



Doç. Dr. Mehmet Ali ERGÜN

Malatya, 1970 doğumlu olan Dr. Ergün, TED Ankara Koleji'nden 1988 yılında mezun oldu ve aynı yıl Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde eğitim görmeye başladı. 1996-1999 yılları arasında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda uzmanlık eğitimi tamamladı. 2000 yılında Ankara Zübeyde Hanım

Doğumevi'nde çalıştıktan sonra, Ekim 2000 yılında Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda Uzman kadrosuna atandı. 2003-2005 yılları arasında Öğretim Görevlisi olarak görev yapan Dr. Ergün Ocak 2006 tarihinde Yardımcı Doçent, Ekim 2006 tarihinde Tıbbi Genetik alanında Doçent unvanı aldı. Aynı anda Tıp Bilişimi Anabilim Dalı'nda görevlendirmeye öğretim üyesi olarak çalışmaktadır. Dr. Ergün'ün uluslararası dergilerde yayınlanmış 30 adet makalesi mevcuttur.

GEN TEDAVISI

Rekombinant DNA teknolojisinin, İnsan Genom Projesinin ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmelerin genetik ve diğer hastalıkların tedavisine gelecek yıllarda büyük katkı sağlayacağı açıktır. Genetik hastalıklarda, edinsel hastalıklardan farklı olarak, sadece hastanın değil ailenin diğer bireylerinin de risklerinin araştırılması ve bilgilendirilmeleri gereklidir. Tek gen hastalıklarının tedavisinde temel prensip; hatalı proteinin değiştirilmesi, fonksiyonunun iyileştirilmesi ve eksikliğin/fazlalığın etkilerinin giderilmesidir (Tablo 1). Günümüzde söz konusu hastalıklarının tedavisi oldukça yetersizdir. Gen tedavisi, hastalığın oluş mekanizması ve ortaya çıktığı dönemde yaptığı geri dönülemez patolojileri nedeni ile tek gen hastalıkları için ümit ve-

rici bir yöntemdir. Ancak uygulanabilmesi için hastalığın biyokimyasal temelinin aydınlatılması, patofizyolojisinin anlaşılması ve doğru moleküler tanı ön şarttır ancak pek çok genetik hastalığın mutant gen lokusu henüz bilinmemektedir.

Gen tedavisi, tedavi amaçlı olarak hücreye bir genin aktarılmasıdır. Tedavinin amacı ise, mutant (farklanmış: değişime uğramış) fenotipi düzelterek hastanın iyileştirilmesidir. Germ hücrelerine gen kopyasının aktarılması (germinal genoterapi) yeni mutasyon yaratma riski taşıdığı ve oluşan mutasyonun da yeni kuşaklara aktarılma riski olduğu için, etik olarak uygun bulunmamaktadır. Tedavi için, normal genin uygun somatik hücreye (somatik genoterapi) aktarılması gerek-

mektedir. Bu gen aktarımı esas olarak iki yöntem sonrasında uygulanmaktadır. Birincisi *ex vivo* yöntemidir ki burada kültürde üretilen hücrelere gen transfer edilir ve daha sonra hastaya verilir. İmmun cevap ortaya çıkmaması için genellikle oto-log hücreler tercih edilmektedir. Diğeri ise *in vivo*

yöntemdir. Genlerin direkt olarak dokulara transfer edildiği bu yöntem, hücrelerin kolay kültüre edilemeyeceği durumlarda tercih edilmektedir. Bu uygulama, viral vektörler veya direkt DNA'nın transfer edilmesinde kullanılan yöntemdir.

Tablo 1: Genetik Hastalıkların Tedavisi için Kullanılan Yöntem Örnekleri*

Tedavi	Hastalık
İlaçlar ile enzim indüksiyonu	Konjenital non-hemolitik sarılık
Fenobarbiton	
Eksik enzim/proteinin yerine konması	
Doku tırsplantasyonu Kan transfüzyonu	adenozin deaminaz eksikliğine bağlı SCID tedavisi mukopolisakkaridozlar
Kemik iliği transplantasyonu Enzim/protein preparatları Tripsin α_1 - antitripsin Faktör VIII α -glukozidaz	tripsinojen eksikliği α_1 - antitripsin eksikliği hemofili A Gaucher hastalığı
Vitamin veya koenzim eksikliğinin yerine konması B6 B12 Biotin D	homosistinüri metilmalonik asidemi propiyonik asidemi D vitaminine dirençli raşitizm
Eksik ürünün yerine konması	
Kortizon Tiroksin	konjenital adrenal hiperplazi konjenital hipotiroidizm
Diyette substrat kısıtlaması	
Aminoasitler fenilalanin lösin, izölösün, valin Karbonhidrat galaktoz Lipid kolesterol Protein	Fenilketonüri Maple syrup urine hastalığı Galaktozemi Ailesel hiperkolesterolemi Üre siklus hastalıkları
İlaç tedavisi	
Aminokaproik asid Dantrolen Kolestiramin Lovastatin Pankreatik enzimler Penisilamin Sodyum benzoat Bütirat	Anjionörotik ödem Malign hipertermi Ailesel hiperkolesterolemi Ailesel hiperkolesterolemi heterozigotları Kistik fibrozis Wilson hastalığı, sistinüri Üre döngüsü hastalıkları Orak hücreli anemi ve β talasemi

İlaç/gıda sakınılması	
Sulfonamidler Bakla Barbitüratlar	G6PD eksikliği Porfiri
Hastalanmış dokunun değiştirilmesi	
Böbrek transplantasyonu Kemik iliği transplantasyonu Karaciğer transplantasyonu	Erişkin polikistik böbrek hastalığı Fabry hastalığı β talasemi, X'e bağlı SCID, Wiskott Aldrich sendromu Hurler sendromu α_1 - antitripsin eksikliği
Hastalanmış dokunun çıkarılması	
Kolektomi Splenektomi	Polipzis koli Kalıtsal sferositoz
Cerrahi düzeltme operasyonları	
	Konjenital malformasyonlara yönelik operasyonlar Konjenital kalp hastalığı Pilor stenozu Yarık dudak -damak Omfalosele İnmemiş testis

* Muller RF, Young ID: Emery' Elements of Medical Genetics , 9th ed. Churchill Livingstone, 1997 kitabının 23. bölümündeki tablodan yararlanılmıştır.

SCID: ağır kombine immün yetmezlik, G6PD: glukoz 6 fosfat dehidrojenaz

Etik ve etkin bir gen tedavisi için bazı temel ön koşulların yerine getirilmesi gereklidir. Bunlar;

- İlgili gen lokusunun, moleküler patolojisinin ve hastalığın biyokimyasal temelini bilmesi,
- Hastalığın şiddetinin ağır ve diğer tedavi yöntemlerine göre risk/yarar oranının daha yüksek olması,
- İyi bir hedef hücrenin veya dokunun bulunması,
- Genin yapısı, kullanılacak vektör ve hedef hücrenin uygun olduğunun, kültüre edilmiş hücrelerde ve hayvan deneyleri ile gösterilmiş olması,

- Protokollerin uygunluğunun ilgili komitelerce onaylanmasıdır.
- İlgili gen lokusunun, moleküler patolojisinin ve hastalığın biyokimyasal temelini bilmesi,

Gen lokusunun ve moleküler patogenezin bilinmesi hastalığın tedavi stratejisinin belirlenmesinde çok önemlidir. Tek gen hastalıklarının içinde oldukça büyük bir kısmı kapsayan otozomal dominant (OD) hastalıklarda, çoğunlukla mutasyon ilgili gen kopyasının **fonksiyon kaybı (loss of function)** ile ilişkilidir. Burada gen tedavide, ilgili genin normal bir kopyasının yerine konulması en etkili yaklaşım olacaktır. Oysa daha nadir de olsa Huntington hastalığında olduğu gibi, **genin farklanmış ve/veya artmış fonksiyonunun (gain of function)** olduğu durumda, normal bir gen kopyasının verilmesi hastalığın ilerlemesini daha da dramatik hale getirecektir. Bu durumda uygun yaklaşım normal kopyanın

mutant kopya ile homolog olarak rekombinasyonunu yapmak veya mutant geni ona komplementer (karşılık gelecek olan; baz eşleşmeleri uyumlu) olan bir oligonükleotid ile kapatmaktır. Burada oligonükleotid olarak genellikle kısa RNA dizileri kullanılarak proteinin sentezlenmesinin engellenmesi amaçlanmaktadır.

- *Hastalığın şiddetinin ağır ve diğer tedavi yöntemlerine göre risk/yarar oranının daha yüksek olması,*

Gen tedavide seçilecek hastalık klinik olarak son derece şiddetli seyreden, diğer tedavi yöntemlerinden etkin olarak faydalanmayan ve ilerleyici bir hastalık olmalıdır. Örneğin transfüzyon gereken β -talesemi hastalığı, Duchenne kas distrofisi, ağır immun yetmezlik tabloları gibi...

- *İyi bir hedef hücrenin veya dokunun bulunması,*

Burada seçilecek hücrelerin yaşam sürelerinin uzun ve aynı zamanda da kendiliğinden çoğalabilme (replik olma) özelliklerinin olması gerekmektedir. İdeal hedef hücreler kök hücreleri veya çoğalma potansiyeli yüksek olan öncül hücrelerdir. Şu anda bu hücreler için gen transferinde kullanılan doku kemik iliğidir. Endotel hücreler damarların duvarlarını çevreledikleri için çok kullanışlı hedef hücreler olabilirler

- *Genin yapısı, kullanılacak vektör ve hedef hücrenin uygun olduğunun, kültüre edilmiş hücrelerde ve hayvan deneyleri ile gösterilmiş olması,*

Gen tedavisinde, gen transferi iki şekilde yapılmaktadır. Biri virüs aracılı gen transferidir ki, burada virus vektör; yani geni taşıyan araçtır. Bu şekildeki transfere **transdüksiyon** denilmektedir. Diğeri ise virüs kullanılmadan, örneğin direkt enjeksiyon gibi yöntemleri kullanarak gen transferi yapmaktır ki buna da **transfeksiyon** denilmektedir. Transfer sonucu gen kromozomlara entegre olabilir ya da ekstra kromozomal olarak (epizomal) kalır.

Gen tedavisi ilk defa 1980 yılında otozomal resesif bir hastalık olan β -talesemide, globulin geninin transferi ile denenmiş ama transfer başarılı olmadığı için genin etkin düzeylere ulaşması sağlanamamıştır. İlk defa başarı ile, virüs aracılı gen transferini 1990 yılında Dr. French Anderson ve arkadaşları gerçekleştirmiştir. Bu ekip, **adenozin deaminaz enzimi (ADA)** eksikliği olan iki çocukta, viral vektör olarak adenovirüsü kullanarak, gen tedavisini uygulamışlardır. ADA eksikliği, çok nadir görülen ve immün sistemin etkilendiği bir hastalıktır. Öyle ki tedavi edilmediği takdirde herhangi bir viral enfeksiyon bile, hastada ağır bir klinik tabloya neden olabilmekte hatta hastanın yaşamını tehdit etmektedir. ADA eksikliğinin, gen tedavide seçilmesinde, bu enzimin az miktarda üretiminin bile klinik yararı olması, yüksek miktarlarda üretiminin de ciddi zarar oluşturmaması etkili olmuştur. Yani oluşacak ADA proteinin düzeylerinin çok sıkı kontrolü gerekmemekte, bu da gen tedavinin başarı şansını artırmaktadır. Sonuç olarak iki çocuktan bir tanesi tedaviden orta düzeyde yarar görürken, Ashanti De Silva adında 4 yaşındaki çocuk tedaviye çok iyi cevap verdiği için, tarihe adını gen tedavisinin başarı ile uygulandığı ilk hasta olarak yazdırmıştır.

Gen tedavide en sık kullanılan vektörler **adenovirüsler** ve **retrovirüslerdir**. Her ikisinin de avantaj ve dezavantajları mevcuttur. **Adenovirüsler**, hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri hedef alabilmektedir. Bunların en büyük avantajı kendi DNA'larının girdikleri konakçı DNA'larına entegre olmamaları (insertional mutagenesis) yani konakçı DNA'larına zarar vermemeleridir. Bu avantajlı durum aynı zamanda transfer edilen genin kısa süreli ifade edilmesine neden olmaktadır, yani uzun süreli etki söz konusu olamamaktadır. En büyük ve korkulan dezavantajı ise immunojenik etkisidir. Üre döngüsü hastalıklarından ornitin transkarbamilaz eksikliği olan bir hastanın gen tedavisi esnasındaki immün reaksiyon sonucu ölümü, bu viral ajanla olan çalışmaların tekrar sorgulanmasına neden olmuştur. Yine de büyük genlerin (35 kilobazlık genler) transferini sağlaması açısından değerlidir. **Adenovirüsler** DNA virüsleridir ve üst solunum sistemine, korneaya ve gastrointestinal bölgeye özgüllük gösterirler ve daha küçük genlerin (4.5 kilobazdan küçük) transferinde kullanılmaktadır. Hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri enfekte ederler. Kromozomal DNA'ya entegre olduğu için transfer edilen genin etkisi uzun sürecektir. Bölünmeyen hücrelere transfer edilebilmesi ve az immün yanıt oluşturmaları avantajlarıdır.

Retrovirüsler, pek çok hücreye girebildikleri ve immün reaksiyon oluşturmadıkları için, 8 kilobazın altındaki genlerin transferinde kullanılmaktadırlar. Sadece proliferen hücreleri etkilemesi kanser tedavilerinde önemlidir. Tedavi sırasında bölünmeyen hücrelerin korunması bu bakımdan

avantaj yaratmaktadır. Bunların en büyük dezavantajı konakçı hücrenin DNA'sına entegre olmalarıdır (insertional mutagenesis). Konakçı hücre DNA'sına girmeleri, DNA'da hasara neden olmaktadır ve hastalarda kanser oluşumuna neden olabilmektedir. Sonuç olarak hastanın mutant geninin tedavisi amaçlanırken, kullanılan vektörün dezavantajına bağlı ölüm görülebilmektedir.

Vektör olarak kullanılan bir diğer virüs **lenti-virüstür**. Bunlar retrovirüs formları olduğu için, retrovirüslerle aynı dezavantaja (insertional mutagenesis) sahiptirler. Avantajları bölünmeyen hücrelere de etki edebilmeleridir.

Virüs harici gen transferi (**transfeksiyon**), direkt DNA'nın verilmesi ile, lipozomlar ile ve reseptör aracılı endositoz ile olmaktadır. Transfeksiyonun en büyük avantajı, konakçı hücreye entegrasyonun (insertional mutagenesis) engellenmesi yani DNA hasarının önlenmesidir. Viral ajan olmadığında sağlanan bu yarar, hangi yöntem seçilirse seçilsin DNA'nın konakçıda kısa süreli kalması ile sonuçlanmakta ve etkin tedavinin yapılamamasına neden olmaktadır. DNA'nın **direkt olarak enjeksiyonu** ilk defa, distrofin geninin eksikliği veya kısmi azlığı ile seyreden Duchenne kas distrofisinde, kaslara direkt DNA'nın verilmesi ile denenmiştir. Bazı kaslarda az oranda distrofin genine rastlansa da, uzun süreli olarak genin kas dokuda etkinliği sağlanamamıştır. Sık görülen hastalıklardan olan (1/600 – 1/10 000) kistik fibrozisde, DNA **lipozom** içinde hastaya verilmiştir. Lipozomlar, zarda çözünebilen sentetik lipid yapıda veziküllerdir. Bunlar çok büyük DNA

moleküllerini taşıyabilmeleri açısından avantajlı olmakla beraber, sürekli olarak genin ifadenmesi sağlanmadığı için tedavide etkin düzeylere çıkılamamaktadır. Diğer yöntem olan **reseptör aracılı endositoz**da, amaç hücre yüzeyindeki proteine DNA'nın bağlanarak hücre içine sokulmasıdır. Buradaki en büyük dezavantaj ise hücrede bulunan yıkım organeli olan lizozomların, diğer endositoz materyallerini yıktığı gibi, DNA'yı da yıkmaları ve çok az oranda DNA'nın ortamda kalabilmesidir. Burada da etkin tedavi sürecini başlatacak kadar DNA'nın ortamda kalabilmesi sağlanamamaktadır.

- *Protokollerin uygunluğunun ilgili komitelerce onaylanması,*

Gen tedavideki en hassas noktayı **etik yaklaşımlar** oluşturmaktadır. Gen tedavi için başvuran hastalar, tüm tedavi şanslarını denemiş artık son umut olarak buna yönelmiş ve en önemlisi 'artık kaybedecek hiçbir şeylerinin kalmadığını' düşünen hastalardır. Onlar her şeyi denemeyi göze almış durumdadırlar. Tedavi protokolleri ise çoğunlukla denenmemiş veya çok az denenmiş ve güvenliliği hakkında çok fazla veri içermeyen yaklaşımlardır. O yüzden burada, tedaviyi planlayan, hastalara bilgilendirilmiş onam sunan ve tedaviyi gerçekleştirecek olan hekimlere çok büyük sorumluluk düşmektedir. Bu nedenle gen tedavi protokollerinin hem lokal, hem de ulusal etik komitelerden onaylarının alınmış olmaları gerekmektedir.

Sonuç olarak; gen tedavisin üç temel riskini; 1- hastanın vektöre veya transfer edilen gene

olumsuz reaksiyon vermesi, 2- transfer edilen genin hastanın DNA'sına entegre olarak bir protoonkogeni aktive etmesi ya da herhangi bir tümör baskılayıcı genin yapısını bozarak kansere yol açması, 3- yerleştirilen genin çok temel bir genin yapısını bozması ve hücrenin yaşamını sonlandırması olarak özetleyebiliriz. Tüm bu riskleri önlemeye yönelik yeni düzenlemeler geliştirilmeye çalışılmaktadır. Tek gen hastalıkları ve son yıllarda da kanserler için gen tedavisi uygulamaları henüz istenilen seviyede bir başarı yakalamasa da, bu konudaki çalışmalar artan bir ivme ile devam etmektedir. Gen tedavisinin, uzun vadede hastalıkların tedavisi için oldukça ümit verici bir yöntem olduğu son derece açıktır.

Kaynaklar:

- 1- Basel TB, Boston M (1999). **Gene therapy: principles and applications**, Birkhauser Verlag, pp. 1-102.
- 2- Selkirk SM. Gene therapy in clinical medicine. **Postgrad Med J**, 2004, 80(948):560-70.
- 3- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF, Boerkoel III CF (2005). **Thompson & Thompson: Tıbbi Genetik**. 6. Baskı, Güneş Kitabevi, Ankara, Sayfalar: 269-275.
- 4- Young ID (2005). **Medical Genetics**, 1st Ed. Oxford University Press. pp. 232-239.
- 5- Muller RF, Young ID (1997). **Emery' Elements of Medical Genetics**, 9th ed. Churchill Livingstone, Edinburg. pp. 277-286.