

# GEN TERAPİSİ

Gökay BOZKURT<sup>1</sup>, H.Çetin EKERBİÇER<sup>2</sup>, Bülent ALAGÖL<sup>3</sup>, ŞUKRU PALANDÜZ<sup>4</sup>, Çetin ALGÜNEŞ<sup>5</sup>

## ÖZET:

Son zamanlarda ilaç üretim firmalarında klasik ilaç keşfi anlayışı değişmiştir. Son on yıl içerisinde ilaç endüstrisinde fenotipik ajanların keşfinde bir yavaşlama vardır. Gen terapisi gen ürünleriyle etkileşime giren ajanlar kullanarak veya kendileri birer gen ürünü olarak hastalığın fenotipini değiştirmekten ziyade insan hastalıklarını iyileştirmek için yeni bir tedavi protokolüdür. Gen terapisi teorik olarak bir tek uygulamayla hastalığı iyileştirmek için spesifik genleri modifiye etmektir. Bundan dolayı insan moleküler genetiğinin bu yeni tekniği çoğu ülkelerde genel halk sağlığı stratejilerinin gittikçe artan önemli bir komponenti olmaya başlamaktadır.

**Anahtar sözcükler:** Gen terapisi, Rekombinant DNA teknolojisi, Transfeksiyon, Gen transferi.

## SUMMARY:

### GENE THERAPY

In recently, The consideration of traditional drug discovery changes in the pharmaceutical firms. There has been a slowing of phenotypic agents discovery in the pharmaceutical industry in the past decade. Gene therapy provides a new treatment protocol for curing human disease. Rather than altering the disease phenotype by using agents which interact with gene products or are themselves gene products, gene therapy can therotically modify spesific genes resulting in disease cure following a single administration. Thus the new techniques of human molecular genetics are becoming an increasingly important component of the general health care strategy of many countries.

**Keywords:** Gene therapy, Recombinant DNA technology, Transfection, Gene transfer.

Gen terapisi; klinik olarak uygun bir tarz içerisinde hücrenin davranışlarını modifiye amacıyla bir hücre içerisine bir gen sekansının tanıtımıdır(1,2).

Gen terapisinin gündeme gelmesiyle birlikte, ilaç tedavisinde kullanılan tüm farmakolojik ajanları fenotipik ajanlar ve genotipik ajanlar olarak ikiye ayırma ihtiyacı doğmaktadır. Bazı antineoplastikler ve anti helmantikler hariç bilinen ilaçların hemen hemen hepsi hedef hücrenin fenotipini değiştirerek etki göstermektedirler. Oysa gen terapisinde kullanılan ajanlar ise hücrenin temel yapısını değiştirmektedirler. Son elli yıl içerisindeki farmasötik endüstrisinin başarısı fenotip üzerindeki selektif etkiye neden olan yeni mekanizmanın keşfindeki yeniliklere dayanmaktadır. Klasik ilaç keşfi önceki terapi

modlarından daha spesifik, daha etkili ve daha çeşitlilik gösterebilmesi mümkün olan genotipik ajanların keşfiyle yavaşlamaktadır. En büyük ve tarihsel olarak en başarılı olan Farmasötik firmaları genelde bu değişime en az uyabilenlerdir. Bu uyumsuzluğun yarattığı boşluğu bir bilim adamı ve maceracı bir kapitalistin bir araya gelmesiyle kurulan, bir laboratuardan biraz daha büyük olan biyoteknoloji firmaları kapatmaktadır.(2)

Gen terapisi insan hastalıklarını iyileştirmek için yeni bir paradigma öneriyor. Gen terapisi teorik olarak, gen ürünleriyle etkileşime giren ajanların kullanılması veya kendilerinin bir gen ürünü oluşturmalarıyla hastalığın fenotipini değiştirmelerinden ziyade, bir tek uygulamayı takiben hastalığın iyileşimi ile sonuçlanan spesifik genlerin modifiye

<sup>1</sup> Yrd.Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

<sup>2</sup> Araş.Gör.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.

<sup>3</sup> Doç.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Üroloji A.D.

<sup>4</sup> Uzm.Dr. İstanbul Üniversitesi İst. Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik B.D.

<sup>5</sup> Prof.Dr. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji A.D.

edilmesidir. Gen terapisi, başlangıçta kalıtsal hastalıkların tedavisinde vizyondan geçirilmiştir. Günümüzde ise periferik damar hastalıkları, artritler, nörodejenaratif hastalıklar, ve kanseride içeren çok geniş bir dağılımla diğer edinsel hastalıklar içinde söz konusu edilmektedir. Başarılı bir gen terapisi stratejisi için bazı anahtar elementler gerekmektedir. En majör olanlardan birisi hasta olan genin identifikasyonu ve klonlanması. Uygulamada olan İnsan genom projesi ile bu engel aşılacaktır. Stratejinin ikinci majör elmenti ise gen transferi ve expressiondur. Güncel olarak gen terapisindeki anlaşmazlıkların çoğu uygun hücrelere arzu edilen genlerin transferi ve sonrasında hastalığın tedavisi için penetrasyonu takiben, etkili ekspresyon seviyelerine ulaşma konularındadır. Diğer majör elementler ise gen terapisinin potansiyel yan etkilerini, hedef bozukluğun patogenezi yeterli düzeyde anlamak, ve gen terapisine alınacak hücreleri tanımdır (3).

Gen terapisinde; fonksiyonel veya yapısal defektli organ veya dokunun terapötik etkinlik sağlayabilecek miktardaki hücrelerinin DNA'sı in-vitro ortamda gen teknolojisi ile rekombine edilir. Daha sonra maksimal terapötik etkinlik için en uygun olan yere implante edilir. Bir diğer yaklaşımda ise gen transfer vektörünün spesifik afinite spektrumuna bağlı olarak DNA modifikasyonun in-vivo uygulamalarıdır. Spesifik dokularda gen ürününün oluşumu ve penetransı, doku spesifik ekspresyon sinyallerini taşıyan vektörün inklüzyonuyla mümkündür. Bir diğer alternatifde ise Anti-sense dizilerine sahip spesifik transkriptlerin bulunduğu ribozimleri degrade edebilen katalitik RNA'ların transferi söz konusudur. DNA'nın modifikasyonunda mikroenjeksiyon, lipofeksiyon, kalsiyum-fosfat aracılığıyla transfeksiyon ve elektroporasyon yöntemleri vardır. Etik ve bilimsel uygunluk için gen vektörlerinin non-patojen şuşları hazırlanır.

## GEN TRANSFERİ VEKTÖREL SİSTEMLERİ

### I- Retroviral vektörler

Eksojen genlerin hücre içerisine gönderilmesi işlemi için viruslerin modifikasyonu ilk olarak 1968'de yayınlanmıştır. bu girişimlerde bütün mozaik virüsü spesifik genetik materyalin hücrelere gönderilmesi için kullanılmıştır. Memeli hücrelerini infekte etme yeteneği farkedilmiş ve rekombinant olarak modifiye edilmiş simian papilloma virüsünün SV40'ın

geliştirilmesine yol açmıştır. Şimdilerde çok yaygın olarak kullanılan recombinant DNA teknikleriyle bu vektörler kültürde tavşan globülün genini expresse etme ve transfer etme yeteneğindedirler. Retroviral vektörler diğer rekombinant viral vektör sistemlerinin geliştirilmiş olmasına rağmen gen terapisi protokolleri içinde en popüler gen transfer vektör sistemleri olarak kalmaktadır.

Diğer vektörel sistemlerin birbirleriyle olan karşılaştırması ise aşağıdaki gibidir.

### II- Non-viral vektör sistemleri

Non-viral vektör sistemlerini iki kategoriye ayırmak mümkündür in-vitro uygulamalarla sınırlı olanlar ve hem in-vitro hem de in-vivo uygulamalarla yapılabilenler.

#### A- İn-vitro uygulamalarla sınırlı olan non-viral vektör sistemleri

##### 1- Kalsiyum fosfat transfeksiyonu

Kalsiyum fosfat transfeksiyonu ilk olarak 1960'larda açıklanmıştır. 1970'lerin başından beri küçük değişikliklerle standart bir protokole oturtulmuştur.

Kalsiyum fosfat transfeksiyonu teknik olarak; kalsiyum iyonlarıyla etkileşime sokularak oluşturulan plazmid DNA presipitatları üzerine dayanır. Uygulama için çok basit ve çok pahalı olmayan bir yöntemdir. Plazmid DNA kalsiyum klorid solüsyonu ile karıştırılır. ve sonra bir dengeli fosfat solüsyonu eklenir. minimum 20 dakikadan sonra ilk ince presipitatlar oluşmaya başlar. ve bu solüsyon direkt olarak hücre kültürüne eklenir. Transfer etkinliği arzulanan geni expresse eden hücre sayısı ile belirlenir ve genelde birkaç spesifik hücre dizisi için bu oran %10'la sınırlıdır. Çoğu vakalarda bu oran %1'den bile daha azdır. Transfeksiyonun etkinliği bazı spesifik hücre dizileri için DMSO veya gliserol ile hücrelerin şoklanmasıyla artırılabilir. Hücreler bu teknikte geçici olarak veya stabil olarak transfekte edilebilir. Stabil transfektanların sayısı BES (Bis-hidroksietilaminoetansulfonat) kullanılarak sağlanabilir. DNA presipitatlarının hücreye endositoz yolu ile girdiği düşünülmektedir. Bununla birlikte bu teknik minimal hücresel toksisiteye sahiptir. İn-vivo az veya hiç ekspresyon görülmez. DEAE-Dextran hücre içine spesifik genleri göndermek için kullanılan DNA ile etkileşime giren bileşiktir. DEAE-Dextran aracılı gen transferi daha fazla üretilebilir olmasına rağmen sadece birkaç spesifik hücre dizisi için etki gösterir ve transienttir. etki mekanizması anlaşılammıştır.

## 2- Mikroenjeksiyon

Mikroenjeksiyon'da plazmid DNA direk olarak hücrenin nükleusuna gönderilir. Bir ışık mikroskopisi kullanılarak, bir cam pipetin rehberliğinde hücre nükleusuna girilir ve küçük bir miktar DNA veya RNA injekte edilir. Şayet sitoplazmaya enjeksiyon yapılırsa hem sitoplazmik hemde lizozomal degradasyona uğrar. Bu teknik maalesef çok yoğun ve iş gücü ve çok iyi izole hücreler gerektirmektedir. Emniyet ve etkinlik mikroenjeksiyon kullanılarak moniterize edilebilme şansına sahip olduğundan germ-line gen terapisi uygulamalarında kullanışlılık sağlayabilir. Ancak germ-line hücrelerinde injeksiyon zamanı gelişimin değişik evrelerinde farklı etkiler yapabileceği için özellikle ön plana çıkar. Germ-line modifikasyonları transgenik olarak isimlendirilen fareden sığıra kadar olan çok geniş bir yelpazede çoğu memeli hayvanlarda başarılmıştır. İnsanlar için spesifik bozuklukların genetik modifikasyonu günümüz realitesinden çok uzaktır. Etik düşünce ile korkutulmaktadır.

## 3- Elektroporation

Elektroporation, süspansiyon içerisindeki DNA ve hücre karışımına yüksek voltaj uygulamasıdır. Hücre-DNA süspansiyonu elektrik pulslarının verildiği iki elektrod arasına yerleştirilir. DNA elektrik pulsları esnasında hücre membranı tarafından oluşturulan delikler yoluyla hücreye girer. Etkili gen transferi elektrik pulslarının türüne, elektrodlar arasındaki mesafeye, süspansiyonun elektriksel iyon gücüne ve hücrelerin cinsine göre değişir. En iyi sonuçlar hızlı proliferasyon gösteren hücrelerden elde edilir. Bu işlem esnasında yüksek voltajda çoğu hücre hayatta kalamadığından memeli hücreleri için etkili bir yöntem değildir.

## I I- İn-vivo ve İn-vitro uygulamalar için non viral sistemler

### 1- Lipozomlar

Lipozomlar ilk olarak hücre içine maddelerin hızla iletiminde rol oynayan ve hücrel membranların bir modeli olarak 1965'de açıklanmıştır. Lipozomlar DNA'yı yakalama mekanizmalarına bağlı olarak ya katyonik lipozomlar yada pH-sensitif lipozomlar olarak iki kalsifikasyona ayrılırlar. Katyonik lipozomlar stabil bir kompleks oluşturmak üzere negatif yüklü DNA ile etkileşime giren pozitif yüklü lipozomlardır. Katyonik lipozomlar bir pozitif yüklü lipid ve DOPE (dioleilfosfatidiletanolamin veya dioleilfosfatidiletanolkolin ) adı verilen co-lipidden oluşur. En sıklıkla site edilen Katyonik

lipozom lipofectin'dir. Lipofectin-DNA complexleri İ.V uygulamalarında özellikle akciğer ve karaciğer bu substanların alınımı ve genin expressyonu için çok yüksek bir affinite gösterirler. pH-sensitif lipozomlar ise DNA ile bir kompleks oluşturmak için aynı yüke sahip oldukarı için birbirlerini itici güce sahip olurlar fakat bu lipozomların iç vizköz yapısı tarafından hapsedilerek birliktelik oluşturular. Hücreler genlerin transferinde önerilen bazı avantajları sözkonusudur.

1-Lipozomlar hem negatif hem de pozitif yüklü olarak DNA ile kompleks oluşturabilmektedir.

2-Degradatif süreçlerden DNA'yı koruyucu özellik sergiler.

3- Lipozomlar, bir kromozom kadar büyük parçaları taşıyabilirler.

4- Lipozomlar bir doku veya hücreler spesifik olarak hedeflenebilir.

5- Lipozomlar, viral vektörlerinde kalıtımı gibi problemlerin de üstesinden gelir.

Dezavantajları ise düşük ve geçici gen expressyonudur. Ayrıca çok düşük bir düzeyde hücrel toksisite de göstermektedir ve serum komponentleri tarafından inhibe de edilebilmektedirler.

### 2- Çıplak plazmid DNA injeksiyonu.

Tüm gen transfer vektör sistemleri hemen hemen plazmid DNA'nın transferine dayanmaktadır. Çıplak plazmid DNA'nın rodenlerde ve primatlarda kas içi injeksiyonunu takiben expressyonun olması gen terapistlerinin ilgisini çekmiştir. Çıplak plazmid DNA injeksiyonunu takiben gen expresyonu sergileyen dokular timus, deri, kardiak kas ve iskelet kasıdır. Farelerde tek bir enjeksiyonu takiben 19 ay gen expresyonu görülebilmektedir. İntramuskular Çıplak plazmid DNA injeksiyonunun uygulanma basitliği ve plazmidlerin boyutunun 2 ile 19 kilobaz arasında değişmesi nedeniyle başarılı olarak kas içi enjeksiyonunun mümkünlüğü önemli avantajlarından olmasına rağmen, tek enjeksiyonu takiben gen expresyonunun çok düşük bir yüzde ile miyofibrillerde görülmesi ve ancak deriye, timusa ve çizgili kaslara uygulanma kolaylığı önemli dezavantajlarıdır.

### 3- Ballistic DNA injeksiyonu

Ballistic DNA injeksiyonu ilk olarak bitkilere gen transferi için geliştirilen bir metoddur ve gen tabancası, mikroprojektil gen transferi, gen bombardımanı gibi isimlerle de bilinir. İn-vivo ve İn-vitro olarak memeli hücrelerine gen transferi için modifiye edilmiştir. İlgili geni kodlayan plazmid DNA, 1-3 mikron

boyutundaki altın veya tungsten partiküllerine kaplanır ve bir güç yardımıyla hızlandırılan partiküllerin hücre membranına penetre olması sağlanır. Bu güç yüksek voltaj elektronik akım, spark akımı veya helyum basınç akımı olabilir. Ballistic DNA injeksiyonu çok başarılı bir şekilde kullanılarak çok geniş bir yelpazede

hücre cinsleri, özellikle de epidermis, kas ve karaciğer ve cerrahi olarak kolay ulaşılabilen diğer organlara gen transferi yapılmıştır. Fakat bu teknikte de gen ekspresyonu geçici olmakta ve akımın boşaltıldığı merkez doku bölgesinde oldukça önemli bir doku hasarı oluşmaktadır.

Tablo.I. Gen Transferinde Kullanılan Vektörel Sistemlerin Karşılaştırılması

	Retrovirus	Adenovirus	HSV	AAV	Plazmid	Lipozomlar	Ballistik Dna
İnsert Size	8 Kb	8kb	>20kb	<4kb	>20kb	>20kb	>20kb
Titer	10 <sup>10</sup> -10 <sup>7</sup>	10 <sup>11</sup>	10 <sup>8</sup>	10 <sup>9</sup>	N/A	N/A	N/A
İntegrasyon	Evet	Hayır	Hayır	?	Hayır	Hayır	Hayır
Kalıcı Expressyon	Değişebiliyor	Geçici	Geçici	Geçici	Geçici	Geçici	Geçici
In-Vivo Gönderim	Zayıf	Yüksek	Yüksek	Yüksek	Değişebilir	Orta	Zayıf
Transfekte Quiesent Hücre	Hayır	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet	Evet

#### DNA bazlı immunizasyon.

Günümüzde DNA bazlı immunizasyon protokollerinde en çok karşımıza çıkan; intramuskuler ve ballistik plazmid DNA injeksiyonlarıdır. DNA bazlı aşılarda kanser ve enfeksiyon hastalıklarını önlemek için geliştirilmektedirler. Hücre aracılı immun cevab, özellikle HIV, HSV, CMV, RSV gibi viral enfeksiyonlarla savaşmada çok önemlidir. Yabancı bir antijenin injekte edildiği tekniklerde immunizasyon genellikle bir antikor aracılı immun cevaba neden olur. Hem gen tabancası hem de intramuskuler direkt plazmid injeksiyonu HIV, Hepatit A ve C, HSV, İnfluenza, papilloma, tbc, RSV, CMV, Lyme hastalığı, Helicobacter pylori, malaria, ve mycoplasma pulmonarisde DNA bazlı immunizasyon protokollerinde kullanılmaktadır.

#### GEN TERAPİSİNİN BUGÜNKÜ DURUMU

A.B.D.'de 125, Avrupa'da 48, Çin ve Japonya'da da birer tane onaylanmış gen terapisi protokolü vardır. Protokoller çok çeşitlilik arz etmektedir. Örneğin kanser için kullanılan gen terapisi protokolleri şunlardır; tümör hücreleri içerisine bir sitokin geninin transferi, Bir HLA geninin in situ enjeksiyonu, tümör hücrelerinin genomu içerisine bir suşid geninin yerleştirilmesi, anti-

onkojen veya tümör supressör genlerin kullanımı veya multi-drug resistan geninin kullanımı.

Gen terapisi vektörleri ABD.'de onaylanmış olan 125 protokolün büyük çoğunluğunda hedef hücreye seçilmiş olan genin transferi için (%63) retroviral vektörler kullanılmaktadır. Diğerleri Adenoviral vektörler (16), lipozomlar (13), Adenoassociated vektörler (2), geriye kalan %6 'sı ise çıplak plazma DNA'nın injeksiyonunu içeren değişik vektörel sistemleri kullanan protokollerdir.

Gen terapisi protokollerinde uluslararası bir standartizasyonun sağlanması klinik uygulamalara geçiş için bir zorunluluk olarak görülmektedir.

Gen terapisinin bilimsel ve etik yönden kabul görmesi Tedavi etme anlayışının ve yöntemlerinin evriminin kolaylaşması açısından önemlidir. Tıbbi etiğin arzuladığı kalite güvencesinde terapötik etki için yöntemler ihtiyaca cevap verebilecek durumdadır ve artık bu metodların uygulanabilirliğine inanmak için geçerli nedenlerimiz vardır.

#### TERMINOLOGY:

**Ex-vivo gene transferi:** (İndirekt gen transferi). Recipientin çevre ile temas eden yüzeyinde lokalize olan hücrelere genetik materyalin transferini içerir.

**İn-vivo gen transferi:** (Direkt gen transferi). Recipientin içerisindeki hücrelere gen transferini içerir.

**Cell Terapy:** Genetik olarak modifiye edilmemiş hücrelerin bir hastalık durumunu düzeltmesi amacıyla recipiente transferi.

**Somatik gen transferi:** Non-germ hücrelere gen transferi.

**Germ-line gen transferi:** Jenerasyonların genomunu değiştirme amacıyla germ-line dokulara gen transferi.

**Transgen:** Patolojik genin doğru versiyonu.

**Reporter gen:** Gen transferinin etkinliğini test etmek için kullanılan genler.

**Gen Transfer vektörü:** Genin hücre içerisine transferini sağlayan mekanizma:

**Transfer etkinliği:** Arzu edilen geni ekspres eden hücrelerin yüzdesi.

#### KAYNAKLAR

1. Control of Hereditary diseases. Editorial: WHO Technical Report Series, . The Report of a World health organization Scientific Group. 1996; 865:16
2. FRIEDMAN T. Genetik hastalıkların tedavisi, Çeviri Vakfı, 1993: 119-130.
3. Anderson WF. Human Gene Therapy. 1995; 6:1505-1506.
4. Lyon J and Gerner P. Altered fates: Gene therapy and the retooling of human life. (New York: W.W.Norton) 1995: 1-569.
5. Mulligan RC. The basic science of gene therapy. Science 1993, 260: 926-932.
6. Wolff JA and Lederberg J. A history of gene transfer and therapy. Chapter 1 in Wolff JA, editor,
7. Gene therapeutics: Methods and applications of direct gene transfer. (Basel: Birkhaeuser) 1994: 3-25.
8. Douglas JT and Curiel DT. Targeted gene therapy. Tumor Targeting 1995; 1:67-84.
9. Neda H, Wu CH and Wu GU. Chemical modification of an ecotropic marine leukemia virus results in redirection of target specificity. J Biol Chem 1991; 266:14143-14146.
10. Kasahara N, Dozy AM and Kahn YW. Tissue-specific targeting of retroviral vectors through ligand-receptor interactions. Science 1994; 255:1373-1376.