerini içeren ikinci generasyon antisens oluşumlar, klinik deneylerde kullanılmış ve fosforatiat ODN'ler den daha yararlı olduğu görülmüş. Son çıkan yayınların içerikleri bu farklı ilaçlardan ve onların hedeflerinden bahsetmektedir. siRNA ve onların memeli hücrelerindeki fonksiyonları 3 yıl önce keşfedilmiş fakat henüz klinik denemelerde kullanılması çok erkendir. Klinik programların gelişimi üzerine siRNA bazlı şirketlerin kurulmasından sonra siRNA, tedavi amaçlı gelişimde ODN ve ribozimleri hızlı bir şekilde yakalamıştır.

Birkaç deneme siRNA'nın tedavi amaçlı potansiyel yetisini göstermiş; fulminant hepatitlerden, viral infeksiyondan, sepsisden, tümör gelişiminden ve macular dejenerasyondan fareleri koruduğu kanıtlanmış. Yüksek basınç ile damar ucundan verilen siRNA'lar, fare karaciğer hücrelerinde etkilidir hatta, bir grup araştırıcı, çeşitli karaciğer hastalıkları için tedavi amaçlı ajan olarak siRNA'nın potansiyelini test etmişlerdir (5).

Karaciğerde ifadelenen apoptozis ile ilgili genler olan caspase 8 ve FAS hücre ölüm reseptörlerinin hedeflenmesi ile fare karaciğerini, çeşitli ajanlar tarafından uyarılmış ani gelişen hastalıklardan korumuştur. Diğer bir grup araştırmacı, virus tarafından direk olarak meydana gelen Hepatit B (HBV) infeksiyonunun tedavisi için siRNA'ların tedavi amaçlı potansiyelinin olup olmadığını araştırmıştır. Protein üretimi ve viral replikasyonu etkili bir şekilde azaltmak için, HBV genomunun bazı kısımlarını hedefleyen siRNA'lar hücrelere verilmiştir (5). siRNA virus oranını azaltsada, infeksiyonu sonlandırıcı etkisi başarısızlıkla sonuçlanmıştır. Bu sonuçlar, siRNA'ların tedavi amaçlı potansiyelini ve uygulamalar için pozitif sonuçlar doğurabilecek yöntemler üzerinde çalışmaların yoğunlaşması gerekliliğini göstermiştir.

Nükleik asit bazlı gen baskılanmasının etkinliğini optimize etmek için, birkaç parametreyi incelemek gerekmektedir. Silencing molekül, dokudaki gibi dolaşım sisteminde de stabil olmalı ve toksik etki yaratmadan kan proteinlerine bağlanmalı ancak boşaltım sistemine girmemelidir. Nükleazların etkini azaltmak için kimyasal olarak modifiye olmuş nükleik asitlerin identifikasyonu üzerine denemeler gerçekleşmiş ve bu gerçekleşen denemeler ile tedavi amaçlı gen silencing kullanım sağlanmıştır. Sistemik verilim için yapılan, yapılması gerekli olan oluşumlar, klinik denemelerde modifiye edilmiş fosforatiat ODN'ler için açıklanmıştır. Modifikasyon ODN'nin hedef RNA'sına olan afinitesini azaltsa da in vivoda, stabilite, hücre içinde kalma ve hücresel alınımlarının gelişmesi ile moleküllerin etkinliğini arttırmış. Fosforatiat modifikasyonlar ODN'lerin kan proteinlerine afinitesini arttırır ve nükleazların aktivitesinden ODN'leri uzak tutar.

Tek iplikli spesifik endonükleazlardan korunmuş, siRNA dubleksleri, serumda hem ODN hem de ribozimlerden daha stabildir. Modifiye olmamış siRNA'lar hücreler tarafından tam olarak alınmaz, hatta kan proteinleri için etkili bir afiniteye sahip olmazlar. siRNA'lar tedavi amaçlı kullanılacak ise, modifiye edilirler. Virusların kullanımını içeren gen terapi bazlı platformlar hariçtir. siRNA'ların modifikasyonu, siRNA'nın RISC kompleksi ile etkileşimini engeller (helikaz aktivitesi ile siRNA dubleksinin açılması hedef kesme oranı ve ürün oluşumunu etkiler). Bazı araştırıcılar, iyi bir silencing etkisi yaratıcı ayrıca, siRNA stabilitesini arttırıcı kimyasal modifikasyonları identifiye etmeye başlamışlar. Fosforatiat modifikasyonları siRNA dublekslerini tolere edebilirler ve siRNA'ların hücresel alınımlarını kolaylaştırırlar. İn vivo'da kimyasal olarak modifiye olmuş siRNA'ların etkinliği üzerine bir gelişme yoktur. siRNA'ların yapılarına spesifik olan nükleik asit modifikasyonlarının yeni tiplerini geliştirmek için girişimler başlamıştır (5).

miRNA

miRNA'lar küçük RNA'nın ikinci sınıfıdır. Bitki ve hayvan genomlarının protein kodu oluşturmayan bölgelerinde kodlanır ve Dicer tarafından proses edilir. miRNA'lar RISC'e benzer bir kompleks ile etkileşirler. Hedef mRNA'ya komplementerizasyon derecesine bağlı olarak translasyonel baskılama veye mRNA kesimi oluşmaktadır (7). Bu gizli genlerin çoğu kod oluşturmayan RNA'lardır ve protein için kod veya open reading frame (ORF) içermezler (8). Yaklaşık 22 nükleotidlik RNA'lardır ve RNAi yol izinde gen ekspresiyonunu regüle ederler. miRNA'lar, RNA pol II tarafından (pri-miRNA) primer transkript olarak meydana gelirler. Bu tanskriptler ORF içersin ya da içermesin, splice edilir, poliadenillenir ve mRNA'lara benzerler.

Bir intron veya ekzonda lokalize olmuş stem loop yapısı, fonksiyonel komponenttir. Örneğin miRNA genleri olan mir-106b, mir-93 ve mir-25 protein kodlayan genin intronunda lokalize olmuşlardır. Stem loop yapısı ribonükleaz olan Drosha ve Dicer tarafından proses edilip, olgun miRNA oluştururlar. Bu RNA, RISC kompleksi ile etkileşir ve bu kompleks mRNA'ların baskılanmasını yönlendirir. İnsanda identifiye edilmiş miRNA genlerinin sayısı 300'den yüksek olup, hücre bölünmelerinde ve gelişimsel proseslerde rol alırlar (8).

miRNA Genlerinin Kanserdeki Genomik Değişimler ile ilişkisi

İnsan miRNA'ların çoğu genomlardaki kırılma noktalarının hemen yakınlarında lokalize oldukları görülmüştür (8). Örneğin, kromozom 13q14'teki delesyon yıllardır çalışılmaktadır, kronik lenfosit lenfoma ve birkaç tümörün oluşumuna neden olmaktadır. Bu lokustaki kansere neden olan şüpheli genlerin çoğu, miRNA diziliminden oluşur. Bu dizilim, mir-15a ve mir-16-1 içermektedir. Acaba, bu miRNA'ların delesyonu tümör oluşumunu nasıl etkiler? En son datalar, hem miR-15a ve miR-16, anti-apoptik gen olan BCL-2 genini hedeflemesi ile normal apoptik bir yanıt meydana getirdiğini göstermiştir. Bu bakımdan, bu miRNA'ların tümör supresör olarak fonksiyon göstermesi ve lemfoma hücrelerindeki miR-15a-16'nın yeniden ekspresiyonu, apoptozisi ilerlettiği görülmüş. Buna ilaveten, delesyonlar için miRNA lokusları haritalanmıştır. Bunun bir örneği, akciğer, baş, dil, B-hücre ve foliküler limfomada amplifiye edilmiş 13q31 kromozomu çok iyi bir şekilde çalışılmış. Chr13orf25 (kromozom 13, open reading frame 25) genin ifadelenmesi ile hastalıkların ilişkisi vardır. Bu gen protein oluşturmayan küçük ORF'ye sahiptir. Bu transkripteki miRNA öncüleri miR-17, 18, 19a, 20, 19b ve 92 dir. Bu dizilerden miRNA'ların ekspresiyonunun artması, primer lemfomada ve tümör oluşturan hücrelerin meydana gelmesini tetikler. Tümör oluşumundaki bu miRNA'ların rolleri, Burkitt'in lenfoma için fare modelinde gösterilmiştir.

Kök Hücreler, miRNA'lar ve Kanser

Bir tümördeki hücrelerin bazı bölümlerini inceleyen tümör oluşum modelinde kök hücre özelliklerine sahip oldukları meydana çıkmıştır (8). Bu kanser kök hücreleri, tümör oluşumunu başlatma ve sürdürme özelliğine sahiptir. Halbuki tümör'deki hücre yığınları bazı farklılıklar gösterip, tümorogenik değildirler. Bunun miRNA'lar ile ilişkisi nedir? Tümörler, kök hücrelerini andıran bir biçimde miRNA profili sergiler. Çoğu miRNA'ların ekspresiyonunu azaltırlar fakat miR-17-92 içeren kök hücre miRNA'ların ekspresiyonunu etkilemezler. RNAi ve kök hücrelerin devamlılığı arasında biyokimyasal bir ilişki vardır. Drosophila ve bitkilerde, kök hücre devamlılığı için RISC komponenti olan Argonaute gereklidir. Dicer-1'in mutasyonu tarafından miRNA fonksiyonunun kaybı, Drosophiladaki üreme kök hücrelerinin çoğalmasını azaltmıştır. Siklin bağımlı kinaz inhibitörü olan Dacapo'nun ekspresiyonundaki artış, G1 ve S fazı arasındaki tutuklanmaya yol açmıştır (8). Tahmin edilen miRNA hedef bölgeleri, Dacaponun 3' UTR (Translate edilmemiş) kısmında bulunur. Önemli olan bu bölgelerin kök hücrelerde eksprese olmuş miRNA'lara uygunluğudur. Bir S-faz indüksiyon regülatörü olan p27-Kip1, Dacoponun insandaki homologudur.

Bu gen memelilerdeki bir miRNA hedefi olup olmadığı bilinmiyor, eğer öyle ise, hücre çoğalmasını ilerletmek için onkogenik miRNA'nın ekspresiyonunu engelleyici bir gen sağlanmış olur.

Tedavi Amaçlı miRNA'lar

İnsandaki kanser için miRNA'lar anahtar yapılar sunarsa, potansiyel tedavi amaçlı olarak gözden geçirilir (8). Tedavi amaçlı molekül hücresel alınımı ve serumdaki stabilitesi için modifiye edilmiş nükleik asit özelliğinde olmalıdır. Bir grup araştırıcı, kültüre olmuş hücrelerde miRNA fonksiyonunun antisens inhibitörü olarak modifiye olmuş 2'-O-metil RNA'ların görev yaptığını gözlemlemişler. Bu moleküller miR-17, 92 olan hedef onkogenik miRNA'lar için kullanılır. Tümör suppresör miRNA'lar konusunda istenilen tedavi amaçlı strateji hücrelerdeki fonksiyonlarını arttırmak için olabilir. Serumda stabilize olmuş pre-miRNA'lar bunu başarabilir. Buna bir örnek, per-let-7'nin hücreye verilimi RAS ekspresiyonunu durdurarak tümörün ilerlememesine neden olmasıdır.

Ribozim

Katalitik RNA'lar olarak bilinen ribozimler, intraselüler ortamda aktivitelerini optimize etmek için dizayn edilirler (10). Aktif ribozimlerin kütüphanelerinin hücre içine verilmesi gen işleyişinin identifikasyonuna olanak sağlar. Gen işleyişini saptamak için siRNA kütüphanelerini baz alan RNA bazlı araçlara, ribozim teknolojisi bir alternatif sunmaktadır.

miRNA'nın mekanizması: Pri-miRNA'lar nukleusta transkribe olmaktadır (1). dsRNA'ya spesifik olan Drosha nukleustaki pri-miRNA'yı degrede ederek stoplazmaya verilmeden önce pre-miRNA'ya dönüştürür (2). Exp5 (exportion-5) pre-miRNA'ların nukleustan stoplazmaya geçişinden sorumludur (3). siRNA'lara benzer olarak miRNA'lar dicer tarafından olgun miRNA'ya dönüştürülür ve bir ipliği ribonükleoprotein kompleksi olan miRNP ile etkileşir (4) (RISC kompleksine benzer). miRNA ve hedefi arasındaki baz eşleşmesi RISC kompleksinin mRNA'yı parçalamasına veya proteine translasyonunu durdurmaya sebebiyet verir (6).

İnvivo'da Ribozim Ekspresiyonunu Optimize Etmek

Sekonder yapısının şeklinden dolayı ismi konan "hammerhead ribozim", infekte olmuş bitkide orijinal olarak keşfedilmiş katalitik RNA moleküdür (10). Hammerhead ribozimin kendi başına kesim aktivitesi, tek iplikli yaklaşık 350 nükleotidlik, protein kılıfından yoksun RNA olan "virusoid" moleküllerinin replikasyonu için zorunludur. Hammerhead ribozimler, herhangi bir RNA'yı kesmek için dizayn edilebilir (10). Bu dizayn, ribozimin substrat tanıma kısımlarında yapılır böylece, hedef sekansa komplementer tanıma bölgeleri içerebiliyor. Substrat kesimi, hedef RNA'daki NUX (N, herhangi bir baz ise X, A, C veya U dur.) sekansına göre ayarlanıyor. Dizayn edilen ribozimler, farklı RNA'ları kesebilir. Bu ribozimler, ya hammerhead veya hairpin ribozimlerdir. Ribozimler sentez ve modifikasyonları kolay ve yüksek oranda spesifik durumları ile hedef mRNA'ların ekspresiyonunu regüle ederler.

İn vitroda, ribozimlerin kesim aktiviteleri, hücresel ortamdaki aktiviteleri ile koralasyon göstermek zorunda değildir. Bu yüzden memeli hücrelerindeki spesifik RNA'ların kesimi için ribozimlerin uygulamaları ifade sistemlerinin gelişimine gereksinim duyar (10).

Yüksek İfade Seviyeleri

RNA pol III tarafından tanınan promotorlar, tRNA ve küçük nüklear RNA olan küçük RNA'ların transkripsiyonundan sorumludur(10). Bu sebebten dolayı, Pol III ifade sistemleri, hammerhead, hairpin ribozimler ve siRNA olarak bilinen küçük RNA'ların transkripsiyonunda rol oynar. Pol III transkriptleri, pol II transkriptleri ile karşılaştırıldığında, ekstra sekanslar içermektedir (her transkriptin 3' ve 5' uçlarında polyA ve cap yapısı vardır). Bu özellikler, pol III sistemini ribozim ve siRNA'ların ekspresiyonu için ideal yapıyor yani, transkriptlerin yüksek seviyeleri güçlü aktivite için gereklidir ve ekstra sekanslar inhibitör etkisi yapar. $tRNA^{met}$, $tRNA^{va}$ veya $tRNA^{lys}$ gen promotorunu veya U_1, U_6 veya adenovirus VA1 promotorunu içeren Pol III ifade sistemleri, hücrelerdeki hammerhead ve hairpin ribozimlerin ifadeleri için gereklidir. U_6 promotoru çoğunlukla siRNA ifade vektörleri için kullanılır. Bunun yanında, farklı promotorlardan transkribe olmuş siRNA ve ribozimler sahip oldukları çeşitli özellikleri kendi promotorlarından alırlar (10).

Kanser Biyolojisindeki Araştırmalar

Tümör hücrelerine, hairpin ribozim transfeksiyonu yapılmış ve transforme olmuş hücreler birkaç hücresel proses olan apoptozis, kontak inhibisyonu ve üreme gibi normal regulasyonunu kaybetmiş (10). Hairpin ribozimleri alan hücrelerde tümör supressör gibi regülatör protein fonksiyonu olan bir gen hedeflenmiş ve biyolojik yol izlerinde birkaç yeni genler identifiye edilmiş. Bunların içinde insandaki gene homoloji gösteren D. melanogaster'de "ppan" ve"Mtert"geni keşfedilmiş. Ppan, hücre büyümesinin inhibitörü olarak, Mtert geni ise fibroblast transformasyonunun supressörü olarak identifiye edilmiş.

Metastazi Genlerinin İdentifikasyonu

Kanser hücrelerinin metastazisinde görev yapan genleri identifiye etmek için rastgele dizayn edilmiş ribozim kütüphaneleri kullanılmış. Kanserin erken safhalarında genellikle malignant hücreler lokalize olur. Hastalık ilerlediğinde metastazi için hücreleri uyaran çeşitli genler ifadelenir veya baskılanır. İnvaziv kanser hücrelerinin hareketi, invaziv olmayan veya zayıf invaziv özellik gösteren hücrelerden daha fazladır (10). Metastazinin mekanizması, kompleks ve çoğunlukla bilinmeden kalmıştır. Bu yüzden metastatik proseslerdeki basamakları identifiye etmek için, farklı prosedürler keşfetmişler. Bunlardan ilki, kemotaksi denemesi, rastgele dizayn edilmiş genler yüksek oranda hareketli olan HT1080 hücrelerine verilir. Transfeksiyondan 24 saat sonra ekstraselüler matriks jeli ile çevrilmiş porlu filtre ile ayrılmış kemotaksi denemesine maruz bırakılmış. Kemoattranktant olarak fibronectin içeren bu denemede yüksek konsantrasyon içeren kısımdan daha düşük konsantrasyon içeren kısma doğru bir geçiş olur. 24 saat sonra yüksek konsantrasyonda bulunan çok az seviyedeki hücreler incelenmiş (invaziv olmayan hücreler).

Ribozim taşıyan vektörleri alan bu hücrelerde migrasyonu tetikleyen genler bloke olmuş. İkinci yaklaşım, hücre invazyon denemesi. Bu deneme ilk denemeye benzer, sadece alt kısımın matriks jeli çevrelenmesi hariçtir. Retroviral vektörler (ribozim genlerini içerir)fare fibroblast NIH3T3 hücrelerine verilir. Bu hücreler jel ile çevrelenmiş filtre içinden çok zor geçer ve matriks jeline penetre olmuş hücrelerden RNA izole edilir. Bu RNA'nın, reverse transkripsiyonundan sonra, fibroblastların invaziv aktivitesini sağlayan 8 ribozim bulunmuş. Hücre kültür koşulları fizyolojik durumu tam olarak yansıtmasada, ribozim teknolojisi fare pulmonar tümörogenezis için bir yoldur. Ribozim kütüphaneleri, viral hayat çemberi, apoptik yol izleri, alzhemier hastalığı, kas ve neuronal farklılaşma fonksiyonu gösteren genleri identifiye etmede yararlanılır. Özellikle ribozim kütüphaneleri sinirsel kök hücrelerin farklılaşmasını regüle eden kod oluşturmayan RNA'yı identifiye etmede kullanılır.

siRNA ve Ribozim Kütüphanelerinin Karşılaştırılması

Son yıllarda RNAi, gen baskılanması için güçlü bir araç olarak dikkatleri üstüne çekmiştir (10). C. elegans hücresine dubleks RNA'nın verilmesi sonucunda ilk gen baskılanması ortaya çıktıktan sonra, bitkilerde, D. melanogaster, protozoa ve memeli türlerindeki varlığı saptanmıştır. RNAi mekanizmasında, ekzogenik dubleks RNA'lar 21-23 nükleotidlik siRNA oluştuktan sonra RISC kompleks ile ilişkiye girer. siRNA-RISC kompleksi, sekansa spesifik olarak hedef mRNA'yı keser. Bu reaksiyon, ribozimler tarafından hedef mRNA'nın kesimine benzemektedir. RNAi'nin potansiyel gücü, bilimsel kominitelere, genom analizleri ve gen işleyişleri için işe yarar bir araç olarak bakma cesaretini vermiştir. siRNA ifade vektörlerini ve kütüphanelerini kullanarak memeli genomunun karşılaştırmalı sistemik analizlerini yapılmıştır. siRNA kütüphaneleri ile, TRAIL ile indüklenmiş apoptozis, $P_{53'}$ e bağlı üremenin tutuklanması ve fosfadilinositol 3-kinaz (P13) yol izlerinde yeni komponentler identifiye edilmiştir (10).

Etkinliği ve Hedef Spesifitesi

Ribozim ve siRNA teknolojileri arasındaki en büyük farklılık, siRNA'lar endogenik proteinler ile iş birliği içindedir (10). Halbuki ribozimlerin aktivitesi hücresel faktörlere bağlı değildir. Bu yüzden, siRNA'lar birçok hücresel enzimi kullanır örneğin helikaz ve RNAaz'lar, hedef mRNA'nın kesiminde görev yaparlar. Bundan dolayı, hedef mRNA'ların baskılanmasında ribozimlerden daha etkili bir araçtır. Her iki teknolojide de, hedef bölgelerin seçimi aktiviteyi belirlese de, daha düzenli bir mRNA'nın yapısı siRNA'dan çok, ribozim aktivitesini daha güçlü etkiler. Buna karşın siRNA'ların baskılayıcı aktivitesi, mRNA'nın düzenli yapısından çok, siRNA ve bir grup endogenik protein arasındaki etkileşime bağlıdır. siRNA'ların en önemli dezavantajı, spesifik olmayan baskılayıcı aktivitesidir. Bu baskılayıcı aktivite interferon üretiminin indüklemesi veya hedef olmayan genlere karşı sekansa spesifik silencing etki anlamına gelmektedir. siRNA'nın bir ipliği (antisens) hedef mRNA'ya komplementer, diğer ipliği (sense) değildir. Sense ve antisense iplikler, hedef olmayan mRNA'nın translasyonunu inhibe edebilir. Hedef olmayan genler üzerindeki etkilerin tahmin edilmesi zor olduğundan, bu konuda ribozimler daha düşük aktiviteye sahip olmalarına rağmen, siRNA'ların bir adım önünde bulunmaktadır. Son yıllarda siRNA alanındaki gelişmeler hız kazanmıştır (10).

Örneğin, daha önceleri kullanılan 21-23 mer siRNA'ların nanomolar konsantrasyonları yerine günümüzde 27 mer'lik siRNA'ların pikomolar konsantrasyonları kullanılmaktadır. Bu konsantrasyonun kullanılması, hedef dışındaki etkisini minimize edebilir Ayrıca, siRNA ifade vektörlerini dizayn etmek mümkün; shRNA (short haırpın RNA-sens ve antisens sekansları içermekte, Dicer tarafından shRNA siRNA'ya dönüştürülür.)'nın sadece sens ipliğinin degrede olacağı vektör düzenlenir ve böylece hedef dışı etkileri minimize edilmiş olur. İnterferon uyarılması, sekansa bağlı olmadan spesifik olmayan etki demektir yani, ekzogenik dubleks RNA tarafından immün yanıtın aktive olması demektir. siRNA'lar bu yanıtı uyarmayabilir. Uzun dubleks RNA 30bp'den büyük olursa bu yanıt oluşmaz. Ayrıca, siRNA'nın interferon yanıtını uyardığı ve bu yanıtın oluşmaması için bazı faktörler identifiye edilmiştir. Stem (gövde) bölgesinde bir mutasyonun meydana getirilmesi ile (C→U veya A→G) interferon yanıtı azaltılır. Yalnız bu çözüm dsRNA>100bp olduğu durumlar için geçerlidir.

Antisens Teknolojisinin Çözüm Bekleyen Sorunları

İlk sorun, genlerin insana verilmesini sağlayacak daha kolay ve etkili yöntemlerin bulunmasıdır. Bir başka sorun ise, nakledilen genin hastanın genetik materyalinin hedeflenen bölgesine yerleşmesini sağlamak ve böylece olası bir kanser ya da başka bir düzensizlik riskini ortadan kaldırmaktır (11). Bu konudaki başka bir sorun da, yerleştirilen yeni genin vücudun normal fizyolojik sinyalleriyle etkin bir biçimde kontrolünün sağlanmasıdır. Örneğin insülin, doğru zamanda ve doğru miktarda üretilmediği zaman, hastaya yarar yerine zarar getirecektir. Şu ana kadar yapılan çalışmalar sonrası iyi sonuçlar alınabilmiş fakat kalıcı tedavi çoğu zaman başarılı olamamıştır (11). Bunun bir nedeni, vektörlerin taşıdıkları genin uzun süreli ekspresyonuna izin vermeyişleri, diğeri ise denemelerde etkinlikten çok güvenliğin ön plana çıkmasıdır.

Kanser tedavisi için antisens oligonükleotidleri major kaynak olarak görmeden önce, iki temel zorluğu çözmek gerekmektedir. İlaç verilmesinde en çok aranan özellik basitliktir (12). Oligonükleotidin hücresel alınımı sınırlı ve hücre tipleri arasında varyasyonlar göstermektedir. Örneğin, normal lenfositlerin antisens nükleotidleri çok zayıf aldığı gözlemlenmiştir. Lipozomal taşıyıcılarında içinde bulunduğu çeşitli formülasyonlar sonuçlarına bakılmaksızın denenmiştir. Antisens oligonükleotidlerin direk injeksiyonu en yüksek tümör konsantrasyonlarında verilir fakat sistemik tümör tedavisi için kullanımı limitlidir. Gut epitel hücreleri, antisens oligonükleotidleri çok iyi bir şekilde almaktadır, bu yüzden oral formülasyonu mümkündür ve uygulamalar arasında en çok umut veren olabilir. İkinci çözülmeyen konu, hedef onkogen zaman zaman mı aktif oluyor yoksa, bir tümör hücresi olarak mı kalıyor? Tümör hücreleri bazen hareketsiz kalabiliyor ve büyüme aktivitesi, antisens oligonükleotidin verilmesi ile eş zamanlı olmayabiliyor (12). Şu anki duruma göre, önümüzdeki yıllarda gen tedavisindeki eğilim, genleri istenilen hücrelere en etkin biçimde taşıyabilecek vektörlerin dizayn edilmesi yolunda olacak gibi görünüyor. O zaman, gen tedavisinin daha başarılı sonuçlar vereceği söylenebilir.

Kaynaklar

1. IDT Tutorial. 2005. Antisense Technologies, 1-12.

2. Kurreck, J. 2003. Antisense Technologies improvement through novel chemical modifications. Eur. J. Biochem, 270: 1628-1644

3. Uprichard, S. L. 2005. The therapeutic potential of RNA interference. FEBS Letters, 579: 5996-6007.

4. Aigner, A. 2006. Gene silencing through RNA interference (RNAi) in vivo: Strategies based on the direct applications of siRNAs. Journal of Bıotechnology, 124 (1): 12-25.

5. Dorsett, Y and Tuschl, T. siRNAs:2005. Applications in Functional Genomıcs and Potential as Therapeutics. Nature Biotechnology, 40-51.

6. Rychahou, G. P., Jackson, N. L., Farrow, J. B and Evers, M.B. 2006. RNA interference: Mechnanisms of action and therapeutic consideration. Surgery; 140: 719-25.

7. Matzke, A.M and Birchler, J.A. 2005. RNAi-Mediated Pathways in the Nucleus. Nature Reviews Genetics, 6: 24-35.

8. Hammond, S. M. 2006. MicroRNAs as oncogenes. Current Opinion in Genetics and Development16:4-9.

9. Wienholds, E., Plasterk, H.A.R. 2005. MicroRNA function in animal development. FEBS Letters, 579: 5911-5922.

10. Akashi, H., Matsumoto, S. and Taira, K. 2005. Gene Dıscovery By Ribozyme and siRNA Libraries. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 6: 413-422.

11. Yaşar, Ü. 2006. Gen Tedavisi; Hastalıkların biyolojik temeli III. www.medinfo. hacetttepe.edu.tr/ders.

12. Cunningham, C.C. 2002. New modalities in oncology: antisense oligonucleotides. BUMC,Proceedings,15:25-128.