

Gen Tedavisi ve İnsan Genom projesi

DOÇ.DR.PINAR AKSOY SAĞIRLI

Gen Tedavisi

* AMAÇ:

Mutant genotipi düzeltmek

Tanımı

Gen tedavisi, genel anlamda, bir hastalığı tedavi etmek ya da en azından bir hastanın klinik durumunu iyileştirmek amacıyla genetik materyalin hücrelere transferi olarak tanımlanır.

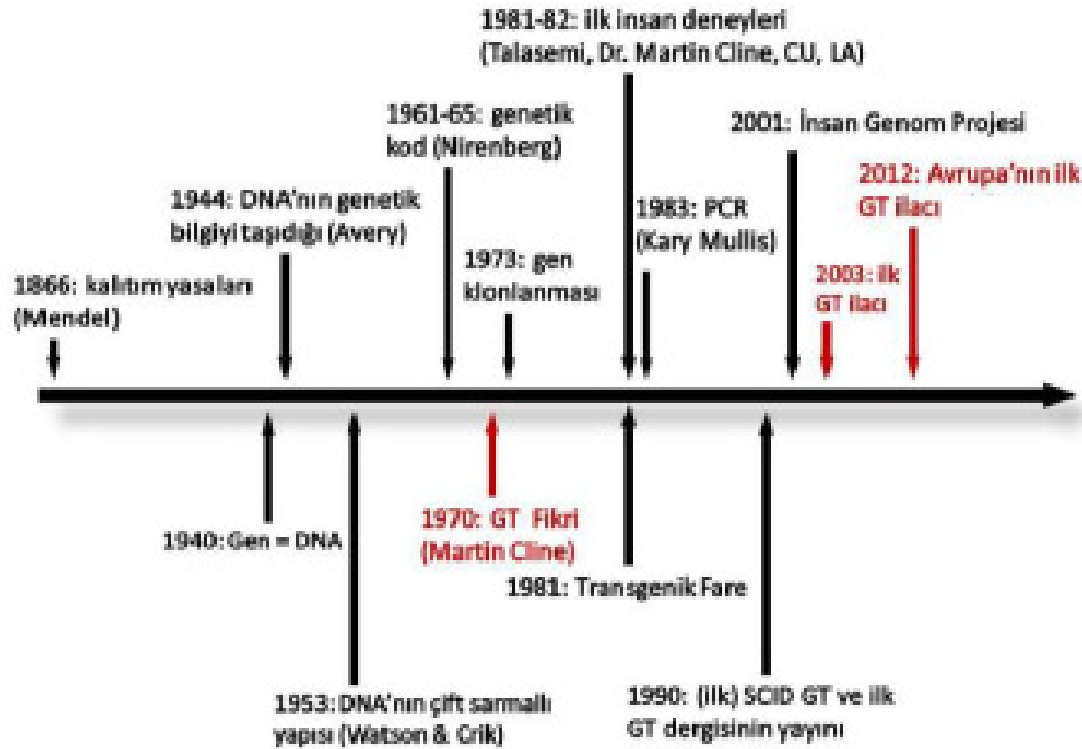
Tarihçe

- * ilk kez 1970 yılında, retrovirüslerin RNA'ları üzerinde çalışan, Martine Cline tarafından ortaya konmuştur.
- * Martine Cline, virüslerin transformasyon mekanizmalarını incelediğinde, virüslerin genetik materyallerini konak hücre genomuna aktardığını keşfederek, hücrelere gen transfer işlemlerini gerçekleştirmek için bir araç olarak kullanılabileceklerini belirtmiştir¹.
- * Martin Cline, 1980'lerin başında genlerin in vitro ve in vivo olarak yüksek verimlilikte transfer edilebileceğini göstermiştir.
- * 1982 yılında, ilk insan gen tedavisi, talasemi hastalığı için, Cline tarafından gerçekleştirilmiştir⁸.

Tarihçe

- * Daha sonra 1990 yılında **ciddi kombine immün yetmezlik (SCID)** hastalığında Michael Blaese ve William French Anderson tarafından **ADA geni** taşıyan retrovirus vektörü ile yapılmış gen tedavisi uygulamaları sonucunda 2 çocuğun tam olarak tedavisi sağlanmıştır.

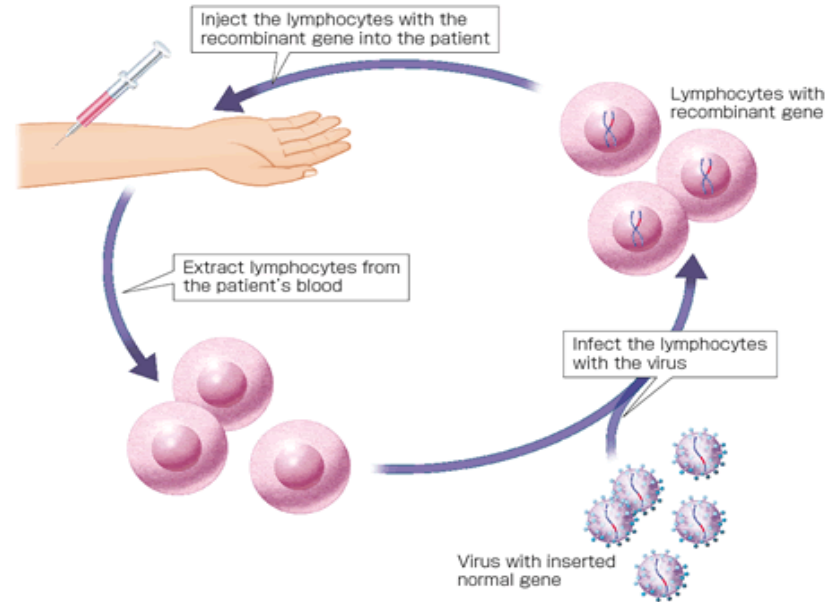




Şekil-1. Gen tedavisi (GT) yöntemi ile ilgili tarihsel gelişmeler.

Tarihçe

- * İlk başarılı gen terapisi 1990 yılında gerçekleştirildi.
- * İlk DNA da kalıcı değişiklik yapan somatik tedavi ise 1993 yılında yapıldı.

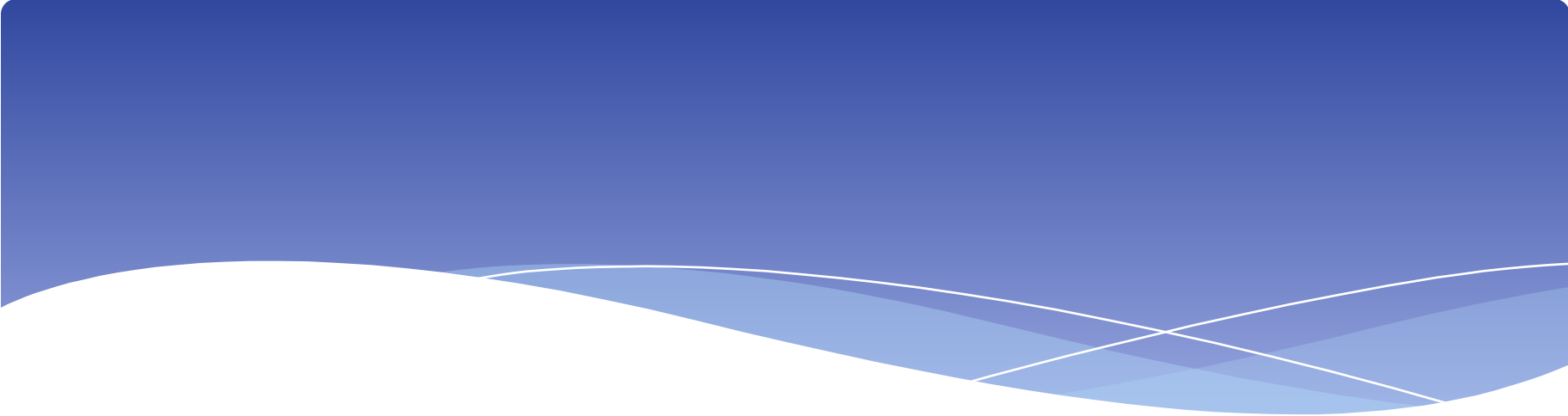


Gen tedavisinde sağlıklı geni hücrelere vermek ve gen hasarlarını onarmak için bir kaç yöntem kullanılır.

1. İnsersiyon:
2. Yer deđişimi (Gen cerrahisi)
3. Tamir
4. Gen eklemesi (İntihar gen tedavisi)

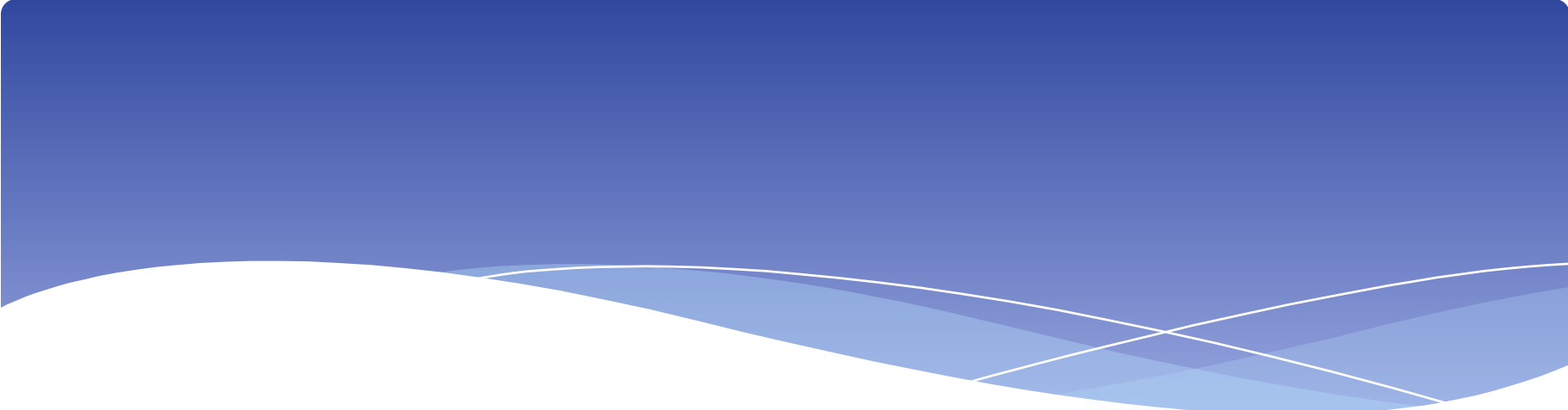
Gen tedavisinde sağlıklı geni hücrelere vermek ve gen hasarlarını onarmak için bir kaç yöntem kullanılır.

- 1. İnsersiyon:** Genellikle viral vektörler aracılığıyla normal rastgele olarak hücre genomuna entegrasyonudur.
Bu yöntem DNA hasarlarına sebep olabilir;
örneğin, insersiyon sonucunda tümör uyarıcı genlerin inhibisyonunu ortadan kaldırarak aktif hale geçebilir ve kansere sebep olabilir.



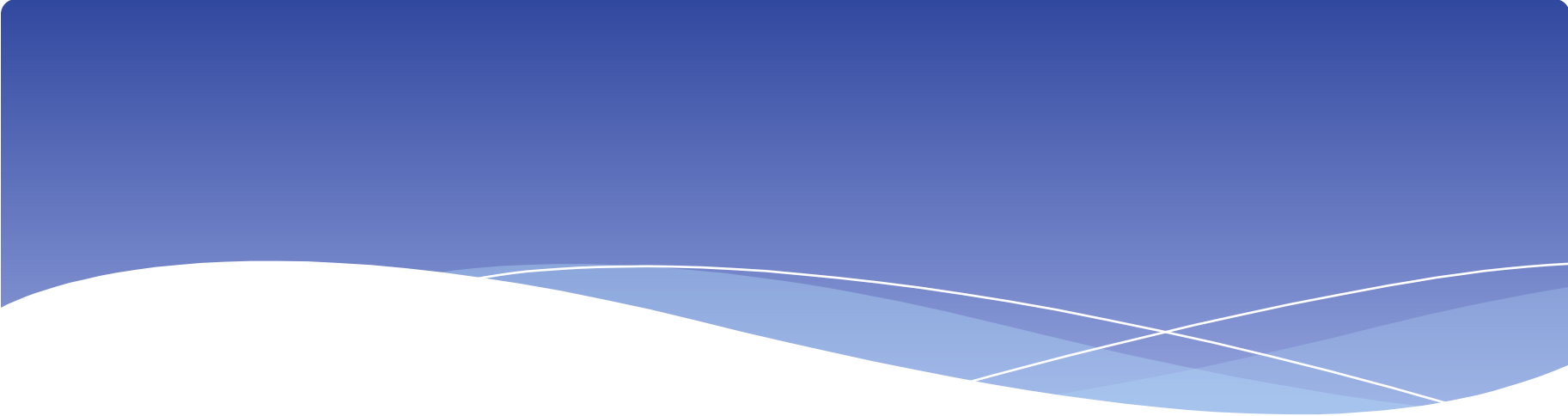
2. Yer deęiřimi (Gen cerrahisi): Normal genin homolog rekombinasyon ile istenen, belli bir lokusa yerleřmesini saęlar.

Bu yöntemin gerçekleşme olasılığı çok az (10^5 hücre içinde 1) olmasına rağmen, gen parçası spesifik bir bölgeye yerleştiği için DNA hasarı en aza indirgenir.



3. **Tamir:** Anormal genin ters mutasyonla tedavisidir.

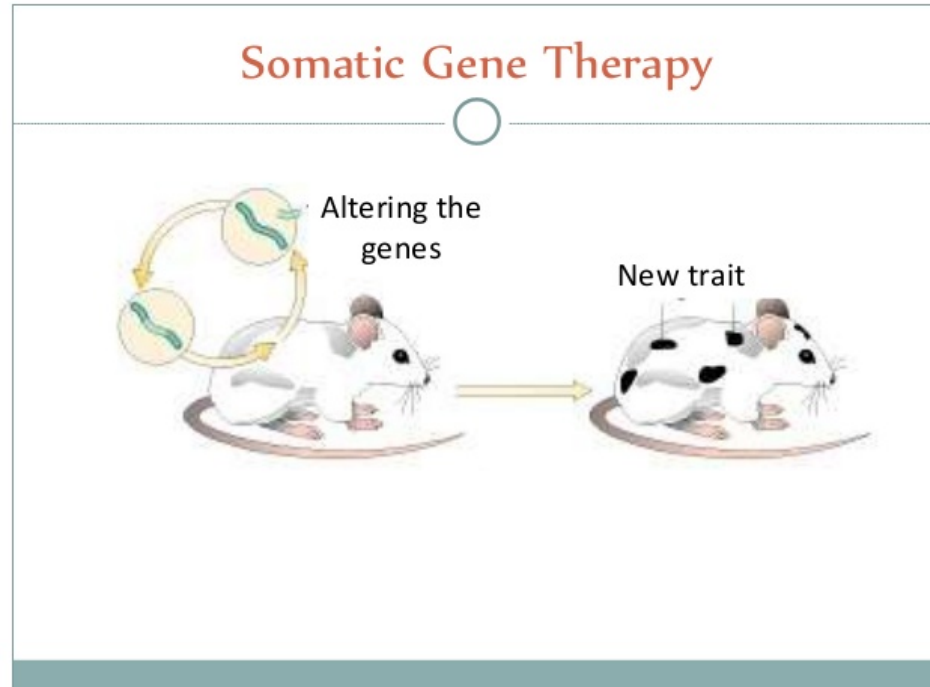
Örneğin, $A \rightarrow C \rightarrow C \rightarrow A$. Bu yöntem genellikle nokta mutasyonları nedeni ile ortaya çıkan hastalıkların tedavisinde kullanılabilir. Bu durumda mutasyona uğramış gen, nukleazlar (çinko parmak, TALEN ve CRISPR/Cas) aracılığıyla hücrenin doğal tamir mekanizmaları tetiklenip ters bir mutasyonla düzeltilir.



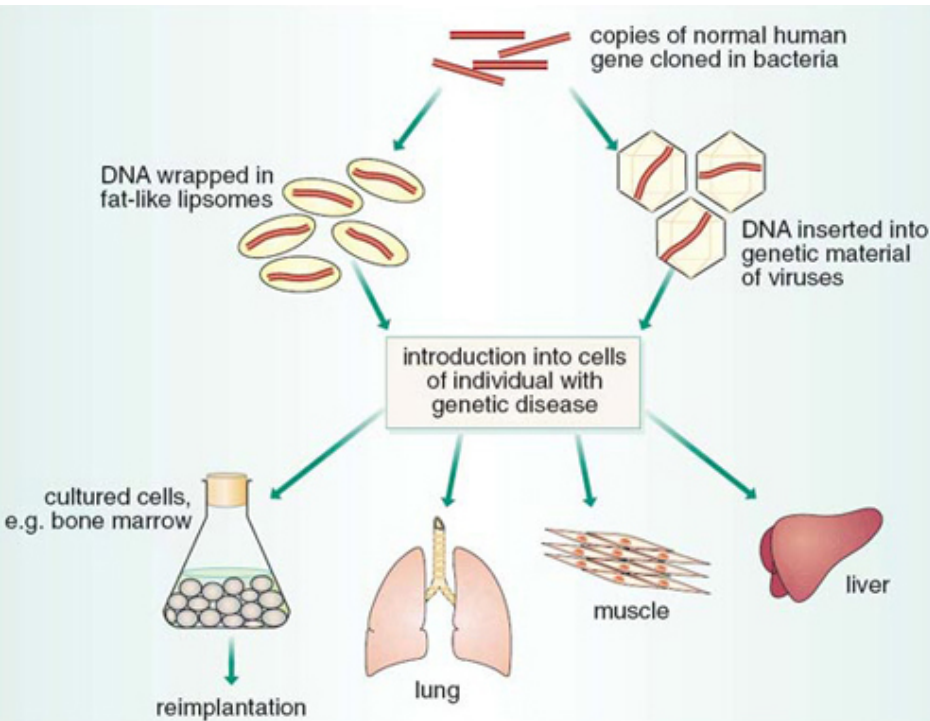
4. Gen eklemesi (İntihar gen tedavisi): Normal durumlarda hücrede bulunmayan ve eksprese olmayan genin istenilen zaman ve istenilen hücrede ifadesini sağlamak için uygun hücreye transferi işlemidir. (Rashnonejad A, 2014)

Gen tedavisi iki alt başlık altında toplanır

- * Somatik hücre gen tedavisi
- * Germline gen tedavisi



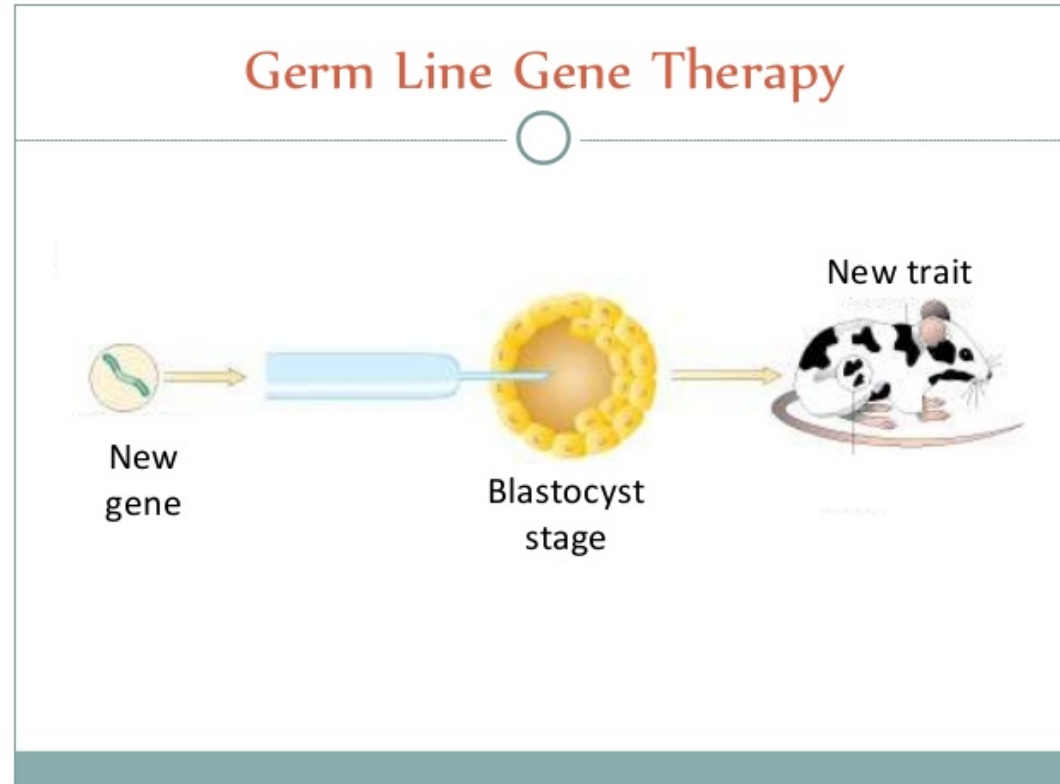
Somatik terapi



- * Terapötik genler gamet dışındaki herhangi bir hücreye transfer edilir.
- * Bu terapide modifikasyonlar döllere taşınmaz.
- * Hemofili, Talessemi, Kistik fibroz hastalıklarının tedavisi için denenmektedir.
- * Özellikle tek gen hastalıkları somatik tedavi için ideal aday hastalıklardır. Bununla beraber çok az çalışma ileri düzeye ulaşabilmiştir.

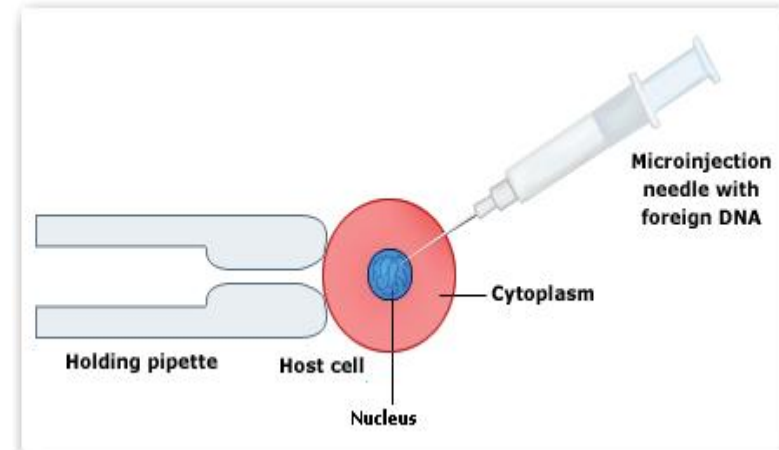
Germline Terapi

- * Terapötik genler germ hücrelerine (yumurta, sperm hücresi) transfer edilir.
- * Döllere aktarılır



Gen transferinde çeşitli yöntemler vardır (Transfeksiyon yöntemleri).

1. Fizikokimyasal Yöntemler
2. Biyolojik yöntemler



Fizikokimyasal yöntemler

- * Fizikokimyasal yöntemler, DNA'nın doğrudan hücreye enjeksiyonudur. Örneğin
- * Elektroporasyon, gen tabancası (balistik gen enjeksiyonu), Sonoporasyon gibi fiziksel yöntemler ya da
- * Lipozom ve dendrimerler gibi kimyasal yapılar kullanılır.
- * Bu yöntemlerde fizikokimyasal kurallar kullanılarak DNA parçaları hücre içine sokulur. Örneğin gen tabancası yönteminde ilk DNA parçaları altın ya da tungstenden oluşan 1-3 mikron boyutunda mikroparçacıklar ile örtülür, daha sonra bu DNA/nanopartikül parçaları güç üreten bir cihaza yüklenir. Parçacıkların hız kazandırılarak, hücre zarını delip, sitoplazmaya girmesi sağlanır. Sitoplazma içinde nanopartiküller DNA'dan ayrılıp DNA nukleusa girer ve görevini yapar. Fiziksel yöntemlerin avantajı basit bir yöntem olmasıdır. Ancak düşük verimlik ve in vivo olarak kullanım zorluğu dezavantajlarıdır.
- * Lipozom yönteminde, Rekombinant DNA'nın lipid vezikülleri ile hücreye sokulması söz konusudur.
- * Nukleus içine mikroenjeksiyon ile rekombinant DNA'nın sokulması

Biyolojik yöntemler

- * Biyolojik gen aktarılması için genellikle virüsler veya plazmidler kullanılır.
- * En yaygın kullanılan biyolojik vektörler viral vektörlerdir.
- * Virüslerin hastalığa yol açan gen parçalarının yerine, hastaları iyileştirme amacıyla rekombinant genler yerleştirir.
- * Adeno-assosiye virüs, retrovirüs, adenovirüs ve herpesvirüs vektörleri en sık kullanılan viral vektörlerdendir. Bu virüslerin kendi genomunu konakçı hücreye veren doğal stratejilerden yararlanır. Ancak ilk basamakta virüslerin patojen genleri çıkartılıp zararsız haline getirmesi gerekir.

Gen tedavisinde kullanılan vektörler

* 1. Viral vektörler

- * Retrovirüsler
- * Adenovirüsler
- * Adeno ilişkili virüsler
- * Herpes virüsü

* 2. Viral olmayan vektörler

- * Çıplak DNA (Plazmid içine sokulmuş hedef DNA)
- * Lipozomlar içine sokulmuş DNA paketleri
- * Protein-DNA bileşenleri (Hücre-yüzey reseptörlerine bağlanan protein ve DNA bileşeni)
- * Yapay kromozomlar

Vektörler

- * Retrovirüsler kullanıldığında, viral genom, konak hücre DNA'sına katılır. Kendi RNA genomundan dsDNA yapabilirler.
- * Adenovirüsler'de ise viral genom, konak hücre DNA'sına katılmaz. Kromozom dışında sitoplazmada genetik materyal olarak bulunur. İnsersiyonal mutasyona neden olmaz. dsDNA virüsüdürler.
- * Adeno-ilişkili virüsleri tek zincirli DNA (ssDNA) virüsleridir
- * Herpes simplex virüsleri çift zincirli DNA (dsDNA) virüsleri

Viral vektörlerin dezavantajları

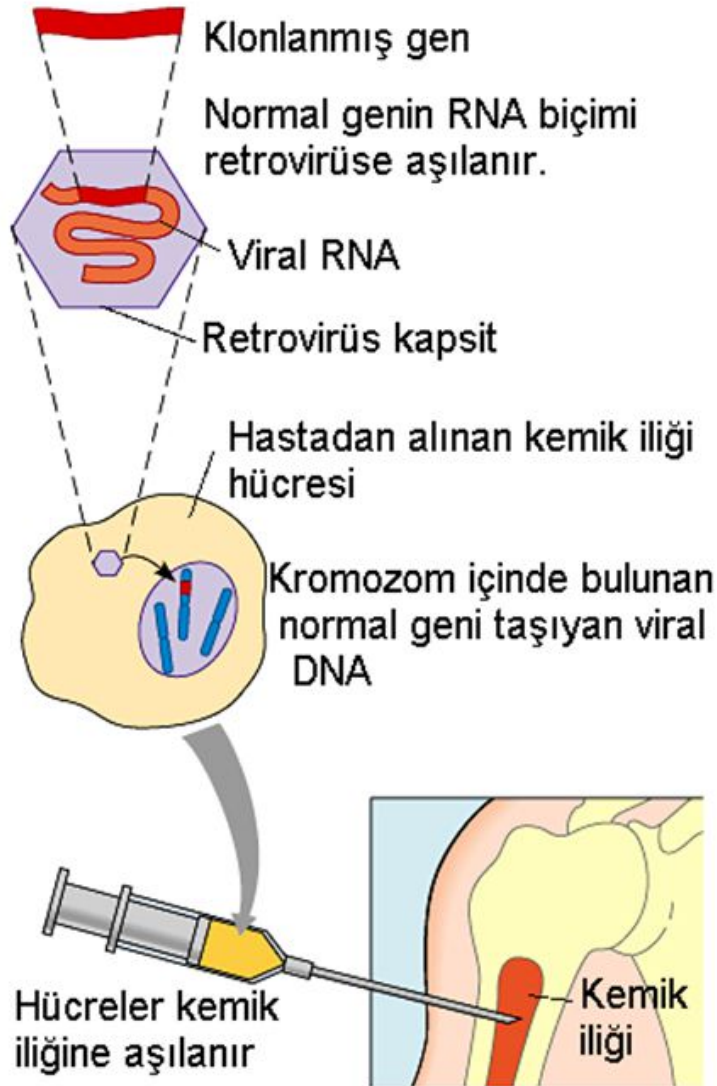
- * Retrovirüs bölünmeyen hücreleri enfekte edemez,
- * Adenovirüs olumsuz immünolojik yanıt gösterir,
- * Herpes virüsü sitotoksik etkisi vardır
- * adeno-assosiye virüs kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesine sahiptir.
- * Tüm virüslerin ortak dezavantajı genin yanlış bir yere yerleşme tehlikesidir. Bunun nedeni de virüslerin rastgele olarak genoma entegre olmasıdır. Bu şekilde konakçı hücrenin diğer genlerini keserek kansere ya da başka bozukluklara yol açabilir. Birden fazla hücre çeşidini enfekte edebilme özelliği ve eşey hücrelerine girme ihtimali, onların diğer dezavantajları olarak bilinir. Ancak günümüzde bu dezavantajları ortadan kaldırmak için çeşitli araştırmalar yapılmaktadır. Virüse ait kapsit proteinlerini değiştirip spesifik bir dokuya, örneğin karaciğer hepatosit hücrelerine girebilme özelliği kazandıran viral vektörlerin elde edilmesi gibi çalışmalar yapılmaktadır

Vektörler iki yoldan organizmaya verilir

- * Ex vivo, organizma dışına alınan mutant hücrenin düzeltilerek yeniden organizmaya verilmesi
- * İn vivo, dışarıda hazırlanan normal geni taşıyan vektörün organizmaya verilmesi

Gen tedavi örnekleri

- * Ex vivo
- * SCID, ciddi kombine immün yetmezlik hastalığıdır. Adenozin deaminaz (ADA) mutasyonu vardır. Kemik iliğinden kan kök hücreleri çıkarılır
- * Sağlam gen bir vektör yardımıyla kök hücreye nakledilir.
- * Kök hücre organizmaya geri sokulur.



Gen tedavisi

- **Zararsız hale getirilmiş bir retrovirüs vektörü bir genin normal allelini buna sahip olmayan bir hastanın hücreleri içerisine sokulmasında kullanılır.**
- **Eğer viral nükleik asit yabancı bir gen bulunduruyorsa ve bu gen ifade ediliyorsa bu hücre ve hücrenin nesilleri , gen ürününe sahip olacak ve iyileşecektir.**
- **Kemik iliği hücreleri gibi yaşam boyu çoğalan hücreler , gen tedavisi için ideal hücrelerdir.**

Gen tedavi örnekleri-1

- * Ailesel Hiperkolesterolemi, LDLR,
- * Düşük dansiteli lipoprotein geninde mutasyon vardır.
- * Kalp ve damar hastalıklarına yatkınlık vardır.
- * LDLR karaciğerde sentezlenir.
- * Hastaların karaciğer hücreleri alınır
- * Normal gen retrovirüsler ile hepatositlere sokulur
- * Düzeltilmiş hücreler portal ven ile vücuda verilir.

Gen tedavi örnekleri-2

- * İn vivo,
- * Kistik Fibroz,
- * Klor kanal proteini mutanttır.
- * Adenovirüslere normal gen sokulup sprej yolu ile burun mukozasına verilir

Kanser gen tedavisi

a. Mutasyona Uğramış Genlerin Düzeltilmesi

Bu konuda en çok araştırılmış yöntem, P53 geni aktarılmasıdır. p53 hücre genomunun koruyucusudur. Kanser tedavisinde sağlıklı P53 geni tümör hücrelerine girdiğinde kanserli hücre apoptoza uğrar. P53 geni taşıyan adenovirüs vektör tabanlı gen tedavisi ilacı, HNSCC (baş ve boyun skuamöz hücreli karsinom) hastalığının tedavisinde 2003 yılında Çin'de üretilmiştir.

b. İmmünoterapi

Tümör nekrozis faktörü (TNF) proteini güçlü bir antitümör sitokindir. Bu protein, hem doğrudan tümör hücrelerini öldürebilir hem de tümör vaskülizasyonunu arttırarak anti kanser ilaçların tümörün içine girmesini kolaylaştırır; böylece TNF proteinini alan kanser hücreleri kemoterapiye daha duyarlı olurlar. Tedavide, laboratuvar ortamında, bakteri hücrelerinde, TNF geni klonlanmalıdır. Daha sonra hastanın beyaz kan hücreleri alınıp kültüre edilmelidir. TNF geninin birden fazla kopyası beyaz kan hücrelerinin içine aktarıldığında beyaz kan hücreleri hastaya tekrar geri nakil edilecektir^{39,40}. Bu şekilde kanserli hücreye doğrudan saldırı ve bu hücrelerin ortadan kaldırılması gerçekleşecektir.

Diğer stratejide, en güçlü anti-tümör sitokini olan IL12'yi kullanmaktır. Bu sitokin, yardımcı T hücreleri-1 yanıtını indükler, doğal öldürücü hücreler (NK hücreleri) ve sitotoksik T lenfositleri etkinleştirir, tümöral neoanjiogenezi inhibe eder, endotelial hücrelerin üzerindeki adezin moleküllerinin ifadesini arttırır, lenfositleri tümöre çeker⁴¹. IL12 proteini doğrudan verilirse, vücuttaki konsantrasyonu arttığında toksik olabilir⁴¹; bu nedenle tümör bölgesinde lokal konsantrasyonunun artması için gen tedavisi teknikleri kullanılabilir. IL12 genini taşıyan adenovirüsler, çeşitli kanserli deney hayvanlarına aktarıldığında tümörün tamamen yok edilmesi ve hayvanın yaşam süresinin uzatılması sağlanmıştır⁴².

* c. İntihar Gen Terapisi: Anti-kanser İlaç + Gen Tedavisi

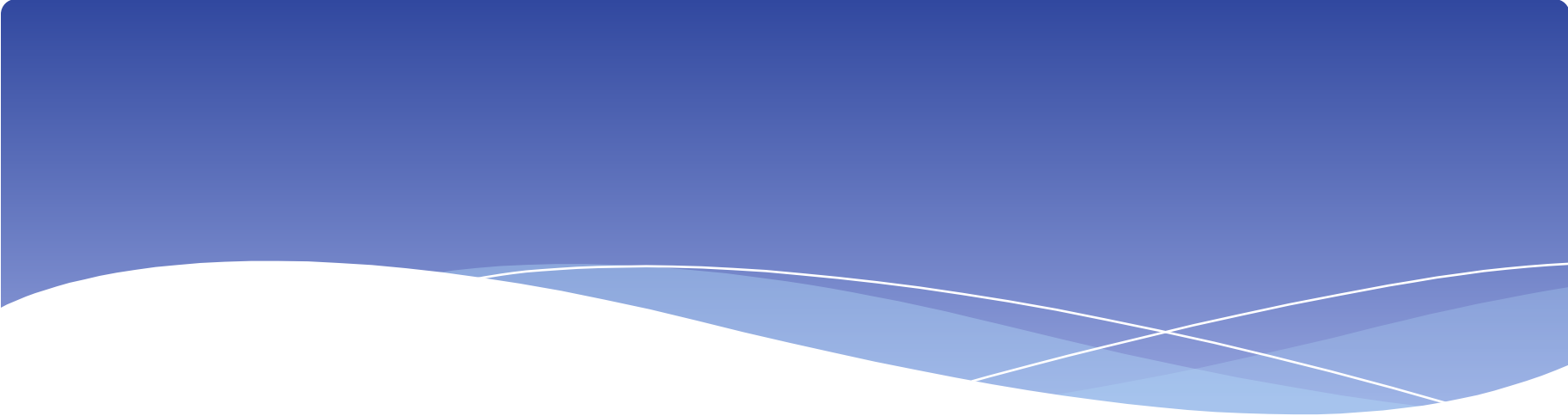
Bu tedavi yönteminde, hücrelerde zararsız olan bir ön-ilaç hastaya verilecektir. Daha sonra ön-ilacı aktifleşen ve normalde insanlarda bulunmayan bir enzim kanserli hücrelere verilecektir. Bu enzimin ifadesini ön-ilacı aktifleştirir ve toksik ilaç kanser hücrelerinin içinde üretilecektir. Sonuçta kanserli hücre ölecektir. Bu nedenle bu yönteme intihar gen tedavisi denir.

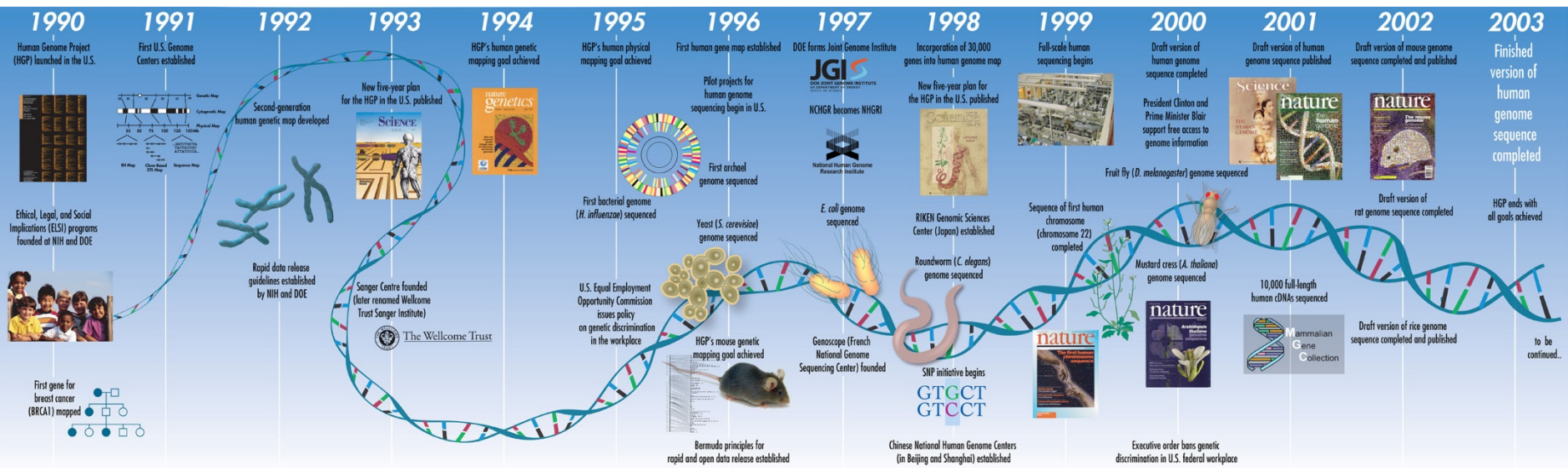
Gansiklovir tedavisi ve Timidin Kinaz

- * İntihar gen tedavisinde en yaygın kullanılan gen, herpes simpleks virüslerinde bulunan timidin kinaz (HSV-tk) enzimini kodlayan gendir. Bu enzim, insan hücreleri için toksik olmayan gansikloviri (GCV), gansiklovir monofosfat şekline dönüştürür. Daha sonra, kanser hücresinde de bulunan normal hücresel enzimler, gansiklovir monofosfatı gansiklovir trifosfata dönüştürür (GCV-TP). S fazı ve G2 fazında bir gecikme indüklenen HSV-tk/GCV-TP sistemi, kanserli hücreyi apoptoza sokar. Sadece kanser hücrelerinin içinde timidin kinaz enzimi üretilmesi nedeniyle, kanserli olmayan hücreler bu ilaçtan etkilenmez. Timidin kinaz geni aktarılması için değişik vektör sistemleri kullanılabilir, ancak tümör hücrelere spesifik olarak transfekte edilen onkogenik virüsler tercih edilir. İntihar gen tedavisinde kanser hücreleri spesifik olarak hedeflenmek için bu hücreler üzerinde bulunan çeşitli reseptörler kullanılır⁴³.

İNSAN GENOM PROJESİ

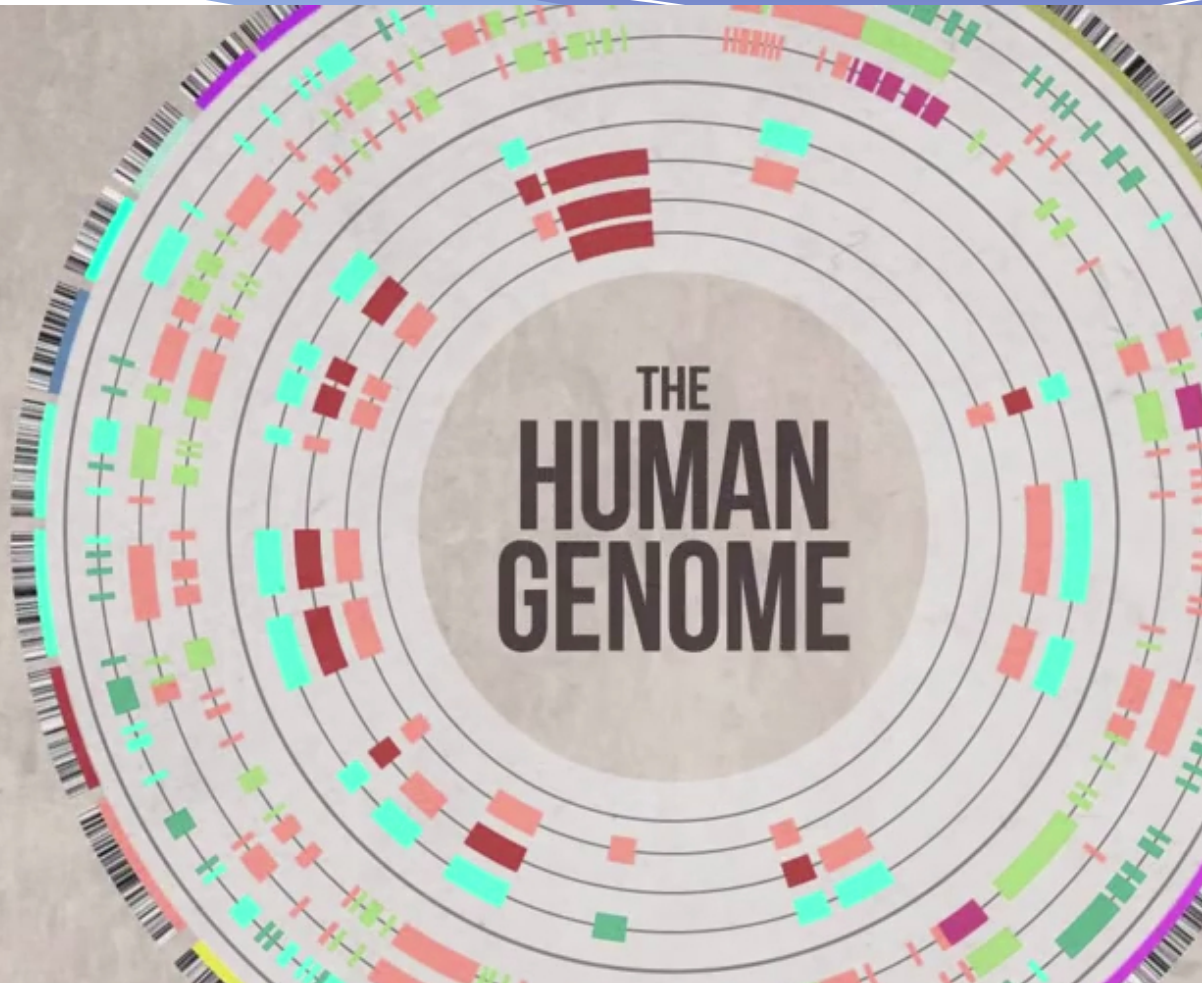
- * 1990 yılında ABD’de başlatıldı.
- * 18 ülke destek verdi
- * 1999 ilk insan kromozomunun tümü dizilendi.
- * İGP ile ilk başta 3 milyon DNA baz çiftinin %97.7 sinin dizilenmesi amaçlandı
- * 2000 yazında %90’nın çözülmesi amaçlandı ancak 1 Mayıs 2000’de 2.540.358.000 bazlık dizi (%79.1) tespit edildi.
- * Sonuç olarak
- * 2003’te %100’lük dizi tespiti amaçlandı. %18.6 (598.586.000 baz tespit edildi.

- 
- * 4 Eylül 2007'de, Craig Venter kendi DNA dizisinin tümünü yayınlamıştır. Bu, bir insanın 6 milyar harfli genomunun yayınlandığı ilk seferdir.



Projenin amacı insan gen haritasını çıkarmak ve genetik şifrenin çözülmesidir.

THE HUMAN GENOME



İnsan genom projesi ile

- * Gen bilgi bankalarının oluşturulması
- * Kalıtsal hastalıklara çareler
- * Genetik danışma