

# Gen terapisinde temel teknikler

Doç. Dr. Gürkan Öztürk



1968 yılında Karabük'te doğdu. İlk ve orta öğrenimini burada tamamladı. 1993 yılında Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden mezun oldu. Üniversite yıllarında çeşitli dergilerde popüler bilim yazarlığı yaptı. 1995-1999 yılları arasında Londra King's College'da fizyoloji doktorası yaptı. Halen Yüzüncü Yıl Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı'nda öğretim üyesi olarak çalışıyor. Akademik uzmanlık ve ilgi alanı sinirbilim ve sinir rejenerasyonu olup aynı zamanda Sleep and Hypnosis ve Eastern Journal of Medicine dergilerinin yardımcı editörlüğü görevlerini yürütüyor. Evli ve üç çocuk babasıdır.

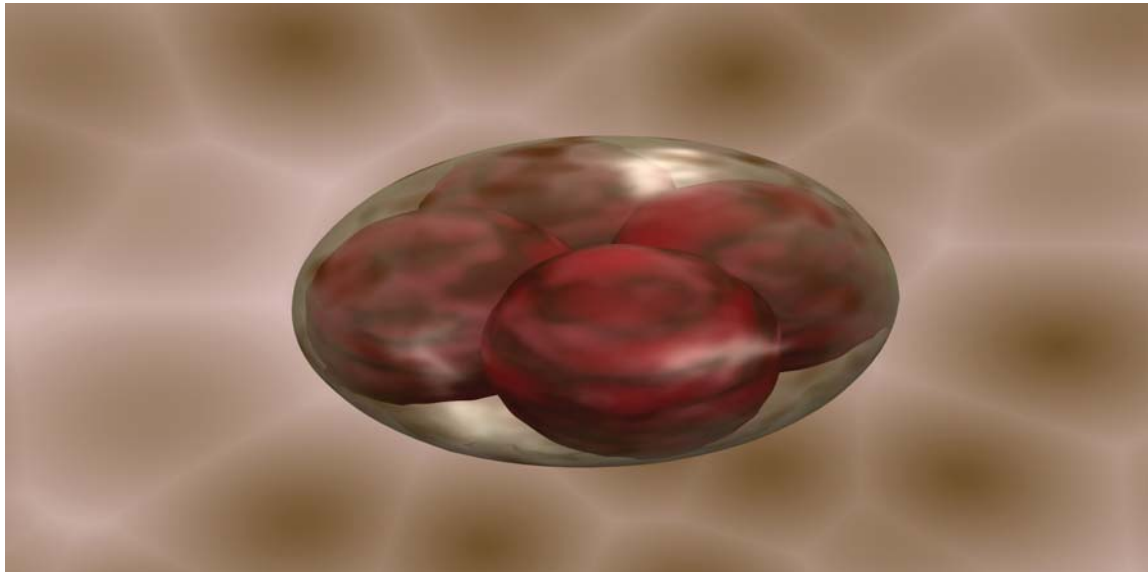
**G**en terapisinin temel amacı, bozuk olan ve hastalık oluşturan genin yerine sağlamların konmasıdır. Gen terapisinin hedefi somatik, yani bir vücut hücresi olabileceği gibi bir eşey hücresi, yani bir yumurta ya da sperm de olabilir. Şu an uygulamadaki terapiler, somatik hücrelere yönelik olup eşey hücreleri üzerinde çalışmak, etik ve hukuki kabul görmemektedir. Oysa eşey hücrelerinde yapılacak genetik düzeltmeler, doğacak çocukta genetik bir kusuru silebileceği gibi, ondan de-

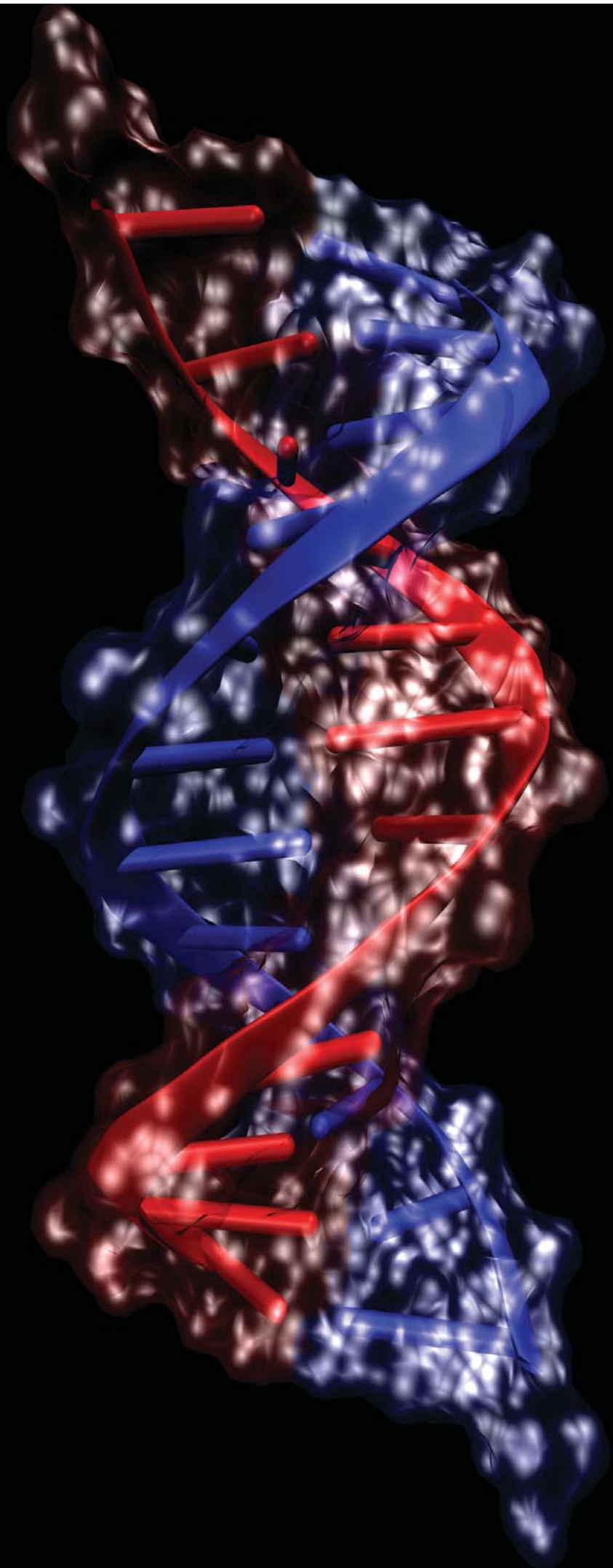
vam edecek nesilleri de hastalıktan koruyabilme potansiyeline sahiptir; bu ise kalıtsal hastalıkların eradikasyonu anlamına gelir.

İstenen genlerin hedef hücreye verilmesinde birkaç strateji uygulanabilir:

- En yaygın uygulama gen nakli, yani normal bir genin DNA içinde herhangi bir yere eklenmesi yoluyla eksik ya da bozuk genin yerine konmasıdır.
- 'Homolog rekombinasyon' adı verilen bir yöntemde, hücrenin kendi DNA'sını tamir edebilme yeteneğinden yararlanır. Önce kusurlu geni

kromozom üzerinde bulabilecek çinko parmak adı verilen 'DNA kontrol proteinleri' bir araya getirilir, sonra bunlara DNA'yı kesebilecek bir endonükleaz eklenir. Bu kompleks harekete geçip kusurlu geni kestikten sonra, hücredeki doğal tamir mekanizması, aynı genin bir başka kromozomda bulunan kopyasını kullanarak bu kırığı tamir etmek isteyecektir. İşte tam bu sırada eğer hücreye dışarıdan sağlam bir gen verilmişse hücre bu homolog dizini de tamir için kullanabilmektedir. Yöntemde, hücre içine sağlam genin aktarılması elektrik şokuyla denenmiş, ancak daha sonra lentivirüslerle nakletmenin da-







Şu an uygulanan genetik terapiler, somatik hücrelere yönelik olup eşey hücreleri üzerinde çalışmak, etik ve hukuki kabul görmemektedir. Oysa eşey hücrelerinde yapılacak genetik düzeltmeler, doğacak çocukta genetik bir kusuru silebileceği gibi, ondan devam edecek nesilleri de hastalıktan koruyabilme potansiyeline sahiptir; bu ise kalıtsal hastalıkların eradikasyonu anlamına gelir.

ha etkin olduğu görülmüştür.

- Anormal gen, “seçici ters mutasyon” ile tamir edilerek normal fonksiyonuna döndürülebilir.
- Bir genin ürün verme özellikleri değiştirilir; bunun için genin açık ve kapalı kalma özelliklerinde oynamalar yapılır. Antisens oligonükleotidler ve siRNA tekniği hatalı genlerin ürün vermesini engellemek için kullanılabilir.

Kullanılan yöntemlerin çoğunda en kritik aşama sağlam genomun hedef hücreye aktarılmasıdır. Bu ise virüsler yardımıyla ya da alternatif bazı tekniklerle gerçekleştirilir.

### Virüslerin gen naklinde kullanımı

Gen terapisinde vektör olarak en yaygın virüsler kullanılmaktadır. Virüsler, doğal gereği genlerini insan hücre-

lerine ve hatta hücre genomuna sokabilme stratejilerine sahiptirler. Böyle bir virüse insan genleri yüklenir ve bu genler virüs tarafından hastalıklı hücrelere nakledilirse, eksik olan ya da patoloji düzeltici etki gösterebilecek bir proteinin sentezi ve sonuç olarak hastalığın tedavisi teorik olarak mümkün olacaktır.

Retro, adeno ve adeno-ilişkili virüsler gen terapisinde en sık kullanılan çeşitlerdir. Ayrıca kılıf proteinlerinin yapısıyla oynanarak enfektif yetenekleri değiştirilmiş yalancı tipli virüsler de yaygın olarak kullanılmaktadır.

Retrovirüslerin genetik materyali RNA formundadır ve hedef hücreye girdiklerinde reverse (ters) transkripsiyon işlemi ile önce RNA'larının DNA kopyalarını yapar, sonra bunları entegraz enzimi ile konak hücrenin genomuna katarlar. Böyle bir hücre bölündüğünde virüs geni, yeni hücrelere de geçecektir. Gen terapisi için eksik ya da bozuk olan gen, bir retrovirüsün genomuna eklenip hedef hücrelere, örneğin kanser hücrelerine aktarılabilir ve bu hücreler çoğalsa da artık bu genin ürünleri her yeni hücrede ortaya çıkabilir. Retrovirüs kullanmanın en önemli sakıncası entegraz enziminin, aktarılan geni hedef hücrenin genomunda herhangi bir yere yerleştirebilmesidir. Bunu yaparken işlem sırasında önemli bir geni orta yerinden tah-

rip edebilir; bu gen hücre bölünmesi kontrolü ile ilgiliyse kontrolsüz hücre bölünmesi ve sonuçta kanser ortaya çıkabilir.

Adenovirüsler, biz insanlar gibi çift iplikli DNA içerirler. Ancak bunlar girdikleri hücrelerde kendi genlerini, konağın genlerine eklemek yerine DNA'larını çekirdek içinde serbest olarak bulundururlar. Hücre içinde protein sentezi için transkripsiyon (kopyalama) işlemi gerçekleşirken bu DNA'ların ürünleri de ortaya çıkar. Bu virüslerin, retrovirüsler gibi normal genomu bozma riski yoktur, ancak taşıdıkları DNA, bölünme sonrası yeni oluşan hücrelere aktarılamaz. Bu ise tedavi edici geni taşıyan adenovirüsün defaten ve büyük miktarlarda hastalıklı dokuya verilmesini gerektirmektedir.

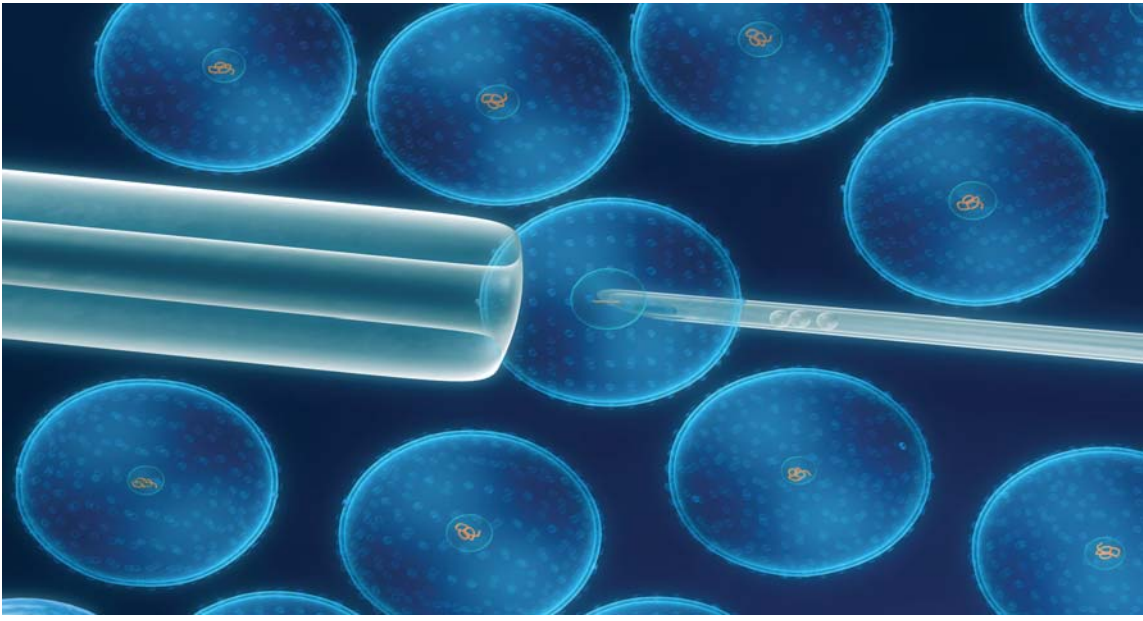
Adeno-ilişkili virüsler porovirüs ailesindedir ve tek iplikli DNA'ya sahiptirler. Bu virüslerin en büyük avantajı genlerini her zaman 19. kromozomun sabit bir bölgesine eklemeleridir ki bu işlem herhangi bir patolojiye neden olmaz. Ayrıca bu virüsler nöronlar gibi bölünmeyen hücrelere de girebilmektedir. Öte yandan az miktarlarda DNA taşıyabilmeleri ve ilk insan deneylerinde immün sistemin bu virüslerle enfekte edilmiş hücreleri tanıması, adeno-ilişkili virüslerle tedavi potansiyelini kısıtlamaktadır.

Virüslerin hedef hücreleri tanıyabilmesi ve onlara tutunup içeri girebilmele-ri, yüzeylerinde bulunan kılıf proteinlerinin yapısıyla ilişkilidir. Bu kılıf yapısının değiştirilmesi ile bir virüsün tanıdığı hücre çeşitleri artırılabilir ya da azaltılabilir. Bu amaçla imal edilmiş, başka virüslerin kılıflarını ya da farklı melez proteinleri taşıyan pek çok viral vektör bulunmaktadır ve bunlara genel olarak “yalancı tipli virüsler” adı verilmektedir. Bu tekniğin en ileri uygulamalarından biri, virüs kılıfına hedef hücreleri tanıyacak bir antikör ek-

### Uyuyan güzel transpozon sistemi

Transpozonlar, dolaşarak bir hücre içinde herhangi bir kromozom bölgesine yerleşebilen hareketli DNA sıralarıdır. Bunlara sıçrayıcı genler adı da verilmekte olup önce kendini transkripsiyonla RNA'ya; ardından reverse transkriptaz ile tekrar DNA'ya dönüştüren klas I, doğrudan transpozaz enzimleri ile kesilip başka bir yere kopyalanan klas II alt grupları bulunmaktadır. Uyuyan güzel transpozon sistemi, aslında milyonlarca yıldır inaktif olduğu (uyuduğu) düşünülen bir balık genidir. Amerikalı araştırmacı Perry Hackett, ilk olarak 1997 yılında bu genin insan kromozomuna başka genler katmakta bir araç olarak kullanılabileceğini gösterdi. Hackett daha sonra arkadaşları ile birlikte bu yöntemi ticari bir tedavi alternatifine dönüştürmeyi hedefleyen Discovery Genomics şirketini kurdu. Bugün 100'ü aşkın deneysel çalışma, bu sistemin kalıcı gen naklinde oldukça başarılı olduğunu ve virüs vektörleri kullanmanın getirdiği pek çok riski bertaraf ettiğini, böylece gen terapisinin geleceğinde önemli bir yer tutacağını göstermektedir.





lemektir ki buna popüler dilde “sihirli mermi” adı verilmektedir.

### Viral olmayan gen nakil yöntemleri

Gen naklinde virüslerin kullanılmaması bir yandan daha düşük immünolojik reaksiyon avantajı sağlarken bir yandan da bol miktarda üretim yapma imkânı tanımaktadır. Başlangıçta düşük transfeksiyon başarı oranları bir sorun teşkil ederken, yeni bazı tekniklerle en az virüslerle olduğu kadar verimli sonuçlar alınmaktadır.

Elektrik şoku ya da gen tabancasıyla basınç uygulayarak DNA’yı çıplak olarak bir hücrenin genomuna sokmak mümkündür; ancak başarı oranı henüz oldukça düşüktür.

Bir başka yöntem, “Sleeping beauty (Uyuyan Güzel) Transpozon” sistemi, gen naklinde ümit vadeden, bir plasmidden istenen geni kesip kromozoma yerleştirme yeteneğine sahip nisbeten daha yeni bir tekniktir.

DNA’nın lipozom tarzında bir lipid tabakasıyla kaplanarak hücreye verilmesi, çıplak verilmesine göre daha etkin bir yöntemdir. Katyonik lipidlerle kaplı bir plasmid DNA ki özel adı ‘lipopleks’tir, çok az kayıpla hücre zarından endositoz ile içeriye alınabilir. Ancak şu an aşılması gereken sorun, hücre içindeki bu DNA’nın endozomlardan dışarıya çıkmasının sağlanmasıdır. Bunun için kompleks lipopleksler tasarlanmıştır. Lipopleksler, kanserli hücrelere tümör baskılayıcı genlerin aktarılmasında denenmiş ve ümit verici sonuçlar alınmıştır.

Dendrimerler oldukça büyük yuvarlak makromoleküllerdir ve yapılarıyla oynanabilmektedir. Bunların yüzeyleri katyonik hale getirildiğinde DNA ya da RNA’ya bağlanırlar ve beraber endositoz ile hücre içine alınırlar. Dendrimerler daha çok toksik yan etkileri olabilen katyonik lipidlere alternatif

olarak düşünülmektedir. Bu tekniğin önündeki en büyük engel dendrimerlerin tasarım ve üretiminin çok külfetli olmasıdır.

Farklı yöntemlerin bir arada kullanıldığı tekniklerle, örneğin virozom adı verilen lipozom ve inaktif bir virüsü içeren vektörlerle bazı durumlarda başarılı sonuçlar alınmaktadır.

### Gen terapisinin önündeki teknik engeller

Bu ümit vadeden tekniğin önündeki en önemli engellerden biri, terapinin etkisinin kısa vadeli olmasıdır. Özellikle adenovirüslerin hücre genomuna eklenmemesi, bunların etkin kaldıkları süreyi oldukça kısaltmaktadır. Ayrıca geni alan hücrelerin mümkün oldukça uzun yaşaması ve sağlam kalması zorunluluğu vardır. Bu faktörler, terapi seanslarının sayısının çok fazla artmasına neden olmaktadır.

Vücuda giren her türlü yabancı madde, özellikle viral yapıda olanlar, immün sistemi harekete geçirir. Bu, gen nakillerinde, özellikle çok sayıda tekrar eden uygulamalarda verilen genetik materyali alan hücrelerin savunma sistemi tarafından ortadan kaldırılmasıyla sonuçlanabilmektedir.

Vektör olarak virüslerin kullanılmasının getirdiği risklerden daha önce bahsedilmişti. Özetle, vektörlerin istenilen kromozoma ve bölgeye yönlendirilememeleri, beraberinde tehlikeli mutasyon olasılıklarını gündeme getirmektedir ki bunun en ciddi olanı kanserlerdir. Nitekim geçen sayımızda anlattığımız gibi adenovirüslerle yapılan klinik denemelerde, terapi alan bazı hastalarda lösemi ortaya çıkmıştır. Bunun dışında immün sistem aktivasyonu, iltihabi reaksiyon ve inaktive edilmiş virüsün tekrar hastalık yapabilme yeteneği kazanması diğer önemli risklerdir.

Gen terapisinin en uygun hedefi, tek

Bu ümit vaat eden tekniğin önündeki en önemli engellerden biri, terapinin etkisinin kısa vadeli olmasıdır. Özellikle adenovirüslerin hücre genomuna eklenmemesi, bunların etkin kaldıkları süreyi oldukça kısaltmaktadır. Ayrıca geni alan hücrelerin mümkün oldukça uzun yaşaması ve sağlam kalması zorunluluğu vardır. Bu faktörler, terapi seanslarının sayısının çok fazla artmasına neden olmaktadır.

gen kusuruna bağlı bozukluklardır. Oysa potansiyel olarak terapi kapsamına girebilecek kalp hastalıkları, hipertansiyon, alzheimer ve diyabet gibi hastalıklar pek çok genin ortak katılımıyla ortaya çıkan durumlardır. Bunlara yönelik multigen terapileri henüz gerçekleştirilmekten uzaktır.