

# RNAi

Bilim insanlarının bazen laboratuvarında deneyler yaparken tesadüfen önemli bir keşif yaptıklarını ve bu keşifleriyle Nobel Ödülü aldıklarını duysanız inanır mısınız? Peki, bilim tarihinde çok sayıda olağanüstü buluşun bu şekilde tamamen tesadüfler sonucu yapıldığını duysanız? Herhalde bu ifadelere kuşkuyla yaklaşsınız. İnanmak zor ama gerçekten bilimde çok sayıda önemli keşif, tamamen şans eseri yapılmıştır. Aşağıda okuyacağınız satırlar böyle bir senaryo ile gerçekleşen ve moleküler yaşam bilimlerinde çığır açan bir keşfi anlatıyor. RNAi'nin keşfi 2006 yılı fizyoloji ve tıp alanında Nobel aldı ve sadece hastalıkların nedenleri hakkında bize bilgi sağlamakla kalmayıp daha şimdiden bazı hastalıkların tedavisi için ümit kaynağı oldu.

**G**enetik bilimci Richard Jorgensen, 1986 yılında yeni bir biyoteknoloji şirketinin kuruluşuna yardım ediyordu. Ondan çiçeklerin genleriyle oynayarak olağanüstü güzellikte, koyu renkli çiçekler üretmesi istenmişti. Şirketi kurmak için büyük bir sermaye gerekiyordu ve yatırımcıların ilgisini çekmenin en iyi yolu, onlara daha önce var olmayan güzellikte çiçekler göstermekti. Böylece ikna edilen yatırımcılardan parasal destek alınacaktı. Jorgensen'in düşüncesi, çiçeklere renk kodlayan genleri aktarıp onların renklerini daha da koyulaştırmaktı. O günlerin moleküler biyoloji teknikleriyle her tür bitkinin genleriyle oynamıyordu. Ama petunya bitkisine gen aktarımı gerçekleştirilmişti. Ayrıca petunyanın yetiştirilmesi de kolaydı. Bu nedenle Jorgensen çalışmalarını petunya üzerinde yoğunlaştırdı. İlk olarak mor renkli petunyanın renklerini daha da koyulaştırmaya karar verdi. Mor rengi kodlayan gen daha önce izole edilmiş ve dizilimi de belirlenmişti. Bu da işi kolaylaştıracaktı. Eğer mor renk genini petunyalara aktarırsa bitkiler bu geni çalıştırarak daha fazla mor renk pigmenti üretecekler ve sonuçta çiçeklerinin rengi koyulaşacaktı. Kâğıt üzerinde bu son derece mantıklı ve basit bir yaklaşımdı. Fakat Jorgensen mor renk genini petunyalara aktardığında sonuç hiç de beklediği gibi olmadı. Koyu mor renkli petunyalara yerine ya bembeyaz ya da yer yer beyaz veya mor olan petunyalara elde etti. Böyle garip bir sonuç elde edince Jorgensen'in ilk düşündüğü petunyalara aktardığı gende bir anormallik ol-

duğuydu veya deneyleri yaparken bir hata yapmıştı. Onun için her şeye baştan başladı ve işlemleri tekrarladı. Bu sefer aktardığı gende bir hata olmadığından kesinlikle emindi. Ama sonuç değişmedi; petunyalara istediği gibi daha koyu mor değil ya tamamen ya da yer yer beyaz oldular. Jorgensen elde ettiği sonuçların nedenini açıklayamamıştı ama onları yayımlamaktan da geri kalmadı. Makaleyi okuyan diğer bilim insanları da Jorgensen'in bulgularına ilk anda bir anlam veremediler. Bu beklenmedik olayın arkasındaki sır perdesinin aralanması yaklaşık on yıl aldı.

Jorgensen'in vardığı sonuçların nasıl oluştuğuna geçmeden önce konunun daha iyi anlaşılması için kalıtımın mekanizmasını ana hatlarıyla hatırlatalım.

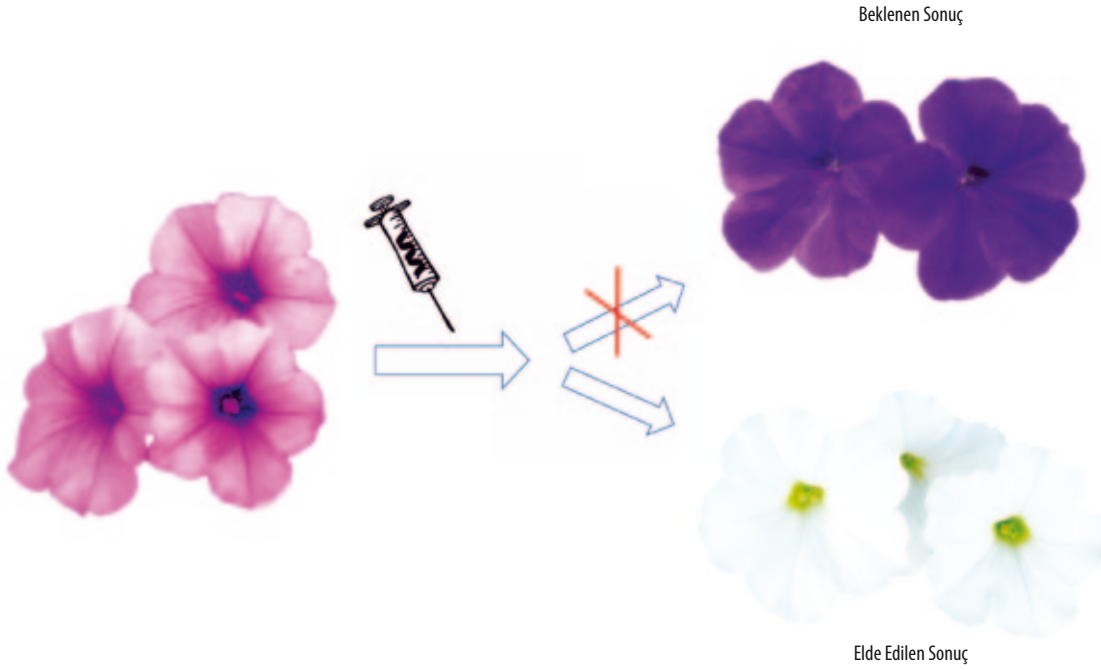
Canlılara özelliklerini kazandıran, onların her bir hücresinin çekirdeğinde yer alan DNA ve onda kodlu bilgilerdir. Milyonlarca yıl önce yaşamış olan dinozorlara o görkemli yapıyı kazandıran, kartalın uçmasını, yunus ve balinanın yüzmesini veya yeşil yapraklı bitkilerin fotosentezle güneş enerjisini kullanmasını sağlayan hep DNA'da yüklü bilgilerdir. Bütün bu özelliklerin gerisindeki molekül olan DNA, sadece dört harfi olan bir alfabe ile yazılmıştır ki bu açıdan bakınca yukarıda saydığım ve var olan milyarlarca farklı organizma türü, bu dört harfle yazılmış farklı kitaplar gibidirler. A, G, T ve C harflerinin (A=Adenin, G=Guanin, C=Sitozin, T=Timin) binlerce veya milyonlarcasının belli sırayla bir araya gelmele-

## Anahtar Kavramlar

Bilim insanları tesadüf eseri, organizmanın gelişiminin kontrolünden virüslere karşı hücreyi korumaya kadar değişik görevleri olan ve bu görevlerini genleri susturarak yerine getiren RNA moleküllerinin varlığını keşfettiler.

Bu küçük RNA'ların genleri nasıl susturduğu öğrenilince, laboratuvar şartlarında daha önce birkaç yılı alan gen susturma çalışmaları birkaç saat içerisinde yapılabilir hale geldi. Böylece araştırmacılar üzerinde çalıştıkları geni hücrelerde susturarak onun görevlerini ve nasıl çalıştığını öğrenmeye başladılar.

RNA enterferansı, mutasyona uğrayarak hastalığa neden olan genlerin susturularak hastalığın tedavi edilebilmesi için de kullanılabilir. Şimdilik laboratuvar ve hayvan çalışmaları ile sınırlı kalmakla beraber elde edilen sonuçlar bu metodun bir gün insan hastalıklarının tedavisinde kullanılabileceğini gösteriyor.



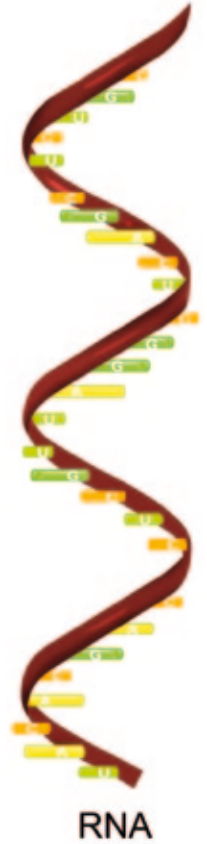
Genetik bilimci Richard Jorgensen mor renk genini petunyalara aktararak çiçeklerin renklerini koyulaştıracağını düşünmüştü. Fakat mor renk genini aktardığında koyu renkli mor petunyalara yerine ya pembeyaz ya da yer yer beyaz veya mor olan petunyalarda elde etti. Bu sonuç organizmada o güne kadar varlığı bilinmeyen ve "RNA enterferansı" adı verilen bir mekanizmanın varlığını ortaya çıkardı.

ri ile yazılan kelimeler farklı özellikleri belirleyen ve gen adını verdiğimiz ünitelerdir. İnsanı oluşturan kitap aslında 23 ciltten oluşan bir ansiklopedi seti gibidir. Bu örnekte her bir cilt bir kromozoma denk gelir. Her hücremizde bu ansiklopedi setinden iki adet bulunur. Çünkü setin biri babamızdan diğeri ise annemizden gelmiştir. Her bir set üç milyar harfle yazılmıştır. Dolayısıyla vücut hücrelerimizin çekirdeğinde (yumurta ve sperm hücreleri hariç) altı milyar harften oluşan DNA ve onun oluşturduğu 46 kromozom bulunmaktadır. Yumurta ve sperm hücrelerinde bu sayı yarıya inmiştir, yani üç milyardır. Ancak yumurta ve sperm yeni bir canlı oluşturmak için bir araya geldiğinde bu sayı yeniden altı milyara çıkar. DNA fiziki olarak hücrenin çekirdeğinden hiç ayrılmaz. O zaman aklınıza şöyle bir soru gelebilir; eğer DNA çekirdekten ayrılmıyorsa DNA'daki bilgi nasıl oluyor da açığa çıkıyor? DNA'daki bilgiyi çekirdekten hücrenin sitoplazmasına aktaran RNA adı verilen aracı bir moleküldür. RNA da DNA gibi dört harfli bir alfabeye yazılmıştır. Ancak DNA'dan iki açıdan farklıdır: DNA iki zincirden oluşurken RNA tek bir zincirden oluşur. DNA'yı oluşturan bazlar adenin, guanin, sitozin ve timin iken RNA'da timinin yerini urasil adlı baz almıştır. RNA'nın yapısı DNA'da yüklü bilgi tarafından belirlenir. Çekirdekte DNA sarmalı bir fermuar gibi açılır ve onun bir zincirine eşlenik olan RNA molekülü üretilir. Daha sonra bu RNA, hücrenin çekirdeğini terk edip hücrenin sitoplazmasına ve orada yerleşmiş olan ribozom adı-

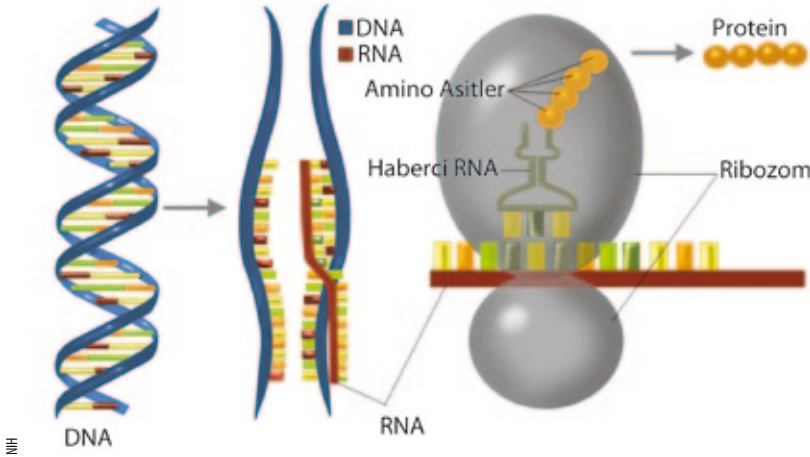
nı verdiğimiz organellere ulaşır. RNA'ya, DNA'daki bilgiyi taşıdığı için bu görevinden dolayı haberci RNA (İngilizcede *messenger RNA* - mRNA) adı verilir. mRNA ribozoma ulaştığında orada taşıdığı bilgiye karşılık gelen proteinin üretilmesini sağlar. Proteinler vücudumuzu oluşturan bütün hücrelerin yani kemik, kas, sinir ve benzeri hücrelerin ana yapı taşlarıdır.

Şimdi Jorgensen'in bulgularına geri dönelim. Yaptığı deneyler aslında milyarlarca yıldır hücrede bulunan ve 1998 yılına kadar açıklanamayan bir mekanizmanın tesadüfen keşfini sağlamıştı; hücrede mRNA'ların proteine dönüşmesini önleyen, böylece genleri susturan bir kontrol mekanizması vardı. O güne kadar moleküler yaşam bilimlerinde çalışan bilim insanları hücre tipine özel olmak üzere aktif olarak çalışan genlerin bulunduğunu ve başka bir hücre tipinde ise sadece o hücreye özgü genlerin çalıştığını, diğer genlerin çalışmadığını düşünüyorlardı. Örneğin elimizin dış yüzündeki hücrelerde kıl çıkarken, ayasındaki aynı tip hücrelerde kıl yapıcı genler çalışmıyordu. Yani genin çalışması DNA düzeyinde kontrol ediliyordu. Jorgensen'in deneyleri ise genlerin çalışmasının sadece DNA düzeyinde değil, RNA düzeyinde de belirlendiğini gösteriyordu. Gen çalışıyor ve ondan mRNA üretiliyordu ama bu RNA'nın proteine dönüşmesi engelleniyordu.

Teoriye göre RNA enterferansı (*RNA interference* - RNAi) mekanizması aslında milyarlarca yıl önce, hücrelere saldıran virüslere karşı geliştirilmiş bir savunma mekanizmasıdır. Virüsler hücreye gir-



DNA gibi RNA da dört bazdan oluşur. Ancak DNA'nın yapısını adenin, guanin, sitozin ve timin bazları oluştururken RNA'nın yapısında timin yerini urasil ile değiştirmiştir. RNA'nın DNA'dan diğer farkıysa DNA çift zincirliken RNA'nın tek zincirli olmasıdır.



Normal koşullarda hücrenin çekirdeğinde yer alan DNA'da yüklü bilgi, haberci RNA (mRNA) aracılığı ile hücrenin sitoplazmasında bulunan ribozom adı verilen organellere taşınır. Taşıyıcı RNA molekülleri amino asitleri ribozoma taşırlar. Amino asitler mRNA'da kodlu bilgi gereği özel bir sıralama ile yan yana dizilerek o genin kodladığı proteini oluştururlar.

dikten sonra sayılarını artırmak için önce virüse ait RNA'ları üretirler. Daha sonra bu RNA'lardan proteinler sentezlenir. Sentezlenen proteinler virüs proteinleri olduğu için bir araya gelerek yeni virüslere dönüşür. Hücrede sayıları giderek artan virüsler ya hücreyi parçalayarak ya da ondan ayrılarak önce hücreler arası sıvıya geçer; daha sonra da komşu hücrelere bulaşır. Bulaştıkları yeni hücrelerde de aynı döngüyü tekrarlayarak sayılarını artırır. Hücrede bulunan ve bir bakıma polis görevi üstlenen bazı moleküller, virüs kaynaklı bu RNA'ları belirleyerek onların yok edilmelerini sağlarlar. Virüsün kopyası yapılırken virüs RNA'ları bir ara iki zincirli bir yapı kazanırlar. Hatırlayacağımız gibi RNA aslında tek zincirli bir moleküldür. Virüs kaynaklı iki zincirli RNA molekülü hücre için virüs saldırısına uğradığını gösteren önemli bir alarm işaretidir. İki zincirli RNA, hücrede özel proteinler tarafından parçalanarak etkisiz hale getirilir. Böylece yeni virüs RNA'ları sentezlenmiş olsa bile virüs proteinleri ve dolayısıyla yeni virüslerin üretilmesi önlenmiş olur. Jorgensen farkında olmadan yıllarca bilim insanlarının gözünden kaçan bu işlevi harekete geçirmişti. Aktardığı renk pigment geni çalıştığında, hem aktarılan genden üretilen hem de hücrenin kendi ürettiği mor pigment RNA'ları parçalanmıştı. RNA parçalanınca ondan pigment proteini üretilmemiş, pigment olmayınca da çiçekler beyaz olmuştu. Jorgensen buna eş-baskılanma adını verdi. Daha sonra bu işlevin mantar, meyve sineği ve diğer organizmalarda da var olduğu keşfedildi.

Bu arada diğer araştırmacılar *Caenorhabditis elegans* adı verilen ve ancak mikroskop altında görülebilen 1 mm boyunda bir çeşit yuvarlak solucanın genleri üzerinde çalışmalar yürütüyorlardı. Kısaca *C. elegans* olarak bilinen bu organizma, şeffaf olduğu için iç organları mikroskop altında detay-

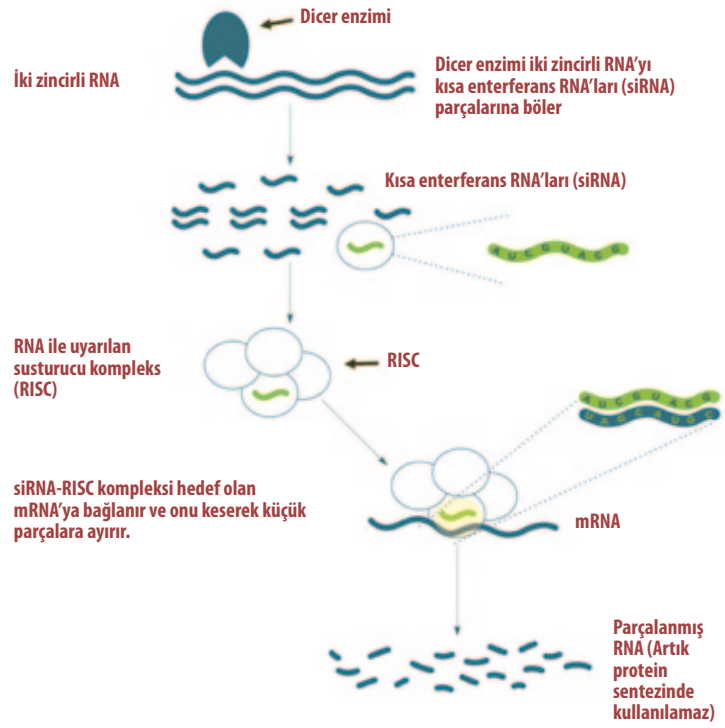
lı bir şekilde görülür. Bu özelliği yaşamının bütün evrelerinde ne tür değişikliklerden geçtiğinin izlenebilmesini sağlar. *C. elegans*'ın vücudundaki 959 hücrenin her birinin yaşam serüveni detaylarıyla biliniyor. Bilim insanları bu avantajlarından dolayı *C. elegans*'ın genlerini birer birer susturarak her bir genin işlevinin ne olduğunu öğrenmeye çalışıyorlardı. Bunu gerçekleştirmek için, üzerinde çalıştıkları genin RNA'sına eşlenik olacak RNA molekülünü sentezleyip *C. elegans*'ın hücrelerine enjekte ediyorlardı. Ters anlamlı RNA (*antisense RNA* - aRNA) adı verilen bu metotta, aktarılan RNA'nın hedef RNA'ya bağlanarak iki zincirli hale dönüşmesi ve böyle olunca da hücre tarafından tespit edilip parçalanması bekleniyordu. Bu metot belli ölçüde başarılı oldu. Fakat metot insan veya diğer memeli hayvanlardan elde edilen hücrelerde denendiğinde sadece hedef RNA parçalanmakla kalmadı, onunla birlikte hücreye ait diğer RNA'lar da parçalandı. İki zincirli uzun RNA molekülü, hücrede interferon tepkisi adını verdiğimiz bir bağışıklık mekanizmasını harekete geçirmişti. İnterferon tepkisi hücrenin örneğin bir virüs saldırısına uğraması sonucu oluşur ve virüsün yayılmasını engeller. İnterferon tepkisi yöntemin başarısını önlemişti.

*C. elegans* ile yapılan çalışmalar sırasında ilginç bir şey daha gözlemlendi. Üzerinde çalışılan RNA'nın eşleniği yerine aynısı hücreye aktarılsa da gen susturuluyordu. Bu beklenmedik bir sonuçtu, çünkü RNA'nın kopyasının aktarılması hedef genin miktarını sıfırlamak yerine artırmalıydı. Washington Carnegie Enstitüsü'nden Andrew Fire ve Massachusetts Tıp Fakültesi'nden Craig Mello, hücreye aktarılan RNA'nın düşünüldüğü gibi tek zincirli saf bir RNA'dan oluşmadığını, ona iki zincirli kısa RNA'ların karışmış olduğunu öne sürdüler. Çok küçük oldukları için RNA moleküllerinin gözden kaçtığını düşünüyorlardı. Nitekim Fire ve Mello ekipleri *C. elegans*'lara tek zincirli veya çift zincirli RNA aktardıklarında özellikle çift zincirli RNA'ların hedef geni susturduğunu buldular. Hedef genlerden biri, kas oluşumunda görev alan *unc-22* adlı bir gendi ve onun susturulması *C. elegans*'ların kontrolsüz bir şekilde devamlı olarak kıvrılmasına neden oldu. Fire ve Mello'nun elde ettiği bu sonuç sadece *unc-22* geni ile de sınırlı kalmadı. Hedef aldıkları her geni, çift zincirli kısa RNA'lar kullanarak etkin bir şekilde susturmayı başardılar. Fire ve Mello, Jorgensen'in petunya-larda gözlemlendiği olayın mekanizmasını çözmüşlerdi. Bu çalışmaları ile 2006 yılı fizyoloji ve tıp alanında Nobel Ödülü'nü paylaştılar.

Fire ve Mello'nun bu kilometre taşı çalışmaları-na diğerleri eklenince RNAi'nin nasıl çalıştığı de-taylarıyla açıklandı. Bu çalışmalar sonucunda bu-gün çift zincirli RNA'nın hücrede Dicer adı veri-len kesici enzimler tarafından 22 nükleotid uzun-luğunda kısa enterferans RNA'ları (*small interfering RNA* - siRNA) parçalarına ayrıştırıldığı biliyoruz. Yine bu kısa RNA'nın açılıp RNA ile uyarılan sus-turucu kompleks (*RNA-induced silencing complex* - RISC) adını verdiğimiz yapıya girdiğini ve bu yapı-nın hedef olan mRNA'nın parçalanmasını sağladığı-nı biliyoruz. mRNA'nın küçük parçalara ayrılma-sı protein sentezinde kullanılmasını engellediği için gen susturulmuş oluyor.

Şu anda Rockefeller Üniversitesi'nde çalışan Tho-mas Tuschl, Max Planc Enstitüsü'nde iken yaptığı çalışmalarda, siRNA'ların varlığını önce meyve si-neklerinin embriyolarında keşfetti. Meyve sineğinin genlerini laboratuvarında sentezledikleri siRNA'larla susturmayı başarınca insan hücrelerinde de aynı mekanizmanın var olabileceği ve siRNA'ların kısa oldukları için interferon sisteminin radarına yaka-lanmamış olabilecekleri tezini ileri sürdü. Tuschl ve çalışma arkadaşları çift zincirli kısa RNA'ları memeli hücrelerine aktardıklarında bekledikleri sonucu elde edip sadece hedef aldıkları genleri susturmayı başardılar. Bu sonuç tezlerinin doğruluğunu kanıt-lamış oldu; çift zincirli kısa RNA'lar interferon siste-mine takılmadan ve yan etkisiz bir şekilde hedef genleri susturmuştu.

O güne kadar genlerin susturulması çalışmaları yıllar alıyordu. RNAi metoduyla bu süre bir anda birkaç saate indi. Artık laboratuvar şartlarında insanlardan elde edilmiş hücrelerde birkaç saat içe-risinde, hedef alınan genler susturularak işlevlerin-in ne olduğu öğrenilmeye başlandı. Moleküler yaşam bilimlerinde çalışan bilim insanları için bu olağanüstü bir gelişmeydi. Fakat daha da önemlisi RNAi'nin potansiyel tıbbi uygulamalarıdır. Çok sa-yıda hastalık, ona neden olan genin susturulmasıyla tedavi edilebilecektir. Nitekim laboratuvar şartla-rında RNAi metodu kullanılarak HIV, çocuk felci-ne neden olan polio virüsü ve hepatit C virüslerinin çoğalması önlemlendi. Sınırlı sayıda da olsa hayvan de-neylerinden ümit verici sonuçlar elde edildi. Bunun üzerine ABD'de RNAi teknolojisini kullanarak has-talıklara tedavi geliştirmek üzere özel şirketler da-hi kuruldu ve çalışmalarına yoğun bir şekilde de-vam ediyorlar. Bununla beraber RNAi teknolojisini hastalıkların tedavisinde kullanılması uzun bir zaman alacağı benziyor. Bunun en önemli sebeplerinden biri RNAi'nin hedef dokuya ulaştırılması-



Bahri Karacı

nın bir sorun olması. Sindirim sisteminden geçerken parçalanacağı için RNAi'lerin hap olarak alınması mümkün değil. Bilim insanları RNAi'lerin arzu edilen doku ve hücrelere iletilmesi konusunda değişik metotlar üzerinde çalışmaya devam ediyorlar. Bunlardan biri de gen tedavisi.

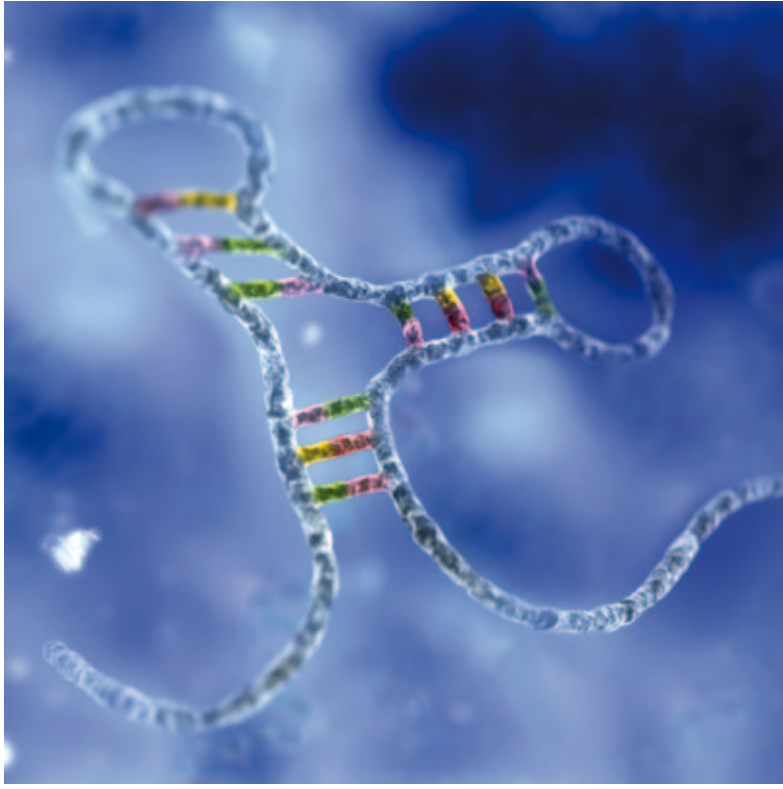
Iowa Üniversitesi Tıp Fakültesi'ndeki laboratuvarlarımızda son üç yıldır Alexander hastalığı adlı bir rahatsızlığa RNAi kullanarak gen tedavisi geliştirmeye çalışıyoruz. Alexander hastalığı çocuklarda merkezi sinir sistemini etkileyen ölümcül bir genetik hastalıktır. Hastalık beyinde sinir hücrelerine destek sağlayan gliyal hücrelerin GFAP adlı geninin mutasyona uğraması sonucu ortaya çıkar. Hastalık Mendel'in "baskın" olarak tanımladığı kalıtım yolunu takip eder. Yani GFAP geninin iki kopyasından birinde mutasyon olması hastalığın ortaya çıkması için yeterlidir. Her genin biri anneden ve diğeri babadan gelen iki kopyası bulunduğu için GFAP

RNA enterferansı ile genlerin susturulması



Amy Pasouinelli, NIH

*Caenorhabditis elegans* şeffaf yapısıyla genlerin görevlerinin öğrenildiği çalışmalarda en çok kullanılan organizmalardan biridir.



Visual Photos

Kısa enterferans RNA'ları (siRNA) çift zincirden oluşan kısa RNA molekülleridir. siRNA'lar haberci RNA'ların parçalanmasını ve dolayısıyla ondan protein üretilmesini engelleyerek genleri sustururlar.

geninin ya anneden ya da babadan gelen kopyasının mutasyona uğraması Alexander hastalığının ortaya çıkması için yeterlidir. Hastalığın belirtileri yaşamın ilk birkaç ayında görülmeye başlar. Hem fiziksel hem de zihinsel gelişmede gerilik, kas kasilması, titreme nöbetleri Alexander hastalığının tipik belirtileridir. Çocuğa hem anneden hem de babadan her bir genin birer kopyası (alel) geçtiği için GFAP geninin mutasyona uğramış kopyasının çalışmasının önlenmesi Alexander hastalığının tedavisini sağlayabilecektir. Çünkü GFAP geninin sağlıklı olan diğer kopyası çalışarak normal GFAP proteinini üretecek ve böylece bu hücreler normal yaşam ve işlevlerine devam edeceklerdir. Çalışmayı birlikte yürüttüğümüz Wisconsin Üniversitesi'nden Albee Messing, Alexander hastaları üzerinde yaptığı genetik çalışmalar sonucu, GFAP geninde en yaygın olarak rastlanan ve Alexander hastalığına neden olan mutasyonları belirledi. Hastaların çoğunda rastlanan bu mutasyonlardan biri GFAP geninde sadece bir bazın değişmesine ve sonuçta GFAP proteininin yapısının değişmesine neden olur. Bir diğer deyişle sağlıklı GFAP geni ile mutasyona uğramış GFAP geni arasında farklı tek bir baz bulunmaktadır. Geliştireceğimiz RNAi'nin sadece mutasyona uğramış GFAP genini susturması, sağlıklı GFAP genine dokunması gerekiyordu. Eğer bunu başarabilirsek sonraki amacımız bu RNAi'yi hastalara bir şekilde aktarıp onların mutasyona uğramış GFAP genini susturarak hastalığı tedavi etmek olacaktır. Uzun süren çalışmalar sonucunda laboratuvar şartlarında sağlıklı gene dokunmadan sadece mutasyonlu GFAP genini susturan RNAi üretmeyi başardık. Geliştirdiğimiz RNAi'yi mutasyonlu ve normal GFAP proteini üreten hücrelere aktardığımızda sadece mutasyonlu GFAP proteininin miktarını % 80'den fazla bir oranda azaltmayı başardık. Ekibimizde yer alan ve RNAi konusunda dünyada önder bilim insanlarından biri olan Beverly Davidson ve ekibi de RNAi'nin tek baz farkı olan genin mutasyonlu kopyasını sağlıklı kopyasına dokunmadan susturabildiğini kendi çalışmalarıyla da gösterdi. Bütün bu çalışmalar RNAi'nin hastalıklı genlerin susturulmasında çok güçlü bir araç olduğunu gösteriyordu.

Çözmemiz gereken ikinci sorun ise geliştirdiğimiz RNAi'yi özellikle gliyal hücrelerine aktarabilmektir. Bunun için üzerinde 2000'li yıllardan beri çalıştığımız bir virüsten yararlandık. LCMV adı verilen ve doğada farelerce taşınan bu virüs, eğer hamile bir kadına bulaşır ana rahmindeki fetüse kadar ulaşabilir ve onun beyinde tahribata neden olur. Laboratuvar kobaylarında yaptığımız denemelerde virüsün beyinde ilk olarak gliyal hücrelerine saldırdığını ve onlara bulaştığını bulduk. LCM virüsünün özellikle gliyal hücrelerine bulaşması onun gen tedavisi için kullanılabilirliğini gösteriyordu. Nitekim fare beyininden gliyal hücrelerini ayırıştırıp laboratuvar şartlarında LCM virüsünden yararlanarak geliştirdiğimiz gen tedavi metodunu bu hücrelere uyguladığımızda virüse yüklediğimiz gen, gliyal hücrelerine aktarıldı ve çalışmaya başladı. Şimdi aynı deneyi canlı fareler üzerinde yapıyoruz. Böylece geliştirdiğimiz RNAi'nin farenin mutasyona uğratılmış GFAP genini, sağlıklı kopyasına dokunmadan susturup susturamayacağını belirlemeye çalışıyoruz. Eğer farelerde de başarılı olursa, aynı metot bu sefer Alexander hastalarının tedavisinde kullanılmak üzere bu hastalarda denenebilecek. Bu çalışmamız ve diğer bilim insanlarının yapmakta olduğu benzer çalışmalar RNAi teknolojisinin sinir sistemi hastalıklarından bulaşıcı hastalıklara ve kansere kadar pek çok hastalığın tedavisinde kullanılıp kullanılmayacağı sorusuna cevap verecek.

İlacın hedefe ulaşımı açısından göz hastalıkları bir istisna teşkil ediyor. Çünkü ilacın doğrudan göze uygulanması söz konusu. Makula dejenerasyonu adı verilen ve özellikle ileri yaşlarda görülen göz hastalığı, görüşün kaybedilmesi ile sonuçlanabilen bir hastalıktır. Hastalığın nedenlerinden biri VEGF adı verilen ve kan damarlarının oluşmasını tetikleyen bir

proteindir. Makula dejenerasyonu olan hastalarda bu proteinin aşırı düzeyde üretilmesi retinanın arkasında fazladan kan damarlarının oluşmasına neden olur. Yeni oluşan kan damarları henüz gelişimlerini tamamlamadıkları için kanı sızdırırlar. Bu da görüşün bulanmasına, hatta ileri düzeylerde tamamen kaybolmasına neden olur. 2004 yılı sonbaharında ilk defa RNAi teknolojisi iki düzine makula dejenerasyonu hastası üzerinde denenmeye başlandı. VEGF genini susturmak üzere tasarlanmış RNAi, bu hastaların gözlerine enjekte edildi. İlk klinik denemesi olduğu için asıl amaç RNAi teknolojisinin güvenliği ve yan etkilerinin olup olmadığını belirlemektir. Bununla beraber iki aylık bir sürede hastaların üçte birinin görüşünde belirgin bir iyileşme gözlemlendi. VEGF RNAi'sinin ilaç olarak yaygın bir şekilde kullanılması birkaç yılı daha alacak gibi görünüyor. Çünkü hâlâ RNAi'nin çalışma mekanizmasını en ince detayına kadar öğrenebilmiş değiliz. Fakat bu alanda görülen ilerlemeler önümüzdeki beş veya on yıl içerisinde RNAi ilaçlarının klinikte kullanılabileceğini gösteriyor.

2000'li yılların başlarına kadar RNAi'nin oluşumu, çalışması ve sonuçları hakkında çeşitli bilgiler elde edilmişti, ama biyolojik açıdan organizmanın yaşamı için ne kadar önemli olduğu henüz bilinmiyordu. 2003 yılında Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Victor Ambros'un ekibi ve Harvard Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Gary Ruvkun'un ekibi, ilk defa genlerin susturulmasını sağlayan ve mikroRNA adı verilen genlerin varlığını *C. elegans*'ta, Cambridge Üniversitesi'nden David Baulcombe da bitkilerde keşfetti. Bu araştırmacılar mikroRNA'ların RNAi'lere benzer bir şekilde çalıştığını ve mikroRNA genleri tarafından kodlandıklarını buldular. Başlangıçta belirttiğimiz gibi önce DNA'dan mRNA sentezlenir ve ondan genin ürünü olan protein sentezlenir. MikroRNA genlerinin çalışması sonucu sentezlenen RNA'lar protein sentezinde kullanılmazlar. Onlar işlevlerini RNA olarak yaparlar. Bu üç bilim insanı geçtiğimiz yıl Nobel'e doğru ilk adım sayılan Lasker Ödülü'nü paylaştılar. İlk keşiflerinden kısa bir süre sonra mikroRNA'ların varlığı insan dahil diğer organizmalarda da bulundu. Son beş yıl içerisinde sayıları birkaç yüzü bulan mikroRNA geni ve bu genlerin yerleri tespit edildi. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar mikroRNA'ların protein sentezini engelleyerek değişik dokularda o dokuya ait olmayan genlerin çalışmasını engellediğini gösteriyor. MikroRNA'lar hayata tek bir hücre olarak başlayan bir organizmanın daha sonra iki yüzü aşkın değişik tipte, trilyonlarca hücreye dönüşmesinde de çok önemli rol oynarlar.

Son bir iki yılda elde edilen veriler mikroRNA genlerinin çalışmasında ortaya çıkan aksaklıkların kansere dahi neden olabileceğini, bir kısmının ise kanseri önlediğini gösterdi.

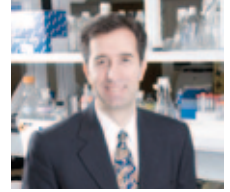
MikroRNA'ların vücudumuzun doğal yapısının bir parçası olmaları, onların tedavide başarı ile kullanılma şansını artırıyor. Araştırmacılar doğal olarak var olan mikroRNA'ların yapısını değiştirerek onları tedavi açısından önemli olan genlere yöneliyorlar. Örneğin vücutları PSCK9 adlı proteinin anormal düzeyde aktif bir formunu üreten kişilerin kolesterolü tehlikeli düzeylere çıkarken bu aktif formun üretilmediği kişilerde kolesterol düşük seviyelerde kalıp onları kalp rahatsızlıklarına karşı korumaktadır. PSCK9 proteininin bu formunun üretilmesini engelleyecek bir ilaç, kolesterol seviyesinin düşmesini sağlayarak çok sayıda kişinin kalp rahatsızlığı geçirmesini önleyecektir. RNAi stratejisi ile PSCK9'u susturabilmek mümkün olacaktır. Nitekim PSCK9 proteinini susturucu nitelikte RNA enjekte edilen maymunların kötü kolesterol seviyesinin % 60 düzeyinde azaldığı gözlemlendi. Ancak PSCK9 proteinini devamlı olarak susturmak için aralıklarla RNAi enjekte edilmesi gerekecektir. Örneğin bahsettiğim çalışmada kolesterol düzeyi üç hafta boyunca düşük kaldı. Devamlılığı sağlamanın bir yolu, PSCK9 geni için geliştirilen RNAi dizilimini vücudumuzda normalde üretilen bir mikroRNA'nın yapısına aktarmak ve onu vücutta enjekte etmek olacaktır. Böylece devamlı olarak üretilmesi sağlanmış olacaktır.

Tamamen tesadüf eseri keşfedilen RNAi'lerin ve onlar gibi işlev gören mikroRNA'ların keşfi, moleküler yaşam bilimlerinde bir çığır açtı. Gelişim biyolojisinden genlerin işlevlerinin öğrenilmesine, hastalıkların mekanizmalarının çözülmesinden genetik hastalıkların tedavisine uzanan geniş bir yelpazede olağanüstü rolleri olan bu küçük moleküller, Nobel tarihinde hiç görülmemiş bir hızda, keşiflerinden sadece sekiz yıl sonra, Fire ve Mello'ya Nobel Ödülü kazandırdılar. RNAi ve onun gibi rastlantı sonucu elde edilen keşifler, bilimde beklenmeyen sonuçlara ilgi gösterip anlamaya çalışmanın neler kazandırabileceğini göstermesi açısından çok önemli dersler içeriyor.

#### Kaynaklar

Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C., "Potent and Specific Genetic Interference by Double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*", *Nature*, 19 Şubat 1998.  
Napoli, C., Lemieux, C., Jorgensen, R. A., "Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-suppression of Homologous Genes in Trans", *The Plant Cell*, Nisan 1990.

Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V., "The *C. elegans* Heterochronic Gene *Lin-4* Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to *Lin-14*", *Cell*, 3 Aralık 1993.  
Ruvkun, G., "Molecular Biology. Glimpses of a Tiny RNA World", *Science*, 26 Ekim 2001.  
Nelson, C. L., Bartel, D. P., "Censors of the Genome", *Scientific American*, Ağustos 2003.



Bahri Karaçay, Iowa Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Bölümü, Çocuk Nörolojisi Kürsüsü öğretim üyesidir. Ayrıca aynı üniversitenin Gen Tedavi Merkezi ve Holden Kanseri Merkezi üyesidir. Nörolojik doğum kusurları üzerinde genler düzeyinde araştırmalar yürütüyor. Beş yaşın altındaki çocuklarda görülen sinir sistemi tümörü nöroblastoma ve yine sinir sistemini etkileyen Alexander hastalığına gen tedavisi geliştiriyor. Ayrıca alkolün ve LCM virüsünün fetüs beyni üzerindeki etkilerini araştırıyor.