

## Ribonükleik Asit İnterferansı ve Huntington Hastalığının Moleküler Tedavisi

### Ribonucleic Acid Interference and Molecular Treatment of Huntington's Disease

Caroline PİRKEVİ, A. Nazlı BAŞAK

Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı, İstanbul, Türkiye

Ökaryotların gen regülasyonu ve işlevi hakkındaki bilgimiz ribonükleik asit interferans (RNAi) mekanizmasının tanımlanmasıyla büyük ilerleme kaydetti. Evrim boyunca, türler arasında korunmuş olan bu sistem, çift-sarmallı RNA (dsRNA)'nın tamamlayıcı mRNA parçalarını parçalanmaya sevk edebilmesi üzerine kuruludur. Son yıllarda, bu küçük RNA dizileri biyolojik araştırmalarda gen susturulması için kullanılan çok güçlü bir yöntem haline geldi. Ribonükleik asit interferansı, 1998 gibi yakın bir tarihte tanımlanmış olmasına rağmen, halihazırda tedavi amaçlı araştırmalarda kullanılmaktadır. Gerçekte, dominant geçişli hastalık genleri bu yöntemle susturulmaktadır; bu yüzden, RNAi moleküler tedavide önemli bir kilometre taşı olarak kabul edilebilir. Çeşitli nörodejeneratif hastalıkların hayvan modelleri için RNAi stratejileri geliştirilmektedir ve bu teknik Huntington hastalığı (HH) modellerinde de son beş yıldır kullanılmaktadır. Bu derlemede RNAi mekanizmasını açıkladıktan sonra, bu konudaki gelişmeleri, HH'nin tedavisinde bu yöntemin nasıl kullanılabileceğini ve halen çözümlenmesi gereken sorunları tartışacağız.

*Anahtar Sözcükler:* Gen susturulması; Huntington hastalığı; moleküler tedavi; nörodejeneratif hastalıklar; RNA interferansı.

Our knowledge about gene regulation and function in eukaryotes considerably improved with the discovery of ribonucleic acid interference (RNAi) mechanism. This system, which has been preserved among species throughout evolution, is based on the fact that double-stranded RNAs can trigger breaking down of complementary messenger RNA sequences. Recently, these small RNA sequences have become a powerful tool for gene silencing in biological studies. Despite the relatively recent discovery of RNAi, in 1998, it has already been applied in research for therapeutic purposes. Indeed, dominant disease genes have been silenced with this method, thus RNAi can be considered as an important milestone in molecular therapy. RNAi strategies have been developed for animal models of various neurodegenerative diseases, and this technique has been used in Huntington disease (HD) models for the last five years. In this review, after explaining the mechanism of RNAi, we will discuss the developments in this field, how this method can be used in the treatment of HD and the challenges ahead.

*Key Words:* Gene silencing; Huntington disease; molecular therapy; neurodegenerative diseases; RNA interference.

1980'li yıllara kadar ribonükleik asit (RNA), deoksiribonükleik asit (DNA) ve protein sentezi arasında bilgi akışını sağlayan pasif bir aracı

olarak düşünülürdü. Ribonükleik asitin katalitik özelliklerinin bulunması, Tom Cech ve Sidney Altman'a 1989 yılında bir Nobel ödülü getirdi.

*İletişim adresi: / Correspondence:* Dr. A. Nazlı Başak, Boğaziçi Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Nörodejenerasyon Araştırma Laboratuvarı (NDAL) 34342 Bebek, İstanbul, Türkiye.

Tel: +90 212 - 359 66 79 Faks (Fax): +90 212 - 359 72 98 e-posta (e-mail): basak@boun.edu.tr

Geliş tarihi / Received: 11 Mart 2010 Kabul tarihi / Accepted: 17 Mayıs 2010

Daha sonra, Walter Gilbert “RNA dünyası” deyimini bilime sundu ve günümüzde, hücre biyolojisinde RNA’nın merkezi önemini vurgular hale geldi.

Ribonükleik asitin işlevi, *Caenorhabditis elegans* nematodunda çift-sarmallı RNA’nın (dsRNA) homolog mRNA’ları parçalanmaya sevk ettiğinin bulunmasıyla genişledi. Ribonükleik asit interferansı (RNAi) olarak anılan bu mekanizmayı bulan, Andrew Fire ve Craig Mello, 2006 yılında, Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel ödülüne layık görüldüler.<sup>[1,2]</sup> Ribonükleik asit interferansı, hem evrim sürecince korunmuş gen regülasyonunu düzenleyen yeni bir yolağın anlaşılmasını sağlamış, hem de biyoloji araştırmalarında güçlü bir gen susturma yöntemi olma vaadini sunmuştur. Ribonükleik asit interferansı çok yeni olmasına karşın, bugün PubMed’de arandığında tam 23.047 makaleye ulaşılabilir, bu da hem kavramın ya da yöntemin bilim dünyasında ne kadar çabuk benimsendiğini hem de çok fazla uygulaması olduğunu gösteriyor.

Patogenezi anlaşılamamış birçok kronik hastalıkta, tedavideki en önemli eksiklik, etken maddenin bağlanması gereken hedefin henüz bilinmemesidir. Dolayısıyla, bu tip hastalıklar için günümüzde ancak palyatif ve semptomatik tedaviler uygulanabilmektedir. Bu hastalıkların ilerleyici olması ve bireyi genelde hızla mağdur ederek ölümle sonuçlanması, geleneksel farmakolojik yöntemlerin yanında, RNAi gibi tedavi seçeneklerinin denenmesini ve moleküler tedavinin önem kazanmasını gerektirmektedir. Ribonükleik asit interferansı, herhangi bir genin anlatımını azaltabilen, diziyeye özgü, güçlü bir yöntem olarak birçok hastalığın moleküler tedavisinde kullanılabilecek önemli ve öncü bir strateji olarak gündeme gelmektedir.

### **RİBONÜKLEİK ASİT İNTERFERANSI VE POST-TRANSKRİPSİYONEL GEN SUSTURULMASI**

Ribonükleik asit interferansı evrim boyunca korunmuş bir gen susturma mekanizmasıdır.<sup>[1]</sup> Küçük, kodlamayan ve baskılayıcı mikroRNA (miRNA)’lar gen ifadesini tamamlayıcı (komplementer) hedef mRNA’lara bağlanarak düzenler-

ler. MikroRNA dubleksinin rehber tek sarmallı ile, hedef mRNA arasındaki nükleotit tamamlayıcılığı, hücre içerisinde gen susturma kompleksini aktive eder (RISC: RNA-induced silencing complex; Şekil 1).<sup>[3]</sup>

Hücre içerisinde, genom tarafından kodlanan miRNA’lar daha uzun transkriptlerden meydana gelirler ve olgun, RISC ile bütünleşebilen miRNA’lar üretilebilmek için üç farklı aşamadan geçerler:

1. Birincil miRNA’lar (pri-miRNA: primary miRNA),
2. Öncül miRNA’lar (pre-miRNA: precursor miRNA) ve
3. Dubleks miRNA’lar (Şekil 1).<sup>[4]</sup>

Birincil miRNA’lar, bitkilerde ve hayvanlarda Drosha ve partneri DGCR8 tarafından öncül miRNA’lara dönüştürülür ve bunlar eksportin 5 (XPO5) ile sitoplazmaya taşınırlar. Sitoplazmada, çift sarmallı RNA’yı kesen endoribonükleaz olan “dicer” içeren pre-RISC’e bağlanırlar, işlenirler ve rehber diziyi gen susturma kompleksini içeren holo-RISC kompleksine yüklerler. Argonaute-2 (AGO2), holo-RISC’te de bulunur ve bu mekanizmanın katalitik çekirdeğini oluşturur.<sup>[5]</sup> Rehber dizi hücre içerisindeki ilgili hedef mRNA’ların 3’UTR (untranslated region) bölgesine bağlanır, eğer rehber miRNA dizisi hedef mRNA dizisiyle tamamen eşleşirse, AGO2’nin katalitik bölgesi söz konusu mRNA’nın özgül yıkımına neden olur. Ancak, diziler arası eşleşme kısmi ise, yani tohum dizisinde eşleşme varsa (seed sequence, miRNA’nın ilk 2-8 nükleotidi), translasyonel baskılama olur ve bu, aynı zamanda diziyeye özgü olmayan ve P cisimciklerinin oluşumuyla mRNA’ların degradasyonuna neden olur.<sup>[6]</sup>

Bu mekanizmaya dışarıdan müdahale edebilmek ve hastalığa yol açan bir geni susturmak amacıyla yapay miRNA’lar sentezlenmiştir. Genel olarak, yapay ve baskılayıcı RNA’lar iki gruba ayrılabilir:

- İn vitro sentezlenmiş, çift sarmal, küçük müdahaleci RNA’lar (siRNA: small interfering) ve
- Promotor ile ifade edilen firkete şeklindeki RNA’lar (shRNA: short hairpin RNA) veya

hücre içerisinde plazmid/viral vektörlerle üretilen miRNA'lar (Şekil 2).<sup>[7]</sup>

siRNA'lar yapısal açıdan olgun ve işlenmiş dubleks miRNA'larla benzerlik gösterirler ve çoğu zaman hücreye verildikleri anda RISC kompleksindeki proteinlere açık hale gelirler.<sup>[8-10]</sup> Buna karşılık, shRNA'lar ve miRNA'lar, plazmid transfeksiyonu ya da viral vektör aracılığıyla hücreye verilen DNA şablonundan transkripsiyon ile elde edilirler ve endojen miRNA biyogenez mekanizmasıyla işlenirler (Şekil 1, 2).<sup>[4,7]</sup>

Sonuç olarak, her iki mekanizma da genin susturulmasına neden olur ama yöntemlerin hücredeki ömrü farklıdır:

- siRNA'lar geçicidir ve hedef genin uzun süreli susturulması için tekrarlanarak hücreye verilmeleri gerekir,

- shRNA'lar ve miRNA'lar daha uzun ömürlüdür ve doğru viral vektörle kullanılmaları halinde tek seferde istenilen genin susmasını sağlayabilirler.

Ayrıca, dizi eşleşmesi RNAi mekanizmasında çok büyük önem taşımaktadır. Baskılayıcı miRNA ve hedef mRNA arasındaki tamamlayıcılık düzeyi mRNA'nın susturulup susturulmayacağını ve hangi mekanizmanın tetikleneceğini belirler (translasyonel baskılama/mRNA yıkımı). Eksik eşleşme translasyonel baskılamaya neden olurken, hedef mRNA seviyesini değiştirmez. Buna karşılık, mükemmel miRNA-mRNA eşleşmesi (yaklaşık 19-22 nükleotit), hedef mRNA yıkımına ve söz konusu genin susmasına neden olur.

### NÖROLOJİK HASTALIKLARIN TEDAVİSİNDE RNA İNTERFERANSI

Henüz tedavisi olmayan bazı hastalıklar, RNAi ile moleküler tedaviye adaydır. Patogeneze neden olan moleküler mekanizmaların anlaşılması ve bunların tek gene bağlanması, bazı neoplazileri, enfeksiyonları ve nörolojik hastalıkları, RNAi ile tedaviye çok uygun adaylar konumuna getirmiştir.<sup>[7,11-13]</sup> Bu üç grup hastalık için de tedaviye yönelik RNAi araştırmaları devam etmektedir ve hastalığa neden olan genin susturulmasıyla iyileşme veya tedavi şansı yüksektir.

Dominant geçişli nörodejeneratif hastalıklar, RNAi ile tedavi için ilk akla gelen aday hastalıklardan olmuşlardır. Dominant hastalıklar, mutant gen ürününün, farklı moleküler mekanizmalar sonucu, yeni bir işlev kazanmasından ya da işlev kaybından kaynaklanmaktadır (toksik işlev kazanımı, dominant negatif etki ya da haplo-yetersizlik). İşlev kazanımı/kaybında, hastalığa neden olan genin yok edilmesi yararlı olabilir, ancak resesif kalıtımda olduğu gibi haplo-yetersizlik olduğu zaman, mutant genin susturulması tedaviye yönelik bir fayda sağlamayacaktır, bu durumda, patojenik yolağın alt kısmında yer alan moleküller uygun hedefler oluşturabilmektedir.<sup>[13]</sup>

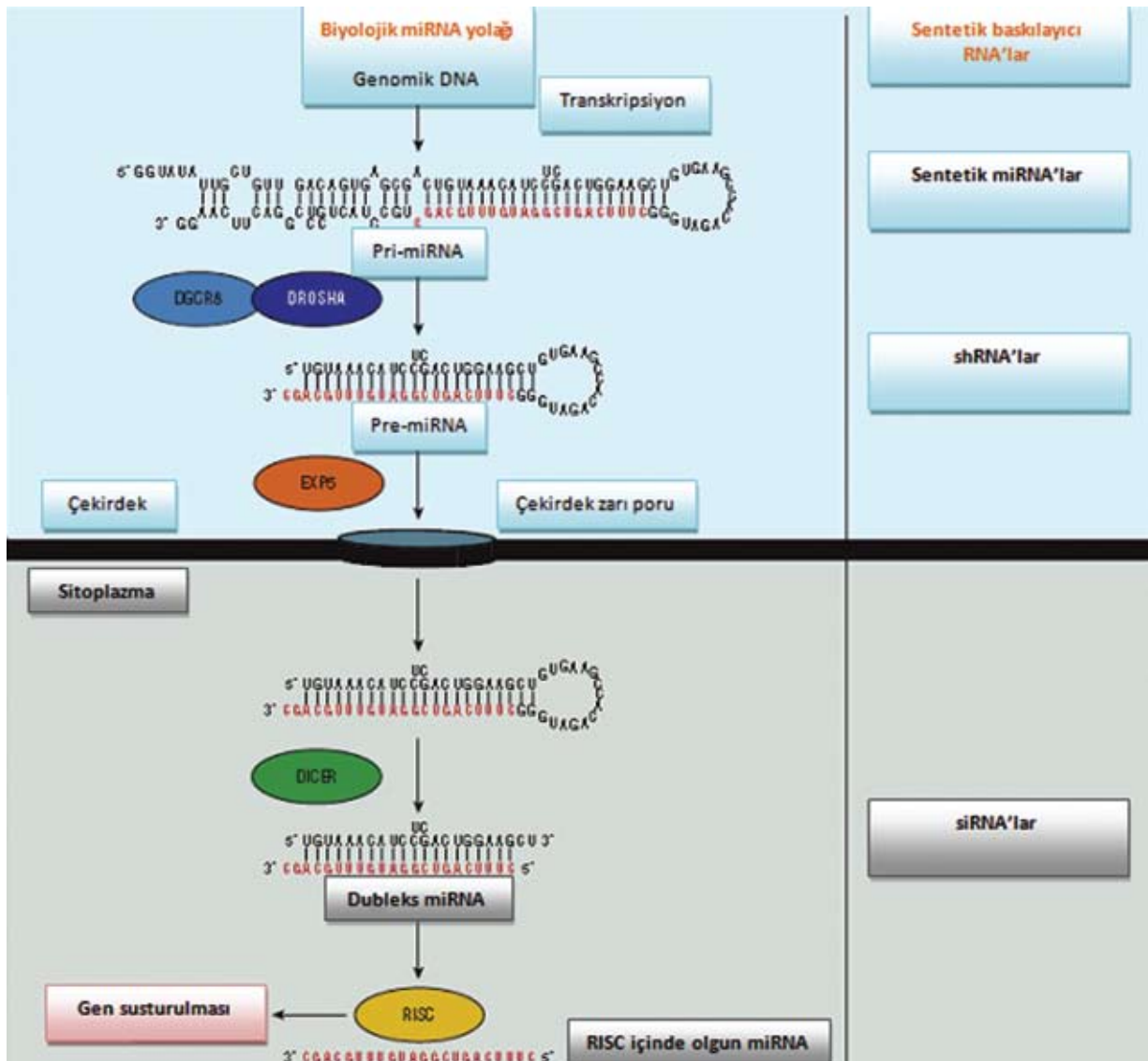
Spinocerebellar ataksi tip 1'de (SCA1), mutant ataksin-1 proteini toksik işlev kazanımı mekanizmasıyla, beyincik ve beyin sapındaki bazı çekirdeklerde nöron ölümüne yol açar.<sup>[14,15]</sup> Ataksin-1 geni olmayan fareler ufak davranışsal bozukluklar sergiler. Bu da, iki alelin birden susturulmasının insanlarda bu gen için işlev kaybına neden olmayabileceğini göstermektedir.<sup>[16]</sup> İndükte edilebilen transjenik fare modelinde ise, hastalık fenotipinin mutant ataksin-1 proteininin ifadesinin engellenmesiyle düzeldiği gösterilmiştir.<sup>[17]</sup> Bu sonuçlar, RNAi ile ataksin-1 ifadesinin azaltılması konusunda ümit verici olmuş ve nörolojik hastalıklarda ilk başarılı RNAi tedavisi, SCA1 transjenik farelerde yapılmıştır. Ataksin-1'e özgü shRNA'lar adenovirüs kullanılarak SCA1 farelere verilmiş ve bunların beyincik hücrelerinde Ataksin-1 geni susturulmuştur. Tedavi edilen hayvanlarda sitolojik, histolojik ve motor iyileşme sağlanmıştır.<sup>[18]</sup> Ayrıca, ataksin-1 shRNA ifadesini sağlayan virüs yabanıl farelerde istenmeyen herhangi bir etki yaratmamıştır. Ancak bu RNAi çalışması, mutant ataksin-1 proteinini, sadece Purkinje hücrelerinde ifade eden farelerde yapılmıştır. Spinocerebellar ataksi tip 1'in tüm beyincik ve beyinsapına yayılmış bir patoloji sergilediği düşünülürse, deneyin belli bir loküsüne tamamlayıcı DNA eklenmiş "knock-in" farelerde de yapılması insana aktarılacak daha gerçekçi sonuçlar verecektir. Buna rağmen SCA1, nörodejeneratif hastalıkların RNAi ile tedavisinde öncü ve daha karmaşık rahatsızlıkların da bu yöntemle tedavi edilebileceği konusunda yol gösterici olmuştur.

Sonrasında, dominant geçişli birçok kalıtsal nörolojik hastalık için RNAi ile tedavi, hayvan modellerinde denenmiş ve:

- Ailesel amiyotrofik lateral sklerozda SOD1 (süperoksid dismutaz 1) geni,
- Alzheimer hastalığında APP (Amiloid öncü “precursor” proteini) geni,
- Parkinson hastalığında alfa-sinüklein geni susturulmuştur.

İyi bir RNAi modeli oluşturabilmek için öncelikle hastalığa yol açan ve dolayısıyla susturulması gereken hedefin belirlenmesi gerekmektedir. Huntington hastalığı (HH) ve SCA gibi “CAG” tekrarı hastalıklarında toksik mekanizmayı akti-

ve eden yanlış katlanmış tek bir protein vardır ve bu proteini kodlayan genin susturulması tedavide doğrudan kullanılabilir. Huntington hastalığı ve SCA’ya neden olan ve nöronlarda işlev bozukluğuna ve ölüme götüren moleküler mekanizma tam olarak çözülememiş olsa da, ana hatlarının bulunmuş olması, tedaviye yönelik yaklaşımların üretilmesini sağlamıştır. Bugüne kadar tedavi alanındaki bu araştırmalar çoğunlukla bu yolağın son bölümüne odaklanmıştır, ama RNAi, hastalığa neden olan genin susturulmasıyla sorunu kökünden çözmeyi hedeflemektedir. Bu derleme kapsamında, HH üzerine yoğunlaşmış, kemirgen modellerin RNAi ile tedavisinde elde edilmiş sonuçları tartışacağız.



Şekil 1. MikroRNA'ların biyogenezi (miRNA dupleksinin rehber tek sarmalı kırmızı ile gösterilmiştir).<sup>[4]</sup>

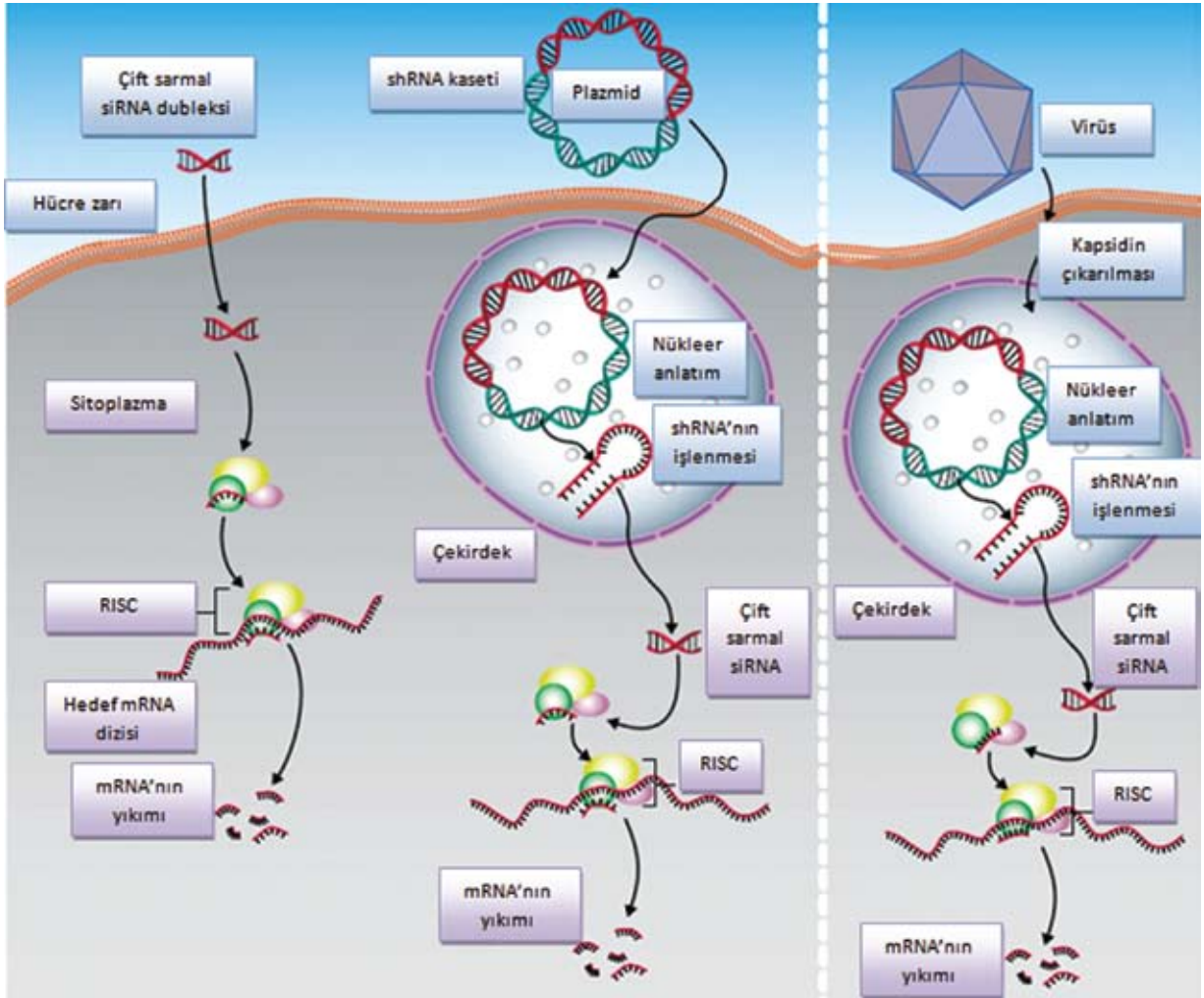
## HAYVAN MODELLERİNDE HUNTINGTON HASTALIĞI'NIN RNAi İLE TEDAVİSİ

Huntington genindeki uzamış CAG üçlüsü tekrarları, otozomal dominant kalıtım gösteren HH'ye neden olur.<sup>[19]</sup> Mutant huntingtin proteini, striyatal ve kortikal nöronların ölümüne, demansa ve hareket bozukluklarına yol açar. Huntington hastalığının tedavisi yoktur; RNAi yöntemi, 2005 yılından bu yana birçok HH araştırmasına konu olmuştur. Her çalışma farklı bir yaklaşımla, farklı fare modellerinde gerçekleştirilmiştir (Tablo 1). Bu araştırmalar, kemirgenlerde, HH fenotipinin, RNAi ile iyileştirilebildiğini göstermiştir.<sup>[20-29]</sup>

İlk yayınlanan çalışmada, "adeno-associated virus 1" (AAV1) kullanılarak shRNA'lar (shHD2.1) kırılmış mutant insan Huntington genini susturmak için HH farelerinde kullanı-

mıştır. AAV.shHD2.1'in striyatumdaki ifadesi HH'ye özgü agregatların azalmasını, dönme hareketi performansının belirgin olarak iyileşmesini ve kısmen bu fare modelinde dengenin normalleşmesini sağlamıştır.<sup>[20]</sup>

Başka bir araştırmada, AAV5 vektörleri kullanılarak HH farelerinin striyatum bölgesine, insan Huntington genine özgü iki farklı shRNA aktarılmıştır.<sup>[21]</sup> shRNA'lardan biri (si-Hunt1) mutant Huntington mRNA anlatımını ve agregat oluşumunu azaltmış ve farelerde nörolojik bozukluğun göstergesi olan, arka bacakların kavramasını düzeltmiştir. Ayrıca, si-Hunt1, HH insan ve fare beyinlerinde azalan striyatal pre-pro enkefalin "ppENK" ve dopaminleaktifleşen adenilil siklaz ve protein kinaz A "DARPP32" mRNA transkriptlerini, tedavi edilen hayvanlarda kısmen normal seviyeye



Şekil 2. Gen susturma stratejileri.<sup>[7]</sup>

**Tablo 1.** Huntington hastalığı için kemirgenlerde yapılan klinik öncesi RNAi ile tedavi çalışmaları<sup>[4]</sup>

Çalışma	Kullanılan baskılayıcı RNA	Aktarıma şekli	Huntington geninin alındığı tür
Harper et al. <sup>[20]</sup>	shRNA	AAV1	İnsan
Rodriguez-Lebron et al. <sup>[21]</sup>	shRNA	AAV5	İnsan
Wang et al. <sup>[22]</sup>	siRNA	Lipozom	İnsan
Machida et al. <sup>[23]</sup>	shRNA	AAV5*	İnsan
DiFiglia et al. <sup>[24]</sup>	siRNA	AAV1/8*	İnsan
Huang et al. <sup>[25]</sup>	shRNA	Adenovirüs	İnsan
Franich et al. <sup>[26]</sup>	shRNA	AAV1	İnsan
Mc Bride et al. <sup>[27]</sup>	shRNA ve miRNA	AAV1	İnsan, fare
Drouet et al. <sup>[28]</sup>	shRNA	Lentivirüs	İnsan, fare, sıçan
Boudreau et al. <sup>[29]</sup>	miRNA	AAV1	İnsan, fare

\*siRNA'lar kolesterol ile modifiye edilmiştir. AAV1: Adeno-associated virüs.

yükseltmiştir. Bu iki öncü çalışma, RNAi'nin HH tedavisinde kullanılabileceğini göstermiştir.

Üçüncü bir in vivo çalışma, kimyası değiştirilmiş sentetik siRNA'ların da, mutant Huntington genini susturmada yararlı olabileceğine işaret etmiştir.<sup>[22]</sup> Lipid kapsülün içinde bulunan siRNA, bir tek intraventriküler infüzyon ile, iki günlük HH farelere verilmiştir. İnsan Huntington genini hedefleyen siRNA (HH Ekson1) bir önceki çalışmada kullanılan shRNA (si-Hunt2) ile benzerlik göstermektedir.<sup>[21]</sup> Real-time PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) yöntemi, tedaviden sonra 7. güne kadar, mutant Huntington transkriptinin belirgin olarak azaldığını ama bu etkinin bir hafta sonra tamamen yitirildiğini göstermiştir. Bu geçici baskılanma, yapısı değiştirilmemiş siRNA'ların, in vivo, kısa ömürlü olmasıyla açıklanabilir. Mutant Huntington geninin kısa süreli susturulması, uzun vadede beklenmedik sonuçları da beraberinde getirmiştir: 14. haftaya kadar, arka bacak kavramasında düzelleme, açık alan davranışında iyileşme gözlemlenmiştir; 8. haftada, dönme hareketini sürdürme süresi artmış, striyatal çökelti azalmış ve yaşam süresinde %14'lük bir artış olmuştur.

Diğer bir çalışmada, kimyası değiştirilmiş ve kolesterole bağlanmış siRNA'lar (cc-siRNA-Huntington) kullanılmıştır. Bu şekilde, hem siRNA'nın in vivo kararlılığı artırılmış hem de hücreye kabulü kolaylaştırılmıştır.<sup>[24]</sup> Tedavi edilen fareler transjenik değildir; HH benzeri fenotip, uzamış mutant insan Huntington geni parçaları içeren adeno-associated virus (AAV) 1/8 vektörünün ergen yabanıl farelere verilmesiyle elde edilmiştir. cc-siRNA'lar, Huntington protei-

ni çökmesini 2. haftaya kadar azaltmış ve arka bacak kavramasını 1. haftaya kadar düzeltmiştir. Uzun vadeli iyileşme gözlenmemiştir. Her iki çalışma da siRNA'ların tekrarlanarak kullanılmasının, Huntington genini etkili bir şekilde baskılayabileceğini ve HH tedavisinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Huntington geninin uzun süreli susturulması bugün için sadece virüslerle sağlanabilmektedir, ancak bu yöntem bütünüyle kontrol edilememektedir: hücreye bir kez shRNA/siRNA verildikten sonra döngü durdurulamamaktadır. Hücre içindeki olası yan etkilerinin halen önlenememesi, yöntemin güvenilirliği konusunda çalışmaların sürdürülmesi gerektiğini göstermektedir. 2009'da yayınlanmış ve bu konuda umut verici olan bir araştırma makalesinde<sup>[28]</sup> sıçanlarda doksisisiklin ile indükte edilebilen shRNA-vektörlerin kullanılmasının, yapay RNAi döngüsünün istenildiği gibi açılıp kapanmasını sağladığı bildirilmiştir.

Tablo 1'de listelenen ve 2009 yılına kadar yapılmış araştırmalar, alele özgü olmayan yaklaşımlardır: iki normal Huntington aleli taşıyan fare ya da sıçan modellerinde, mutant insan Huntington geni ifade edilip susturulmuştur. İnsanlarda sağlıklı ve mutant, her iki Huntington alelinin susturulmasının ne gibi sonuçlar doğuracağı henüz bilinmemektedir. Drouet ve ark.<sup>[28]</sup> mutant ve normal Huntington genlerinin, alel ayırmaksızın, aynı nöron içerisinde susturulmasının, HH'ye bağlı histopatolojiyi düzelttiğini göstermişlerdir. Paralel bir çalışmada, mutant insan ve normal fare Huntington genlerinin, aynı nöronlarda birlikte susturulmasının HH'ye bağlı

hareket bozukluklarını, striyatal enjeksiyonun 11. haftasında, düzelttiği bildirilmiştir.<sup>[29]</sup>

Yeni bir çalışmada, hücre deneylerinde, alele özgü hedeflemenin mümkün olduğu vurgulanmıştır.<sup>[30]</sup> Huntington hastalığındaki CAG artışı ile kalıtılan SNP (Single Nucleotide Polymorphisms)'lerin kullanılması yakın bir gelecekte, sadece mutant Huntington geninin susturulabileceğini göstermektedir.

### **RİBONÜKLEİD ASİT İNTERFERANSI İLE TEDAVİDE İSTENMEYEN ETKİLER**

Birçok biyoteknoloji firması, siRNA'ların tedavide kullanılması için klinik araştırmalarını sürdürmektedir, bunların çoğu faz I veya faz II aşamalarında:

- *Acuity Pharmaceuticals, Merck-Sirna Therapeutics, Quark Pharmaceuticals ve Silence Therapeutics*: Maküler dejenerasyon

- *Nucleonics*: Hepatit B

- *City of Hope National Medical Center ve Benitec*: AIDS (edinilmiş bağışıklık eksikliği sendromu )

- *Calando Pharmaceuticals*: Tümörler

- *Transderm ve the International Pachyonychia Congenita Consortium*: Pachyonychia congenita

- *Alnylam Pharmaceuticals*: RSV'ye (Respiratory Syncytial Virus) bağlı alt solunum yolları enfeksiyonları ve HH, üzerinde çalışmaktadırlar.

Bu çalışmalarda kullanılan tedavi edici etken madde, sentetik ve kimyası değiştirilmiş siRNA'lar olmuştur. Huntington hastalığı çalışan Alnylam şirketi haricinde, nörolojik hastalıkların bu klinik araştırmalara dahil edilmesinin nedeni, beynin özelliklerinden kaynaklanmaktadır. Başlıca sorun, küçük RNA'ların güvenilir ve etkili bir biçimde kan-beyin bariyerini aşarak post-mitotik nöron hücrelerine ulaştırılmasıdır. Aynı zamanda, uzun süreli bir iyileşme sağlanabilmesi için, nörolojik hastalıkların doğası gereği, RNAi yönteminin tekrarlanarak kullanılması gerekecektir. Nörolojik hastalıkların tedavisinde RNAi yaklaşımı dört soruya yanıt vermelidir:

- Küçük RNA'yı hücre içine taşıyacak en uygun genetik materyal plazmid mi yoksa virüs müdür?

- siRNA hücre içine nasıl aktarılmalıdır?

- Başlıca anatomik hedef neresidir?

- Hastalık süreci boyunca tedavi ne zaman verilmelidir?

Ayrıca, hastalığın klinik öncesi çalışılacağı da göz önünde bulundurularak, iyi bir hayvan modeli olması gerekmektedir. siRNA'ların tedavide kullanılmaya başlanması bu moleküllerin güvenilirliğini de gündeme getirmiştir.

### **Dış kaynaklı RNAi moleküllerinin endojen RNAi mekanizmasını doyurması ve miRNA yolağının bozulması**

Farelerin karaciğerinde Pol III promotörü ile ifadesi sağlanan shRNA'ların hayvanların ölümlüne yol açması, RNAi yönteminin tehlikelerine işaret etmiştir.<sup>[31]</sup> Yapılan sonraki çalışmalarda bu ölümlerin miRNA'ların çekirdekteki sitoplazmaya taşınmasını sağlayan eksportin 5 (XPO5) proteininin dışarıdan verilen fazla miktardaki siRNA'lar tarafından satüre edildiği ve dolayısıyla, hücre içerisindeki işlevini yapamadığı gösterilmiştir. Huntington hastalığında yapılan tedaviye yönelik bir RNAi araştırması ise, üç shRNA'dan ikisinin Huntington genini susturduğunu, ama aynı zamanda, gen ifadesinin artışından dolayı bu shRNA'ların nörotoksik olduğunu kanıtladı.<sup>[27]</sup> Dış kaynaklı siRNA'ların yüksek miktarda verilmesi, RNAi mekanizmasında yer alan proteinlerin normal işlevlerini gerçekleştirememelerine ve hücre içindeki miRNA'ların işlenememelerine yol açmaktadır. Bir endojen miRNA'nın yüzlerce genin ifadesini düzenlemesi, miRNA yolağında, ilk bakışta önemsiz gibi görülebilecek bir değişikliğin, hayati sonuçlar doğurmasına neden olmaktadır.<sup>[32,33]</sup> Bu sorun dış kaynaklı siRNA'ların, dicer substratı olacak şekilde (daha uzun sentezlenerek -21 baz-) ve iyileşme sağlayabilecek en düşük konsantrasyonda hücreye verilmeleriyle aşılabilmektedir.<sup>[10]</sup> Az miktardaki siRNA'ların, RNAi mekanizmasını doyurmaları beklenmese de dış kaynaklı siRNA'ların, endojen miRNA'larla RISC'e girmek için yarışır hale gelmelerinin uzun vadede hücre içerisinde nasıl etkileri olacağı bilinmemektedir.

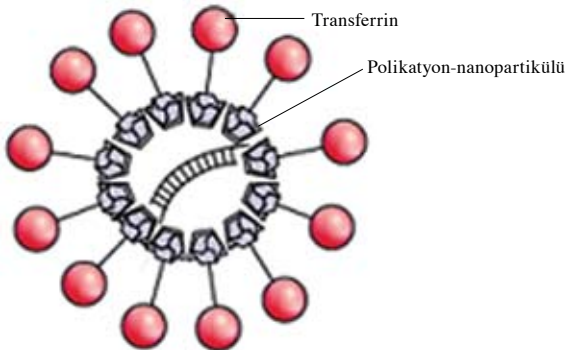


### Ribonükleid asit interferansında diziyeye özgü hedef-dışı etkiler

Biyoinformatik uzmanlarının istenmeyen hedef-dışı bağlanmaları önlemek için siRNA seçiminde algoritmalar üretmelerine rağmen, hücrelere aktarılan bu siRNA'ların beklenmedik genlerin susturulmasına neden oldukları gözlenmiştir.<sup>[34]</sup> Huntington hastalığında yapılan tedaviye yönelik bir RNAi araştırmasında, kullanılan AAV.siHunt2 ifadesinin yabancı farelerin striyatumlarında, anormal gen ifadesi profillerine yol açtığı gösterilmiştir.<sup>[35]</sup> Bu etkinin, bilinmeyen bir transkripsiyon faktörünün, kullanılan siRNA dizisine bağlanması sonucu, susmasıyla oluştuğu sanılmaktadır. "Microarray" teknolojisinin yaygın olarak kullanılmasıyla da, yabancı siRNA'ların hücre içerisinde hem hedeflenen, hem de hedeflenmeyen genlerin susturulmasıyla sonuçlandığı gösterilmiştir. siRNA'nın tohum dizisinden 6-7 nükleotit kadar küçük bir bölgesinin herhangi bir genin 3'UTR bölgesiyle tamamlayıcı olması bu hedef dışı etkiye yol açmaktadır.<sup>[34,36]</sup> Eksik eşleşmenin translaşyonel baskılamaya neden olması, (hedef mRNA düzeyini değiştirmemesi), ama "Microarray" yönteminin sadece mRNA düzeyini göstermesi, ifade düzeyindeki hedef dışı etkinin önemini anlayamamıza neden olmaktadır. Ancak, bazı kimyasal değişikliklerle (örn. 2'-O-Me modifikasyonu) bu sorunun en aza indirgenmesi sağlanmıştır.<sup>[37]</sup>

### siRNA'nın bağışıklık sistemini uyarması

RNAi mekanizması viral enfeksiyonlara karşı koruma amaçlı gelişmiş ve büyük olasılıkla da bu nedenden dolayı evrim boyunca korunmuş-



Şekil 3. Transferrin-siklodekstrin polikasyon nanopartikülü.<sup>[40]</sup>

tur. Bu özellikleri nedeniyle, bazı durumlarda, siRNA'lar Toll-like reseptörlerin agonistleri gibi davranmaktadırlar.<sup>[38]</sup> Guanozin ve/veya üridin içeren dizilerin bağışıklık sistemini tetiklediği görülmüştür. Bağışıklık sistemini sadece belirli diziler değil, siRNA molekülünün yapısı, hücreye verilmiş biçimi ve hücre tipi de uyarılmaktadır.<sup>[39]</sup> Bu sorunun çözülmesi, siRNA'yı immün sisteme görünmez kılacak kimyasal değişiklikler yapmaktan ve doğru bir taşıyıcı molekül bulmaktan geçmektedir.

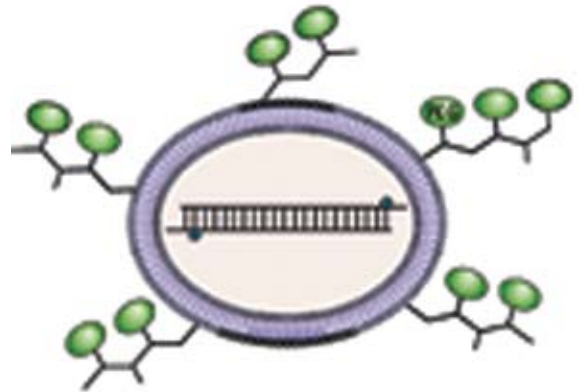
### TEDAVİDE siRNA'LARIN HÜCREYE AKTARILMASI

• siRNA'lar kimyasal değişiklikler uygulanarak hazırlanır (örneğin 2'-O-metilüridin veya 2'-fluoroüridin). Kolesterol molekülünün de yapısı değiştirilmiş siRNA'lara bağlanarak kararlılığının artırılması sağlanabilir.

• Transferrin gibi yüzey ligandları içeren polikasyon nanopartikülleri, hedef hücrelerin reseptörlerine bağlanarak siRNA'ları hedef hücrelere ulaştırmaktadır (Şekil 3).<sup>[40]</sup>

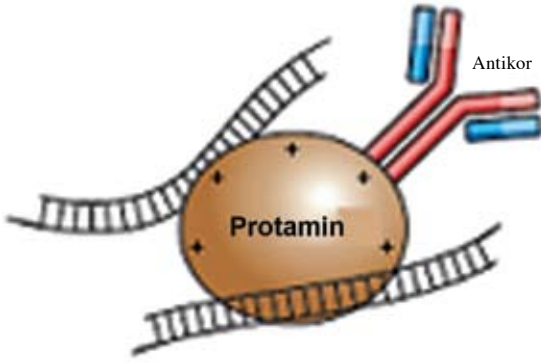
• Katyonik ya da nötr lipid çift katmanı, dışı doğru uzayan polietilen glikol (PEG) molekülleri içerir. siRNA'lar, bu kararlı nükleotid-lipid partikül (SNALP) yapısı içinde bulunur ve doğrudan hücre tarafından endozomla alınır (Şekil 4).<sup>[40]</sup>

• MEA-DPC'ler (Masked Endosomolytic Agent-Dynamic PolyConjugates) SNALP'lara benzerler, ama daha küçüktürler ve siRNA'nın hedef hücreye taşınabilmesi için özgün bir ligand içerirler. Endozom tarafından salınım da, MEA-DPC'deki pH'ya duyarlı bir bağ sayesinde kolaylaştırılmıştır.



Şekil 4. SNALP (Polyethylene glycol polymer chains).<sup>[40]</sup>





Şekil 5. Pozitif yüklü antikor yapısı.<sup>[40]</sup>

• Spesifik antikorların, protoamin gibi pozitif yüklü moleküllere bağlanması, siRNA'ların uygun reseptörü içeren belirli hücre gruplarına verilmesini sağlamaktadır (Şekil 5).<sup>[40]</sup>

• Aptamer-siRNA kimerik moleküller de uygun reseptörü içeren hedef hücre tarafından kabul edilebilir. Aptamerler, belirli reseptörlere bağlanmaları için in vitro hazırlanmış nükleik asitlerdir.

Sonuç olarak, RNAi olarak bilinen mekanizmada, çift sarmallı RNA'lar kendi homolog mRNA'larının parçalanmasına neden olur. Bu yöntem, otozomal dominant nörodejeneratif hastalıkların tedavisi için umut vericidir; RNAi, HH'ye neden olan Huntington hastalığı genini susturmak için birçok kemirgen modelinde kullanılmış ve bu hayvanların HH'ye bağlı nöropatolojilerinin ve hareket yeteneklerinin kısmen düzeldiği görülmüştür. Bu amaçla kullanılan RNAi yönteminde, kısa ömürlü siRNA'nın mı, yoksa plazmid/virüs ile hücreye taşınabilecek uzun ömürlü shRNA'nın mı tedaviye daha uygun olduğunu ilerleyen çalışmalar gösterecektir. Bunların insan beyni üzerindeki immün reaksiyonlar gibi olası yan etkileri, primatlar üzerinde yapılacak deneyler sonucunda kesinlik kazanacaktır. Geride bıraktığımız yirmi yıllık dönemde kazanılan deneyim ve birikim yakın gelecekte klinik çalışmalarda hedefe-özü ve alay-ayırıcı yaklaşımların gelişmesini sağlayacaktır.

#### 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. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009;136:215-33.
4. Harper SQ. Progress and challenges in RNA interference therapy for Huntington disease. *Arch Neurol* 2009;66:933-8.
5. Tolia NH, Joshua-Tor L. Slicer and the argonauts. *Nat Chem Biol* 2007;3:36-43.
6. 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.
7. Davidson BL, Paulson HL. Molecular medicine for the brain: silencing of disease genes with RNA interference. *Lancet Neurol* 2004;3:145-9.
8. Zeng Y, Wagner EJ, Cullen BR. Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol Cell* 2002;9:1327-33.
9. Davidson BL, Harper SQ. Viral delivery of recombinant short hairpin RNAs. *Methods Enzymol* 2005;392:145-73.
10. Amarzguioui M, Lundberg P, Cantin E, Hagstrom J, Behlke MA, Rossi JJ. Rational design and in vitro and in vivo delivery of Dicer substrate siRNA. *Nat Protoc* 2006;1:508-17.
11. Izquierdo M. Short interfering RNAs as a tool for cancer gene therapy. *Cancer Gene Ther* 2005;12:217-27.
12. Ketzinel-Gilad M, Shaul Y, Galun E. RNA interference for antiviral therapy. *J Gene Med* 2006;8:933-50.
13. Gonzalez-Alegre P. Therapeutic RNA interference for neurodegenerative diseases: From promise to progress. *Pharmacol Ther* 2007;114:34-55.
14. Paulson H, Ammache Z. Ataxia and hereditary disorders. *Neurol Clin* 2001;19:759-82.
15. Humbert S, Saudou F. Toward cell specificity in SCA1. *Neuron* 2002;34:669-70.
16. Matilla A, Roberson ED, Banfi S, Morales J, Armstrong DL, Burright EN, et al. Mice lacking ataxin-1 display learning deficits and decreased hippocampal paired-pulse facilitation. *J Neurosci* 1998;18:5508-16.
17. Zu T, Duvick LA, Kaytor MD, Berlinger MS, Zoghbi HY, Clark HB, et al. Recovery from polyglutamine-induced neurodegeneration in conditional SCA1 transgenic mice. *J Neurosci* 2004;24:8853-61.
18. Xia H, Mao Q, Eliason SL, Harper SQ, Martins IH, Orr HT, et al. RNAi suppresses polyglutamine-induced neurodegeneration in

- a model of spinocerebellar ataxia. *Nat Med* 2004;10:816-20.
19. Huntington's Disease Collaborative Research Group. *Cell* 1993;72:971-83
  20. Harper SQ, Staber PD, He X, Eliason SL, Martins IH, Mao Q, et al. RNA interference improves motor and neuropathological abnormalities in a Huntington's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:5820-5.
  21. Rodriguez-Lebron E, Denovan-Wright EM, Nash K, Lewin AS, Mandel RJ. Intrastratial rAAV-mediated delivery of anti-huntingtin shRNAs induces partial reversal of disease progression in R6/1 Huntington's disease transgenic mice. *Mol Ther* 2005;12:618-33.
  22. Wang YL, Liu W, Wada E, Murata M, Wada K, Kanazawa I. Clinico-pathological rescue of a model mouse of Huntington's disease by siRNA. *Neurosci Res* 2005;53:241-9.
  23. Machida Y, Okada T, Kurosawa M, Oyama F, Ozawa K, Nukina N. rAAV-mediated shRNA ameliorated neuropathology in Huntington disease model mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;343:190-7.
  24. DiFiglia M, Sena-Esteves M, Chase K, Sapp E, Pfister E, Sass M, et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:17204-9.
  25. Huang B, Schiefer J, Sass C, Landwehrmeyer GB, Kosinski CM, Kochanek S. High-capacity adenoviral vector-mediated reduction of huntingtin aggregate load in vitro and in vivo. *Hum Gene Ther* 2007;18:303-11.
  26. Franich NR, Fitzsimons HL, Fong DM, Klugmann M, During MJ, Young D. AAV vector-mediated RNAi of mutant huntingtin expression is neuroprotective in a novel genetic rat model of Huntington's disease. *Mol Ther* 2008;16:947-56.
  27. McBride JL, Boudreau RL, Harper SQ, Staber PD, Monteys AM, Martins I, et al. Artificial miRNAs mitigate shRNA-mediated toxicity in the brain: implications for the therapeutic development of RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:5868-73.
  28. Drouet V, Perrin V, Hassig R, Dufour N, Auregan G, Alves S, et al. Sustained effects of nonallele-specific Huntingtin silencing. *Ann Neurol* 2009;65:276-85.
  29. Boudreau RL, McBride JL, Martins I, Shen S, Xing Y, Carter BJ, et al. Nonallele-specific silencing of mutant and wild-type huntingtin demonstrates therapeutic efficacy in Huntington's disease mice. *Mol Ther* 2009;17:1053-63.
  30. Pfister EL, Kennington L, Straubhaar J, Wagh S, Liu W, DiFiglia M, et al. Five siRNAs targeting three SNPs may provide therapy for three-quarters of Huntington's disease patients. *Curr Biol* 2009;19:774-8.
  31. Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, et al. Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* 2006;441:537-41.
  32. Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008;455:64-71.
  33. Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 2008;455:58-63.
  34. Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilesley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, et al. 3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets. *Nat Methods* 2006;3:199-204.
  35. Denovan-Wright EM, Rodriguez-Lebron E, Lewin AS, Mandel RJ. Unexpected off-targeting effects of anti-huntingtin ribozymes and siRNA in vivo. *Neurobiol Dis* 2008;29:446-55.
  36. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:1892-7.
  37. Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, et al. Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing. *RNA* 2006;12:1197-205.
  38. Agrawal S, Kandimalla ER. Role of Toll-like receptors in antisense and siRNA [corrected] *Nat Biotechnol* 2004;22:1533-7.
  39. Judge AD, Sood V, Shaw JR, Fang D, McClintock K, MacLachlan I. Sequence-dependent stimulation of the mammalian innate immune response by synthetic siRNA. *Nat Biotechnol* 2005;23:457-62.
  40. Castanotto D, Rossi JJ. The promises and pitfalls of RNA-interference-based therapeutics. *Nature* 2009;457:426-33.