



Gen Tedavisi İçin Non-Viral Sistemler

Serpil Özkara ve Prof. Dr. Adil Denizli
Hacettepe Ünl. Kimya Böl.
Biyokimya ABD

Viral gen dağıtım ajanlarının bazı dezavantajlarının üstesinden non-viral sistemlerde gelinbilir. Hastalar üzerindeki çalışmalar bu sistemlerin tedavi amaçlı ve aşı olarak kullanım potansiyeline sahip olduğunu göstermiştir.

Gen tedavisinin gelişimine yönelik çalışmalarda potansiyel olarak tedavi edici proteinleri kodlayan modifiye virüslerin (vektör) insan hücrelerinin genlerine sokulması hedeflenmiştir. Amaç, virüslerce istila edilmiş hücrenin, geni hücre çekirdeğine transfer etmesini hızlandırmaktır. Hücre daha sonra gen tarafından kodlanan ihtiyaç duyulan proteini ifade etmeli ya da üretmelidir.

Virüsler, genleri transfer etmede etkilidirler. Çünkü, kendilerini belirli tipte hücrelere bağlayacak ve yüklerini etkili olarak hücre yapının içine aktaracak özel mekanizmalar geliştirmişlerdir. Buna rağmen gen dağıtım araçları ya da vektörler olarak virüslerin tedavi amaçlı olarak kullanılması bazı sorunlara yol açmaktadır. Virüslerin bir kısmı bulaştıkları hücrelerin DNA'sına zarar verebilmektedir. Ayrıca, zayıflatılmış virüsler büyük olasılıkla vücut içinde değişime uğrayıp tekrar patojenik aktivitelerini kazanabilirler. Bir diğer ciddi sorun ise hastanın mikrobiyal bağışıklık tepkisi üretebileceğidir. Bu tür tepkiler gen tedavisini çabucak etkisiz yapabilir. Çünkü bunlar, virüsün kendisine zarar verebilir ya da tedavi edici gen daha hastaya yardım şansını elde edemeden virüsün bulaştığı hücreleri öldürebilirler.

Bu nedenlerden dolayı, araştırmacılar uzun süreden beri hücrelere herhangi bir bulaştırıcı ajan kullanmaksızın tedavi edici genleri aktarmak istemektedirler. Doktorlar gen tedavisi ile iyileştirilen birçok hastalıktan sonra fark etmişlerdir ki, tek seferde kalıcı bir tedavinin amaçlandığı bir işlemde çok tekrarlanmış tedavilere büyük olasılıkla ihtiyaç duyulacaktır. Non-viral teknikler özellikle tekrar kullanımlar için uygun olabilir.

Çünkü bunlar, viral vektörlere zarar verecek bağışıklık tepkisini ortaya çıkarmazlar.

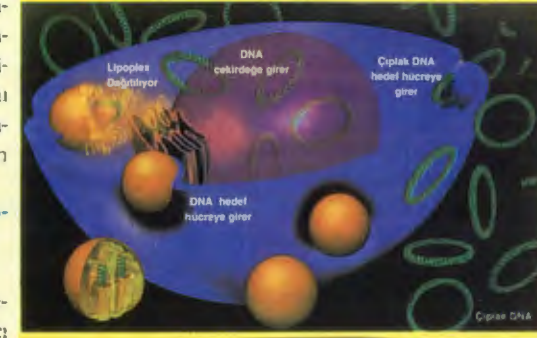
Non-viral tekniklerde insanlarda da denemekte olan DNA ve non-immunejenik lipidler kullanılmaktadır. Geçtiğimiz yıllarda, deney hayvanlarına ve hastalara çıplak DNA'ların enjekte edilmesinin kodlanmış proteinlerin ifadelerini sağlayabildiği görüldü. Bu yaklaşım, yeni aşıların geliştirilmesi için oldukça önemlidir.

Elektriksel Sorunlar

Bilimadamları, hücrelere değişik şekillerde yabancı DNA yerleştirerek hücre yapılarının geliştirilebileceği olasılığı üzerinde uzun zamandır durmaktadırlar. 1950'lerde yapılan çalışmalarda, hücreler, virüslerden elde edilen nükleik asitleri içlerine alabilir (RNA VE DNA) ve onları, protein olarak ifade edebilirler. Bu keşif, bilimadamları için gen transfeksiyonunun etkinliğini artırılması ve fonksiyonel genlerin hücrelere aktarımının geliştirilmesi için bir dürtü oluşturmuştur.

1960'lar boyunca araştırmacılar, hücreler tarafından DNA'nın alınmasına başlıca engel olarak, DNA molekülünün sulu ortamda negatif elektrik yüküne sahip olduğunu buldular. Bu durumda, DNA molekülü hücrelerin zarlarından itilmeye eğilim gösterir, çünkü hücre zarı da negatif yüküdür. Bu nedenle araştırmacılar DNA'yı elektriksel olarak nötralize eden kimyasallarla birleştirecek ve dolayısıyla hücre tarafından daha kolay emilmelerini sağlayacak

teknikler geliştirdiler. Bu tekniklerden biri, pozitif yüklü dietilaminooetil-dekstran isimli organik polimerin kullanılmasıdır. Diğer bir yöntem ise mineral kalsiyum fosfatın kullanılmasıdır. Araştırmacılar bu sayede insan hücre kültürlerinin genleri bünyelerine



alıp kalıcı olarak ifade edebilmelerini sağladılar.

1970'lerin sonlarında, hücrelerden tek tek genlerin alınıp bunların bakteri içinde doğal olarak çoğalan plasmid DNA'larına bağlanması tekniklerinin keşfedilmesi ile modern biyoteknoloji doğdu. Rekombinant DNA teknikleri araştırmacıların belirli genlerin birçok kopyalarını üretmelerine olanak sağladı. Daha sonra rekombinant DNA ve kimyasal hücre transfeksiyon teknolojisi ile, bakteriden elde edilen rekombinant plazmidler memeli kültür hücrelerinin içinde aktarım yoluyla geliştirildi. Plazmidlere eklenen genlerin ifade edilmesi, genlerin çekirdeğe alındığını gösterdi. Bu non-viral transfeksiyon teknikleri daha sonra, tedavi amaçlı rekombinant proteinlerin üretilmesi için bugün endüstrinin kullandığı memeli hücre kültürlerine uygulandı. Örneğin hemofili hastalarının kanında olmayan ve kanın pıhtılaş-

masını sağlayan Faktör VIII üretildi ve bu hastaların tedavisinde kullanıldı.

Lipozomlar

Lipozomlar dış taraftaki zar iki kat lipid molekülünden oluşan hayvan hücrelerine benzer. Sulu ortamda lipid moleküllerinde bu özellik meydana çıkar, çünkü kullanılan lipid moleküllerinin bir su-seven (hidrofilik) bir de su-sevmeyen (hidrofobik) ucu vardır. Su çözelttileri içinde bunlar çift katmanlı membranlar oluştururlar. Bunların içinde de hidrofilik başlar sulu dış ortama bakarken aynı görünüş uzun zamandır araştırmacıları düşündürmüştür. Bazı tedavi edici maddeler ile yüklü lipozomlar, hücreler ile kaynaşabilir ve içerdikleri maddeleri hücre içi yapıya aktarabilirler.

Lipozomlardan elde edilen sonuçlar cesaret vericidir. Fakat teknik bir sorun plasmidlerin hücrelere içine yayılmasıdır. Bir lipozomun iç çapı yaklaşık 0.025-0.1 mikron arasındadır, tipik olarak bir plasmid DNA'sının en uzun çapından oldukça azdır. Bu da 2 mikron kadardır. Bu uyumsuzluk plasmidlerin varlığında lipozomlara sentezlendiğinde sadece birkaç plasmidin sıkıca enkapüle edilmesi anlamına gelir.

Bununla birlikte, iyimser bilimadamların enkapülasyon oranının artırılması için yeni yöntemlerin bulunabileceğine inanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda lipozomlar modifiye edildi. Bunun için geliştirilen fikir, standart lipid molekülleri yerine su seven tarafında pozitif yük taşıyan lipidler kullanılarak lipo-

zomlar hazırlamaktı. Bu lipozomlar hücre yüzeyleriyle olduğu gibi DNA ve RNA ile daha kolayca etkileşim yapacaktı. Fakat 1980'lerde lipozomlar içinde organize olacak doğru şekilde sahip çok az pozitif yüklü değişik (katyonik) lipid örneği vardı. Dolayısıyla doğru özelliklere sahip olduğu düşünülen değişik katyonik lipidler sentezlendi. Bu moleküller beklenen davranışı göstererek, kas kültürü içindeki hücrelerin yüzeyine sıkıca bağlandılar. Ayrıca, basit olarak plasmidleri, kendi kütlelerinin yaklaşık sekiz katı katyonik lipidle karıştırarak etkin bir şekilde tüm DNA enkapüle edildi.

Keşfin kullanılması

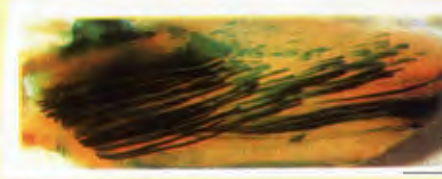
Plasmidlerin ve katyonik lipidlerin karışımından oluşturulan yapılar, sade lipozomlardan daha değişik ve karmaşıktır. Örneğin sık sık plasmidler tüp şeklinde lipid yapıları içinde çevrelenmiş olarak bulunabilir ve doğru koşullar altında plazmid içeren lipid bir tüp, bir lipid duvar ile kalın bir partikül oluşturmak için katlanabilir. Bu oluşan yapı, bazı virüslerin yapılarına benzer. Katyonik lipidlerden oluşan yapılar basit lipozomlarından çok farklı olduğundan, araştırmacılar bunlara farklı bir isim vermeye karar verdiler: Lipoplexler.

Lipoplexlerin yüklerini hücrelere içine dağıtmadan önce araştırmacılar onları daha ileri bir seviyeye modifiye etmek zorunda kalacaklarını düşündülerse de sonrasında bu yapıların hücreleri önemli bir oranda transfekte ettiğini gözlediler. Katyonik lipidleri DNA ile karıştırmak genleri hücre kültürlerine sok-

mak için o zamandan beri bir standart teknik oldu. Şimdi bir çok katyonik lipid preparasyonları ticari olarak elde edilebilir.

Araştırmacılar son zamanlarda insanlarda lipoplex çalışmaları bastırdılar. İlk aday tedavide, majör histokompatibilite antijeni olarak bilinen, bağışıklık sisteminin bir proteini HLA-B7'yi kodlayan geni ihtiva eden lipoplexler kullanıldı. Kanser hücreleri HLA-B7'yi ifade ettiklerinde, hastanın bağışıklık sisteminin tahrik ederek onları yabancı olarak tanıtır seçerek yok etmeye sevk ederler. Klinik protokollerde standart kanser tedavisine cevap vermeyen 90'dan fazla hastanın HLA-B7'yi kodlayan DNA'yı ihtiva eden lipoplexler tümörlere enjekte edildi.

Bir çok vakada, araştırmacılar tedavinin HLA-B7 üretimini artırdığını gösterdiler. Hastaların 60 tanesi öldürücü melanomadan (kanser) şikayetçiydi. Bu vakaların yaklaşık üçte birinde lipoplex enjekte edilen tümör azaldı ya da yok oldu. İlerlemiş melanoma sıkça vücuda yayılır, dolayısıyla görülen tümörlere ilaçların enjekte edilmesi tüm vakalarda başarıya ulaşmamıştır. Fakat cesaret verici bir başlangıç olarak bulgular göstermektedir ki, lipoplexler melanomanın tedavisi için yardımcı olabilirler. Bazen lipoplexlerle yapılan tedaviler ilaç enjekte edilmeyen tümörleri bile azaltmaktadır. HLA-B7 proteinini kodlayan geni kapsayan lipoplexlerle diğer çalışmalar, ameliyat edilemeyen kolon, böbrek ve göğüs kanserleri gibi benzer hastalıkların güvenli ve etkin tedavisini amaçlamaktadır.



Çıplak DNA plazmidleri enjekte edilmiş fare kası plazmidleri alır ve proteinleri üretir ve kodlar.

Bağışıklık sistemi proteini interleukin-2 (IL-2)'yi kodlayan geni içeren bir lipoplex yapısı da klinik denemede kullanılmıştır. IL-2 hastalara böbrek kanserini tedavi amaçlı verilmiştir. Fakat çok ciddi toksik yan etkileri gözlenmiştir. Ayrıca cıstic fibrosis hastalarında lipoplexler denenmektedir. Bu hastalığı tedavi etmek için, lipoplex yapıları hastalığıdaki kusurlu proteini kodlayan gen taşırlar (membrane geçiş kabiliyetini düzenleyici protein). Lipoplexler, hastanın akciğerine bir aerosol spreyi ile dağıtılır ki burada protein ifadesinin, hastalığın en ciddi bir çok semptomunu azaltabileceği ümit edilmektedir.

Lipoplex yapıları ile hayvanlarda elde edilen gen ifadesinin etkinliğinin seviyesi, bazı durumlarda viral gen dağıtım sistemleri ile elde edilen seviyelerle karşılaştırılabilir. Bazı virüsler genomlarını hücrelere içine aktarmada hemen hemen yüzde 100 etkilidir. Dolayısıyla 1000 virüs doğru tipte yaklaşık 1000 hücreyi enfekte edebilir. 1000 tane hücreyi lipoplexlerle transfekte etmek için karşılaştırılabilir bir miktarda lipoplex içinde yaklaşık 10 milyon gen kopyası gerektirir. Bu sonuç lipoplex yaklaşımını 10 bin kat daha az etkili yapar.

Araştırmacılar lipoplexlerin etkinliğini artırmak için aradığı diğer bir strateji, virüsleri belirli hücre tiplerine yönlendiren, onların dış yüzeyindeki protein ya da protein yapılarıyla çalışmaktadır. Aynı zamanda, genin bozulmaması ve transfekte edilen hücrelerde fonksiyonunu kolaylaştırmak için diğer

moleküllerle de çalışılabilir. Örneğin normalde virüslerin, hücrenin içiye atım sisteminden kaçmasına yardım eden membrane füzyon proteinleri ile çalışılabilir. İlave olarak, araştırmacılar çekirdek hedefleme sinyalleri olarak bilinen önemli viral proteinlerini genlere bağlamak suretiyle viral genlerin hücre çekirdeğine yönlendirilmesine yardımcı olmayı denemektedirler.

Aynı zamanda araştırmacılar çıplak DNA için de uygulamalara devam ettiler. 1980'lerin sonlarında lipoplexler klinik deneylere girmeden çok önce, araştırmacılar şaşırtıcı bir şey keşfettiler. Bu çalışmaya göre hangi lipid formülasyonunun hücrelere gen dağıtımında daha etkili olduğunu bulmak için, belirli, kolay izlenebilir genler ihtiva eden lipoplexler değişik fare dokularına enjekte edildi ve bunların ifadesinin ölçülmesine karar verildi. İskelet kaslarından elde edilen gen ifade seviyeleri, kültür içindeki hücreleri transfekte ederek elde edilen en iyi sonuçlarla karşılaştırılabilir düzeydeydi. Bazı çalışmalarda bir kontrol deneyi olarak kullanılmış olan DNA'nın kendisi, lipid formülasyonundakine benzer ya da daha yüksek gen ifade seviyeleri vermiştir.

Çıplak DNA

Araştırmacılar, bu deneyleri değişik laboratuvarlarda birçok kere tekrarladılar, fakat elde edilen sonuçlar hep aynıydı. Bir hayvanın kasına enjekte edilen çıplak DNA protein olarak ifade edilmekteydi. Daha da fazlası, oldukça yüksek bir lokal protein derişimi elde edildi.

Bu da her bir gramlık kas dokusu için 100 nanogram gen üretimiydi.

Hücre yüzeyleri ile DNA arasındaki elektriksel geri tepkinin aksine görüldü ki birkaç hücre yine de DNA molekülünü emebilir. Belki de bir miktar kas hasan ya da enfeksiyon yapılan bölgede artan basınç bunda bir rol oynamaktadır.

Prensip olarak, böyle gözüküyor ki hastaların kaslarına daha sonradan, seçilmiş bir proteinin terapötik miktarlarını üretecek çıplak DNA enjekte edilmesi mümkün olabilecektir. Şeker hastalığını tedavi etmek için insülinin ya da hemofili tedavisi için Faktör VII ya da IX'un daha iyi yollarla hastalara verilmesi gerekmektedir. Bununla birlikte bu ön çalışmalarda kasın içinde üretilen lokal olarak yüksek derişimlerde protein dahi kan içinde üç litre plasmanın içinde seyreltilmiş, bu hastalara karşı yeterli derecede etkili olmamıştır.

Araştırmacıların bir başka çıplak DNA çalışmasında, farelere eritropoietin kodlayan çıplak plazmidler enjekte edilerek bu hayvanlarda kırmızı kan hücrelerinin üretimini teşvik edilebileceği bulundu. Bu hormon, kemoterapi ve radyasyon tedavisinden sonra hastalarda yeni kırmızı kan hücrelerinin oluşumuna yardımcı olur. Belki de gelecekte kas içine benzer rekombinant plazmidlerin enjekte edilmesi, entriopietinin kendisinin enjekte edilmesinden daha ucuz bir alternatif teşkil edecektir.

Yakın dönemlerde, çıplak DNA'nın aşılarla kullanılması bir sözdü, çünkü çok küçük miktarlarda bir protein bile koruyucu bir bağışıklık cevabını teşvik edebilir. İmmunolojik çalışmalar proteinlerin iki değişik çeşitte bağışıklık cevabı ortaya çıkardığını göstermiş-



Kültür hücresi tarafından Lipoplexin emilimi.

tır. İlki, humoral bağışıklık, patojenden sonra gelişir ve yabancı madde bağışıklık sisteminde yok edilir. Özel hücreler, mikropları, yabancı proteinleri (antijen) antipadi (antikor) salgılayan B lenfosit olarak adlandırılan hücrelere tanıtır. B lenfositler belirli yabancı proteinleri tanıyan antipadileri oluşturarak cevap verirler. Bu antipadiler antijenle tekrar karşılaşırsa, çabucak patojene bağlanacak ve onu nöralize edecek ya da onu bağışıklık sisteminin diğer bileşenleriyle yok etmek için işaretleyecektir.

İkinci tip cevap, hücresel bağışıklık olarak bilinir ve akın eden patojenler hücreleri kolonize edip onları patojenleri daha çok yapma-

DNA hücrelere akın ettiği için hücresel bağışıklığı aktive edebilirler. Araştırmacıların yaptıkları deneyler gösterdi ki, fareler HIV (insan immunosistemini baskılayan virüs)'den elde edilen ve bir tabaka proteinini kodlayan plazmid enjekte edilmesi, farelerin HIV prteinlerine bağlanan antipadiler üretmesini teşvik etmiştir.

İleriye bakış

Araştırmacıların bir başka çalışmasında, grip virüsünün plazmidlerinin farelere bağışıklık kazandırmakta kullanılabileceğini sonuçta bağışıklık kazandırılmamış fareler için öldürücü olabilecek dozlardan, bağışıklık kazandırılmış farelerin ölmedikleri gösterilmiştir. Bu çalışmalar, uzun süreli hücresel ve hu-

mek kadar, bu aşılarda zaten hasta olanlarında bağışıklık sistemlerini teşvik edebilir. Beyaz kan hücrelerinin kanseri olan lenfoma için çıplak DNA klinik denemesi planlanmaktadır.

Lipoplex ve çıplak DNA gen tedavisindeki tek nonviral yaklaşımlar değildir. Araştırmacılar aynı zamanda DNA ile kompleksler oluşturan çeşitli nonlipid katyonik polimerler üzerinde de çalışmaktadırlar. Bu yapılar, poliplexler olarak bilinir ve klinik deneylerde önemlidirler.

Nonviral gen tedavisinin önemli bir amacı kan içine enjekte edilebilecek dağıtım sistemlerinin ve onların DNA dizilerini akciğer, karaciğer, dalak ya da kemik iliği gibi uygun dokulara dağıtımının geliştirilmesi olacaktır. Hap olarak yutulabilecek gen dağıtım sistemleri gen tedavisini biraz daha elverişli hale getirebilir. Ve eğer dağıtım sistemleri özellikle tümör hücrelerini hedefleyecek şekilde yapılabilsen bunlar çeşitli şekillerde kanser tedavisini geliştirebilir. Eninde sonunda gen tedavisi insanların genetik hastalıklı ya da kanserli hücrelerindeki mutasyona uğramış genleri düzeltmekte kullanılacaktır. Genleri hedefleme olarak bilinen bir teknik mümkün bir başlangıç sunar: bu da başarılı bir şekilde hücre kültürlerinde kullanılabilir.

Lipoplexler, poliplexler ve çıplak DNA yoluyla hücrelere nonviral gen dağıtımı önemli ve gelişen bir araştırma alanıdır. Eğer gelişim şu anki hızla devam ettirebilirse gelecek on yıllar, sıkça rastlanan hastalıkların tedavisi ve önlenmesine yönelik rutin bir temelle idare edilen bu teknolojiye dayanan birçok ürünleri görebilecektir.

Kaynakça

Scientific American ●



Lipoplex melanoma hastalarında kanserle savaşmada kullanılmaktadır.

ya zorladıklarında gelişir. Küçük parçalar halindeki patojenlerin proteinleri, daha sonra bulaştıkları hücrenin yüzeyinde sergilenirler. Bağışıklık sistemi daha sonra bu parçacıkları tanıyan aktive edilmiş T lenfositleri üretmekle cevap verir. Bu lenfositler antipadi üretmez fakat enfekte edilmiş hücreleri doğrudan yok eder. Patojen vücuda tekrar akın ederse, hastalanan hücreler yabancı proteinleri sergiler ve dolayısıyla yok edilirler. Çıplak

moral bağışıklık cevapları oluşturacak DNA aşılmasının geliştirilmesine yönelik gelişmelere doğru genişletilmiştir. Merck firması, insanlara yönelik klinik deneylerde kullanılmaya aday çıplak DNA grip aşısına sahiptir.

Herpes, Malaria ve HIV için DNA aşılmasının klinik testlerinin yapılması uzak bir gelecekte değildir. Uzun dönemde verem, Papilloma, Chlamydia ve hepatit hedef hastalıklar olabilir. Hastalığı önle-