

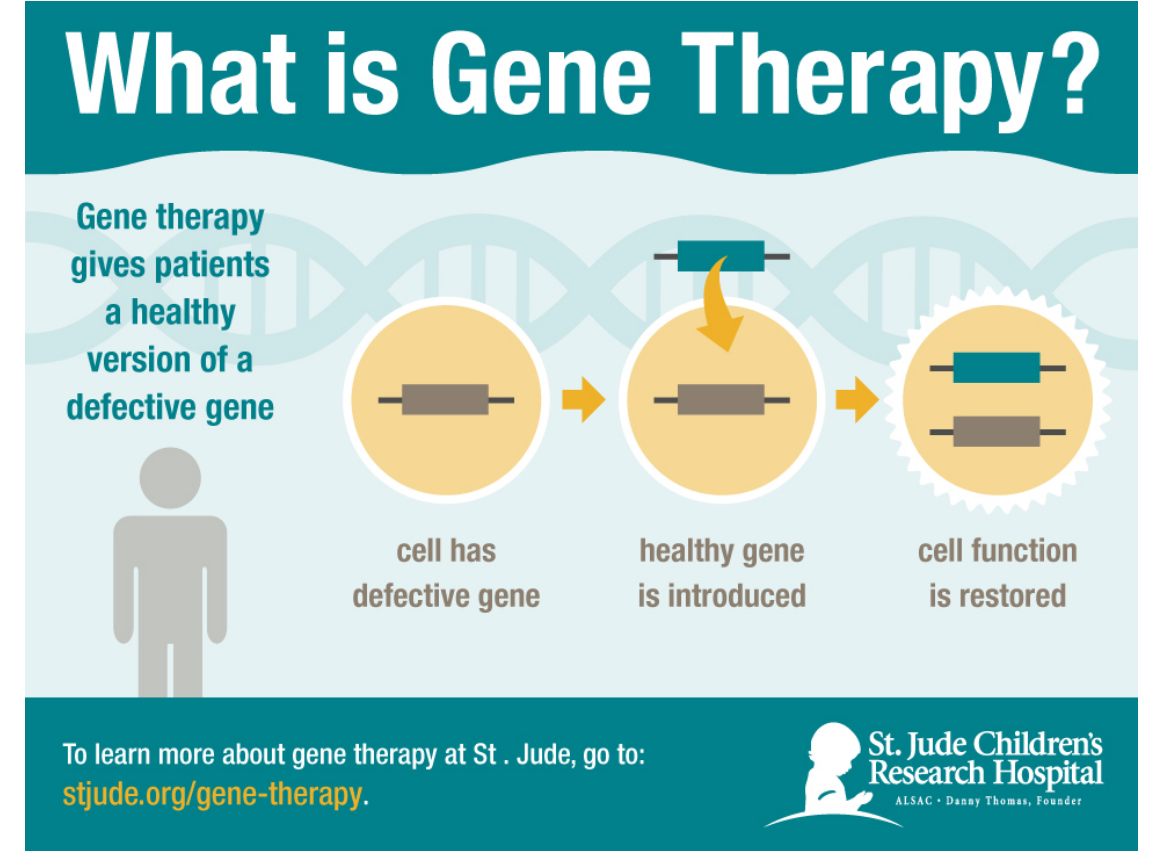
Hücre Kültür Teknikleri

9. Ders

Gen Terapi

Nedir?

- Gen tedavisi/terapisi/sağaltımı, genetik hastalıkların iyileştirilmesi amacıyla hastaya DNA aktarımı yapılmasıdır.
- Eksik ya da hatalı protein üretimine neden olan, bozuk gen taşıyan hücreye normal geni yerleştirme yöntemidir.



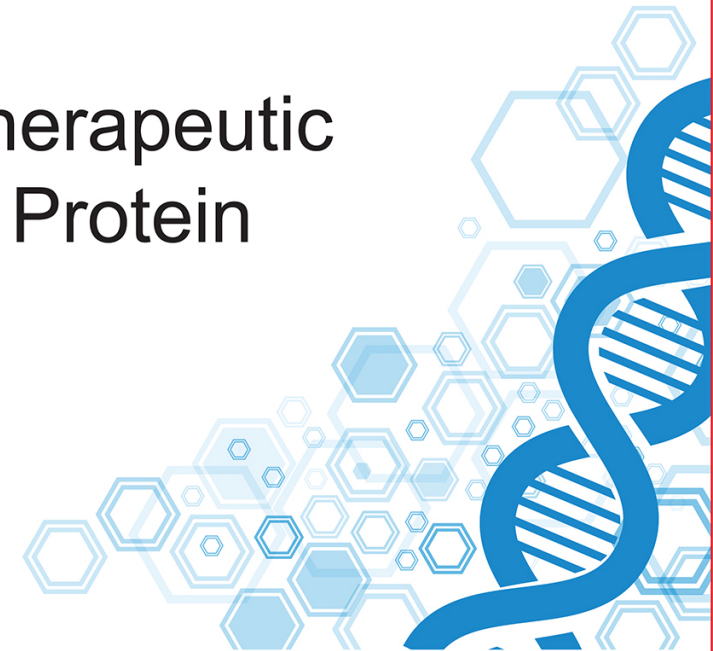
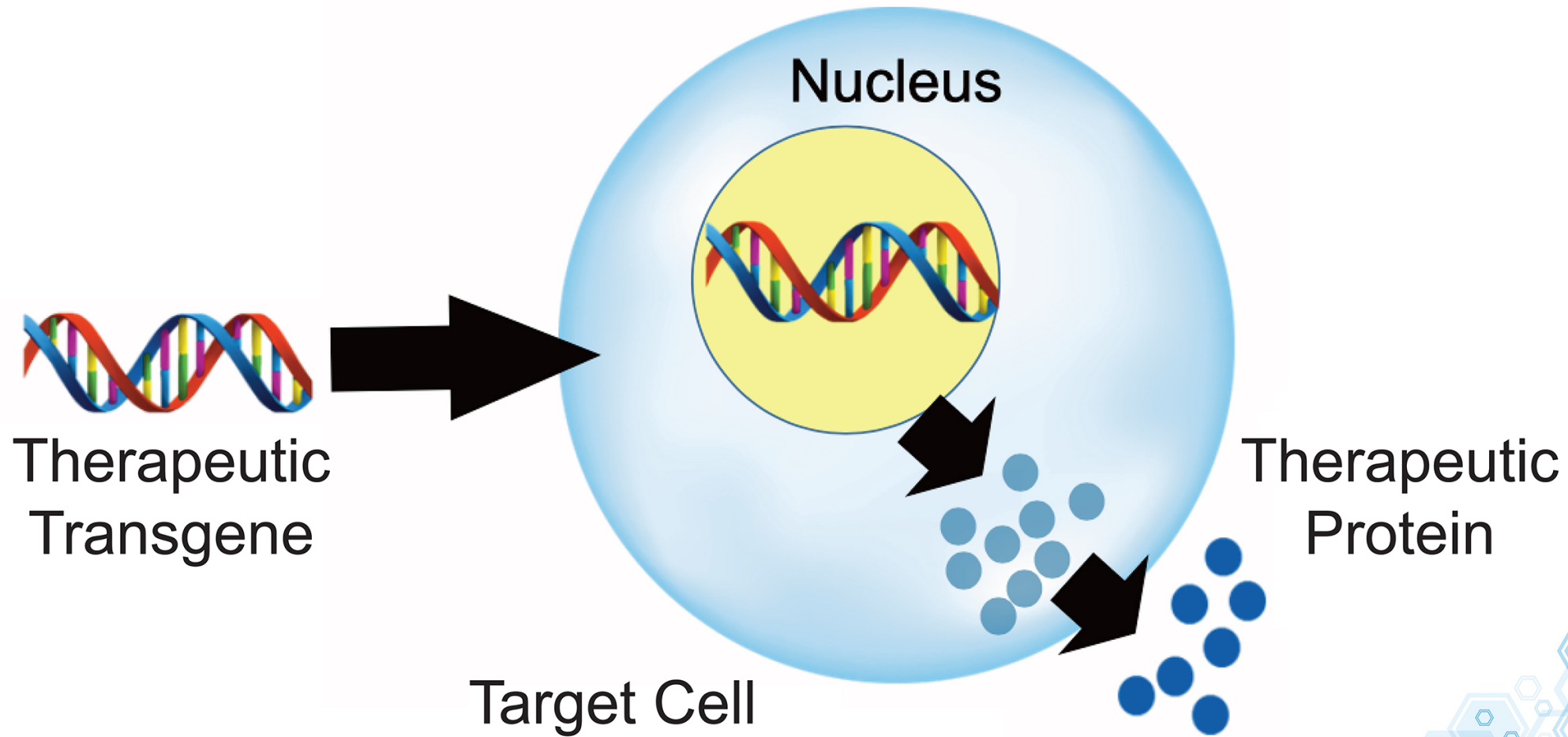
Gen tedavisinin amacı nedir?

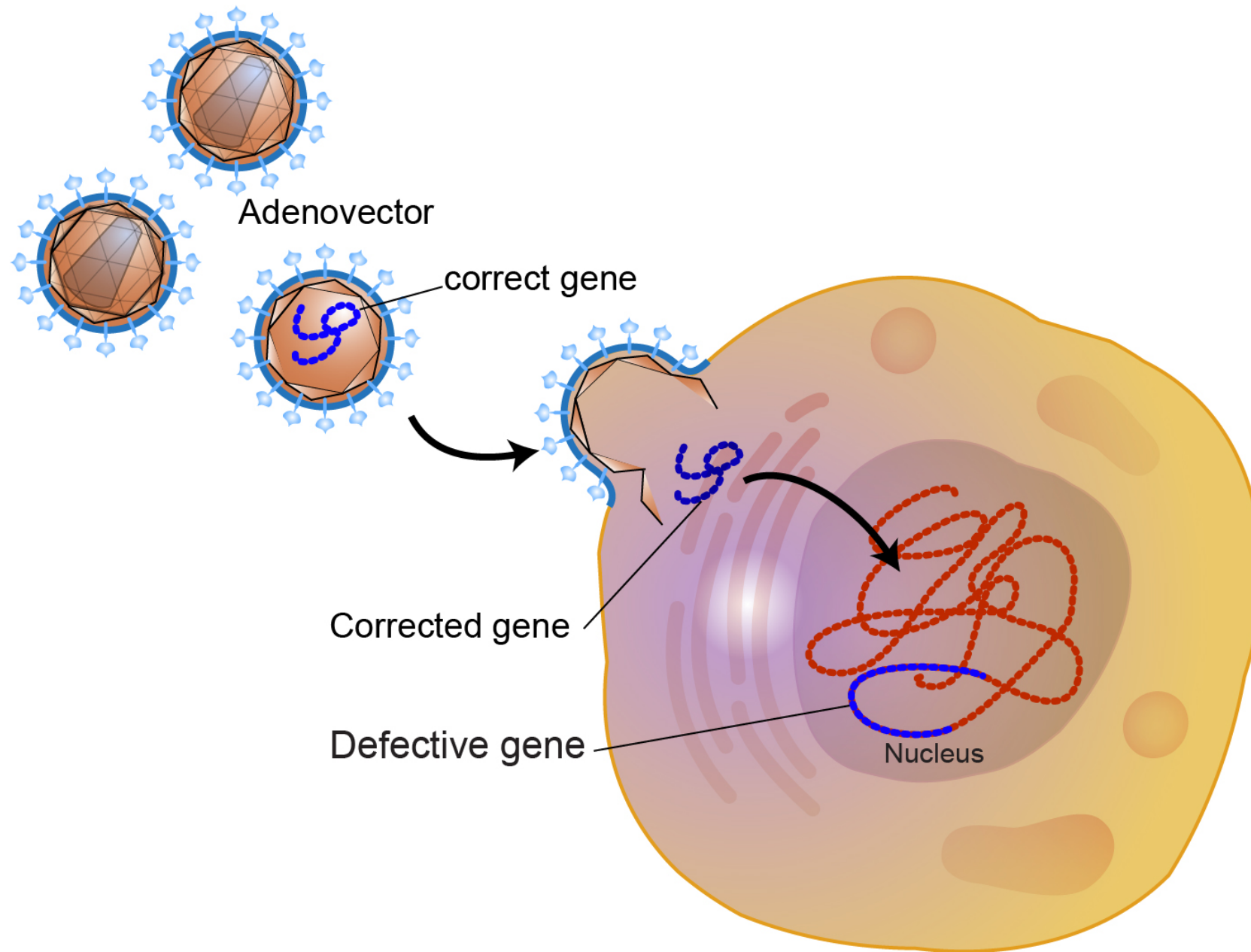
- Gen tedavisinin temel amacı, hedef hücrelere bir vektör aracılığı ile terapötik geni transfer etmektir.
- Hastalıkları nükleotid düzeyinde tedavi etmeyi amaçlar





The Principle of Gene Therapy





Gen Terapisi

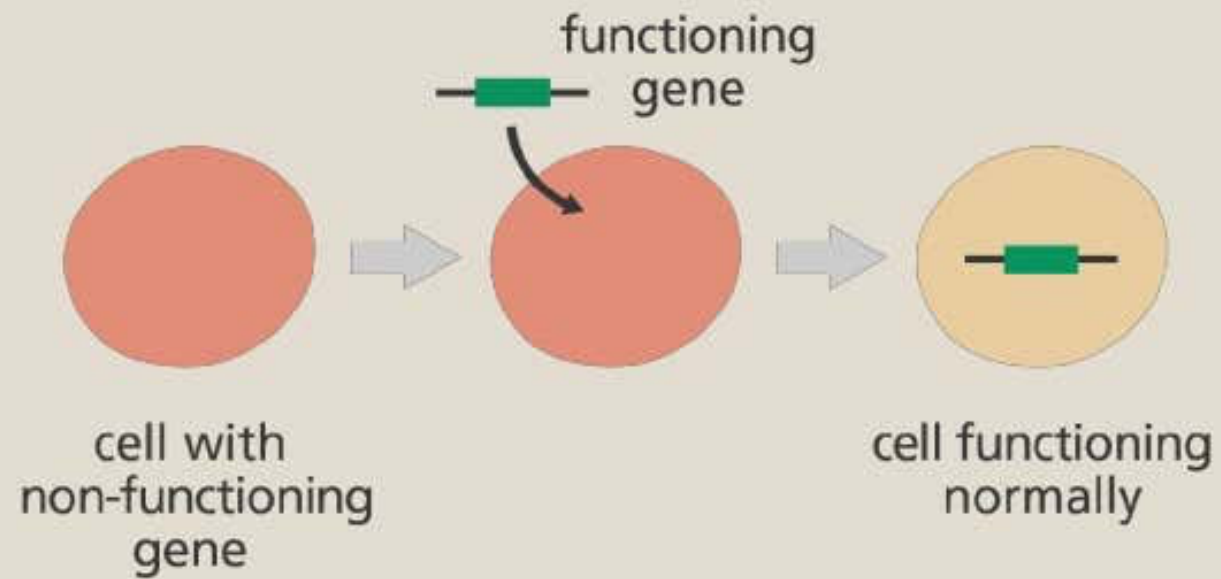
Gen terapisi ile hastalığın dıgerilmesi 4 şekilde gerekleſebilir:

- Gen ilavesi
- Gen deęiſimi
- Gen ekspresyonunun inhibisyonu
- Özgün hücrelerin öldürölmesi

Gen İlavesi

- **Gen ilavesinde bozuk genin işlevsel kopyasının verilmesi amaçlanır.** Hücrede mutant gen kalmakta ancak buna fonksiyonel gen ilave edilmektedir. Fonksiyon kaybına yol açan genetik hastalıkların düzeltilmesinde faydalıdır. Örneğin kistik fibrozis gen ilavesi için uygun bir hastalıktır.

Gene augmentation therapy

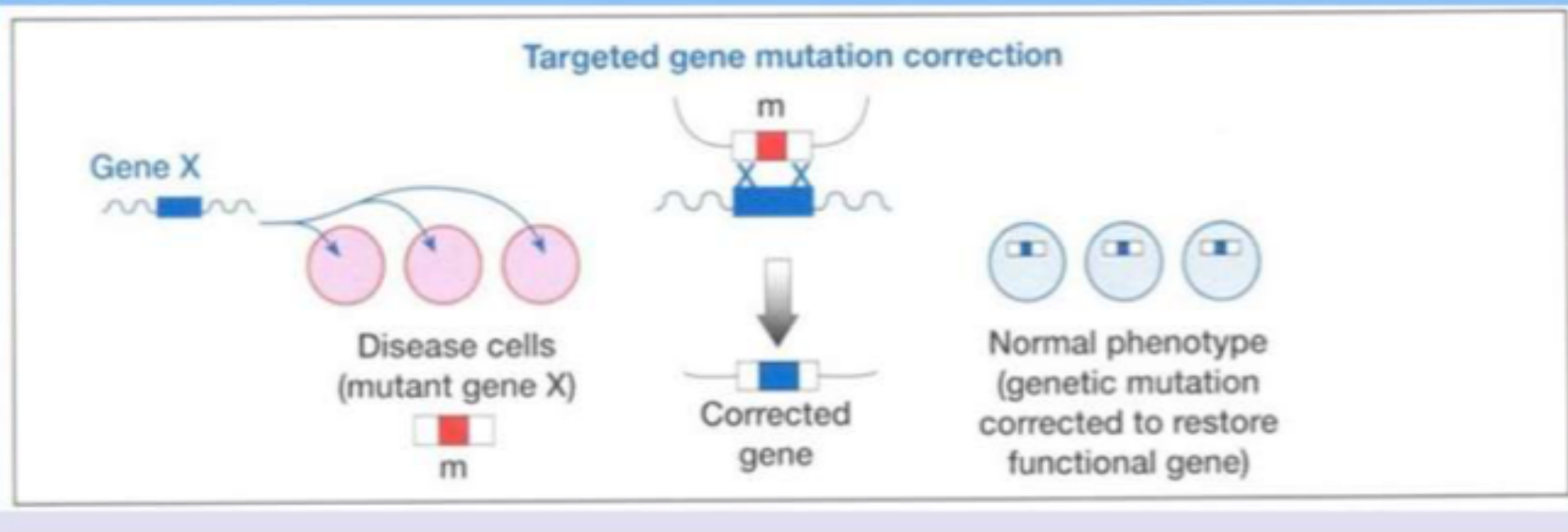


Gen Değişimi

- ***Gen değişimi*** ise çok daha zor ve karmaşıktır. Amaç, mutant geni fonksiyonel kopyası ile değiştirmek veya mutasyonu *in situ* düzeltmektir. Mutant gen ürününün hücreye zarar verdiği işlevin geri kazanımı sonucu düzelebilecek genetik hastalıklarda tercih edilecek bir yöntemdir.

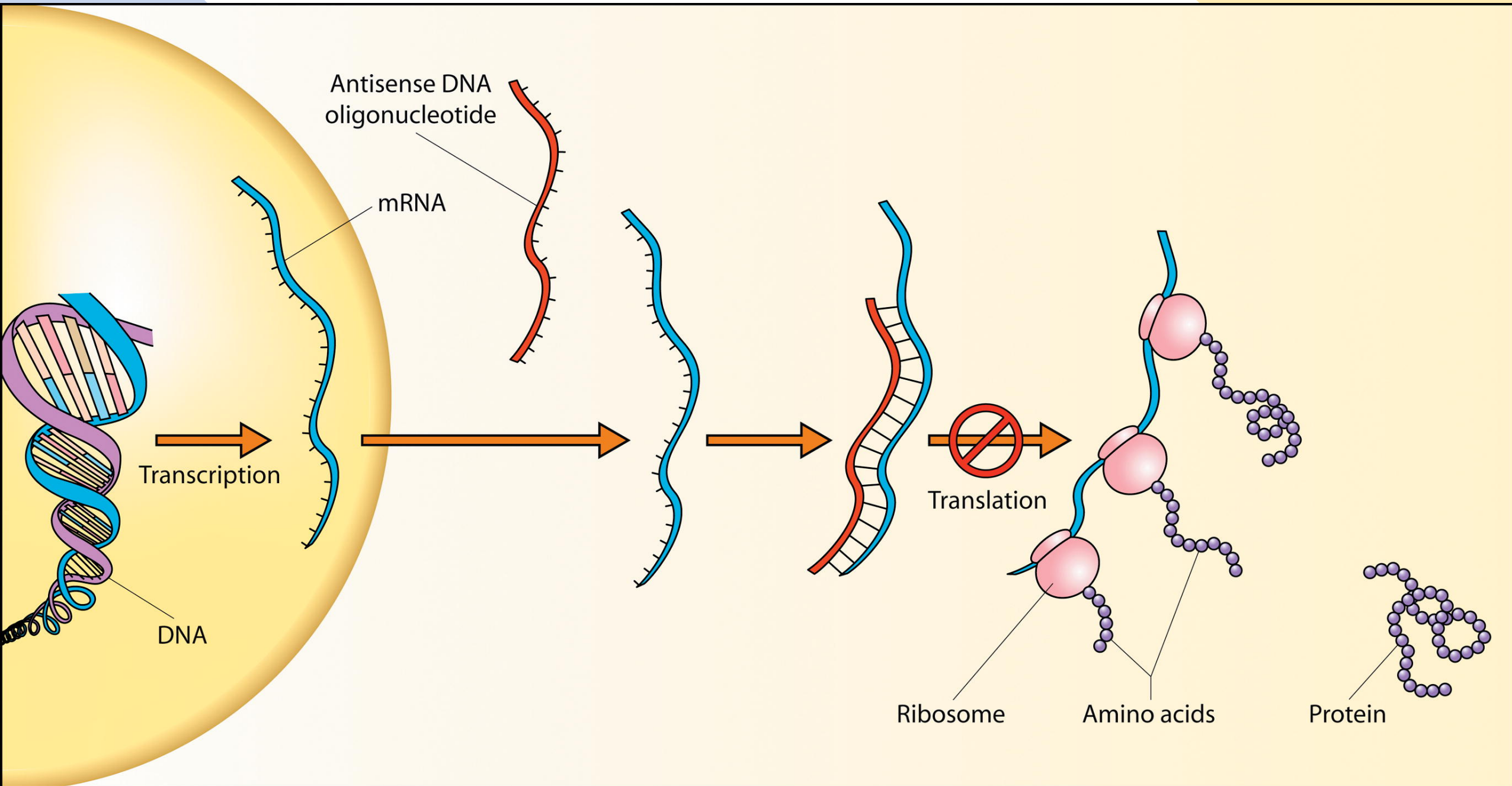
□ Gene replacement

Delivery of a gene whose function is absent due to **loss-of-function** mutations in the affected gene. This can be used in autosomal recessive diseases (RP or LCA) or in those that are autosomal dominant due to haploinsufficiency or dominant-negative mutations (RP).



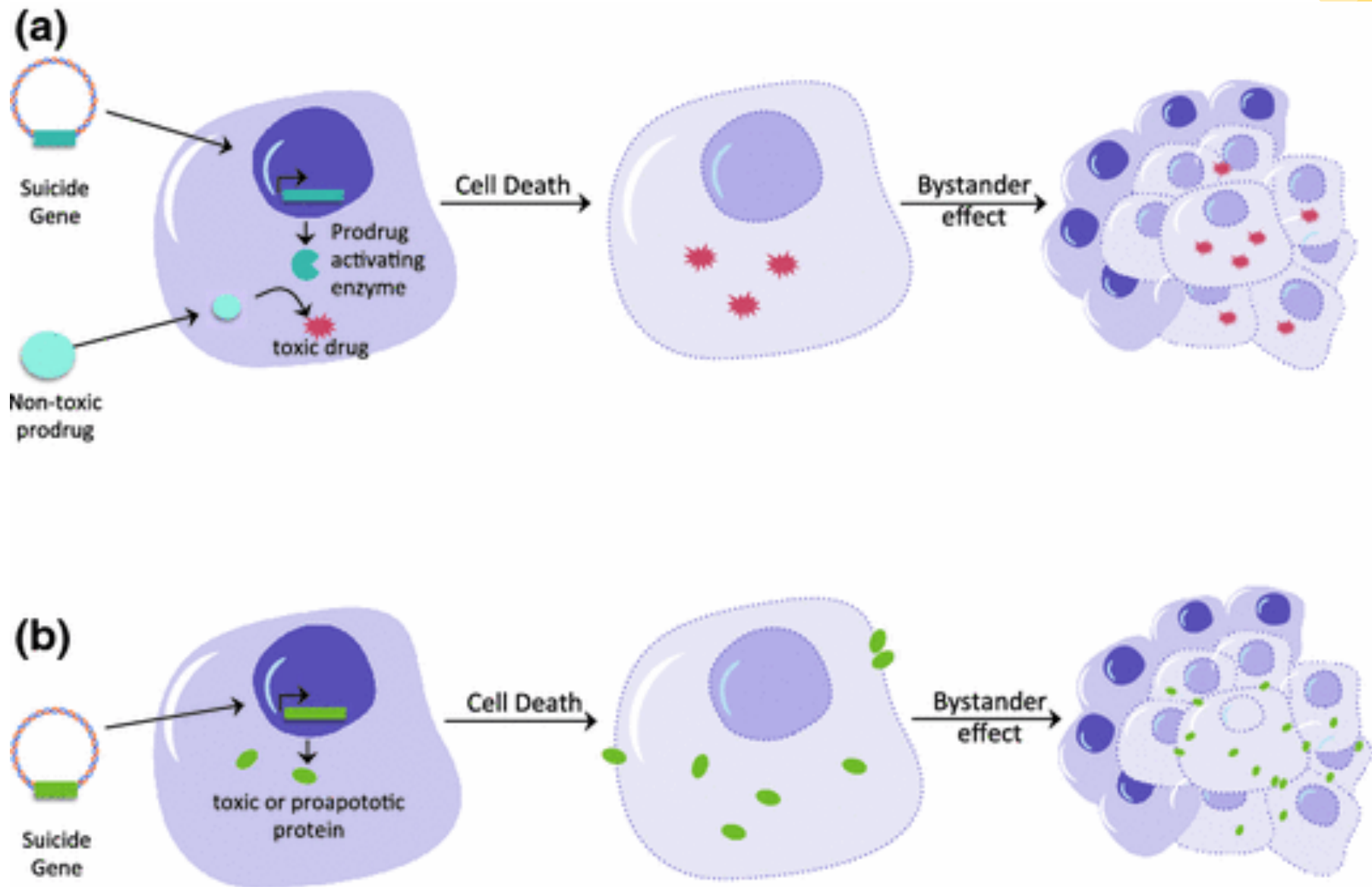
Gen İfadesinin Baskılanması

- ***Gen ifadesinin baskılanması*** özellikle enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde kullanılan bir yaklaşımdır. Bu yöntemde hedef patojenin fonksiyonunun baskılanması amaçlanır. Ayrıca bu yaklaşım kanserde aktif hale geçmiş onkogenlerin sessizleştirilmesinde, otoimmün hastalıklarda ve belki fonksiyon kazanımına bağlı genetik hastalıklarda kullanılabilir.

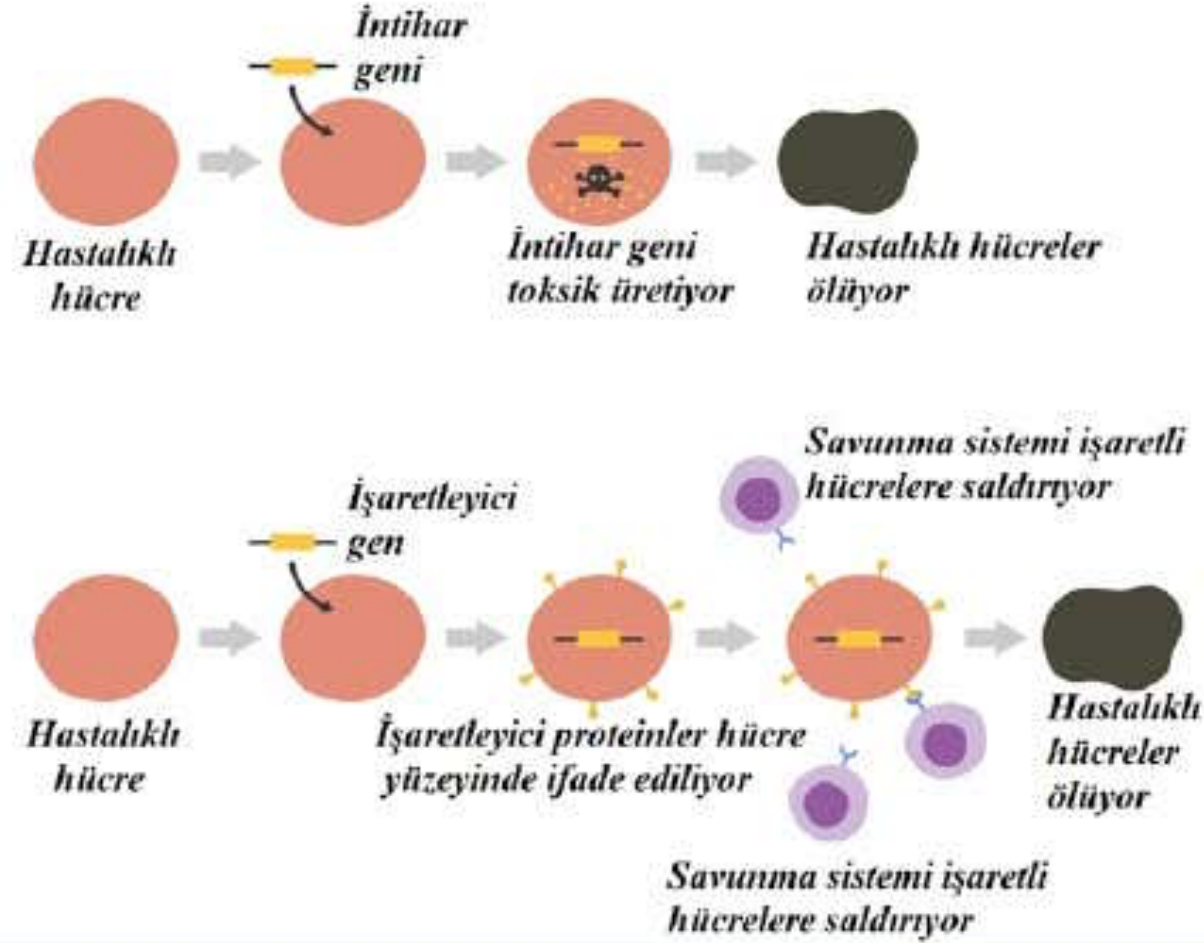


Spesifik hücrelerin öldürülmesi

- ***Spesifik hücrelerin öldürülmesi*** yöntemi ise özellikle kanser tedavisinde kullanılmaktadır. Bu amaçla toksik kemoterapötik ajan, toksik olmayan ön ilaç (prodrug) formunda vücuda verilirken, bu ön ilacı aktifleyen enzimi kodlayan gen de kanser hücrelerine aktarılmaktadır. Bu yaklaşıma ***intihar gen tedavisi*** denilmektedir.
- Uygulamada, aktif ön ilaç hedeflenmemiş komşu hücrelere de yayıldığından güçlü bir ilave (*bystander*) etki oluşturmaktadır.



Belirli Hücrelerin Öldürülmesi



Types of Gene Therapy

Target cell



- Germ line gene therapy
- *Somatic* gene therapy

Delivery method



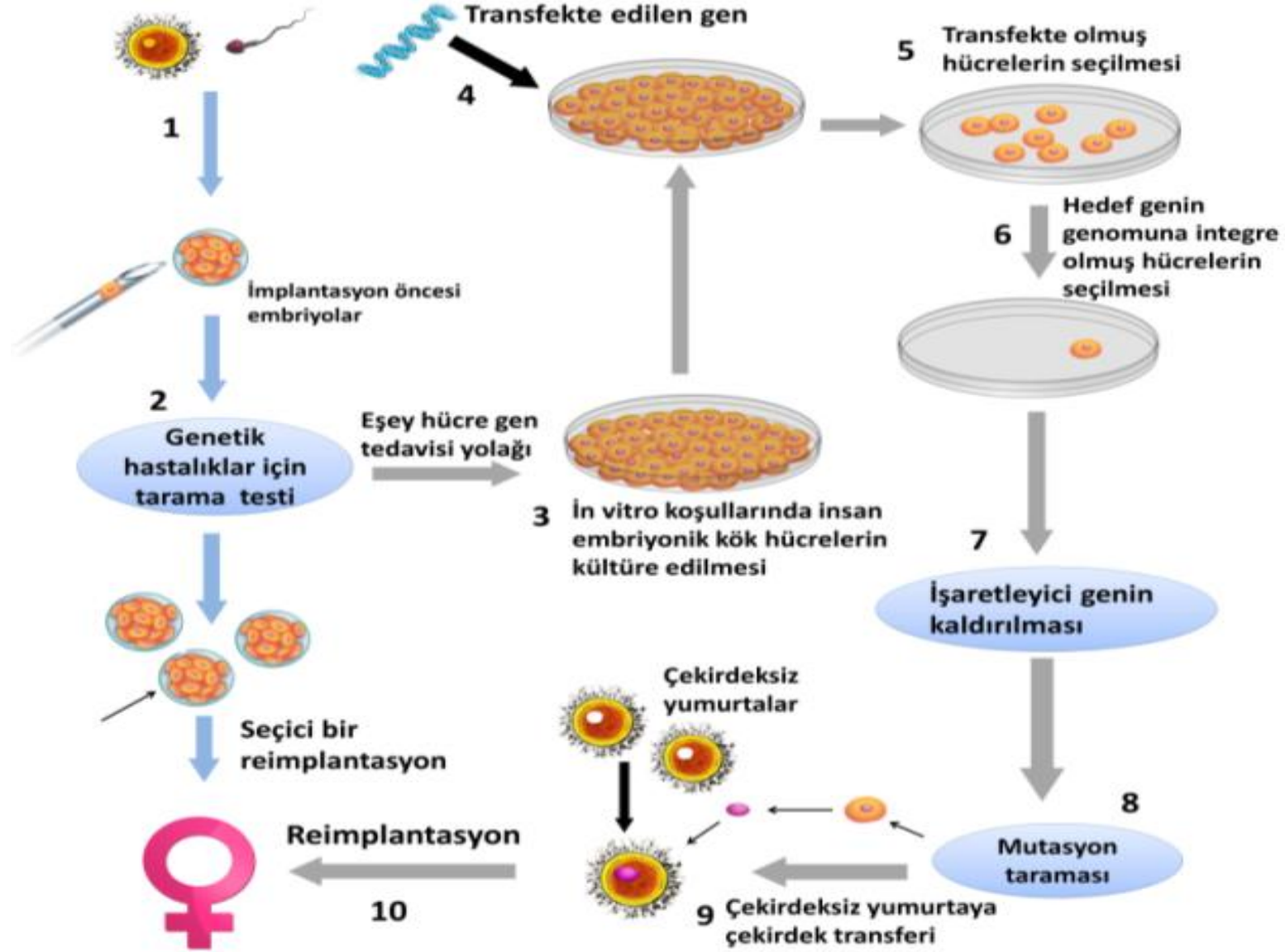
- *ex vivo* gene therapy
- *in vivo* gene therapy
- in situ*
- systematical*

Eşey Hücre Gen Tedavisi

- Germline gen terapisi; gametler (sperm ve yumurta) ve zigot üzerinde yapılan ve değişikliğin bir sonraki kuşaklara aktarıldığı gen tedavisidir. Germline gen terapisinin kullanımı etik sebeplerden dolayı Avrupa'da yasaklanmış olmasına rağmen; Amerika'da FDA tarafından bu alanda yapılan çalışmalara izin verilmektedir.

Eşey Hücre Gen Tedavisi

- Eşey hücre gen tedavisinin amacı tedavi edici geni hem vücut hem de eşey hücrelerine aktarmaktır. Sonuç olarak hem kişinin hastalığı ortadan kaldırılmış olacak hem de düzeltilmiş genotipe sahip gametler oluşturarak sağlıklı nesiller elde edilecektir. Eşey hücresi gen tedavisi yöntemi, vücudun tüm hücrelerini oluşturabilen erken dönem embriyo, gamet ve zigotta yapılan genetik değişikliklerle uygulandığı için bu değişiklikler gelecek nesillere aktarılabilir.

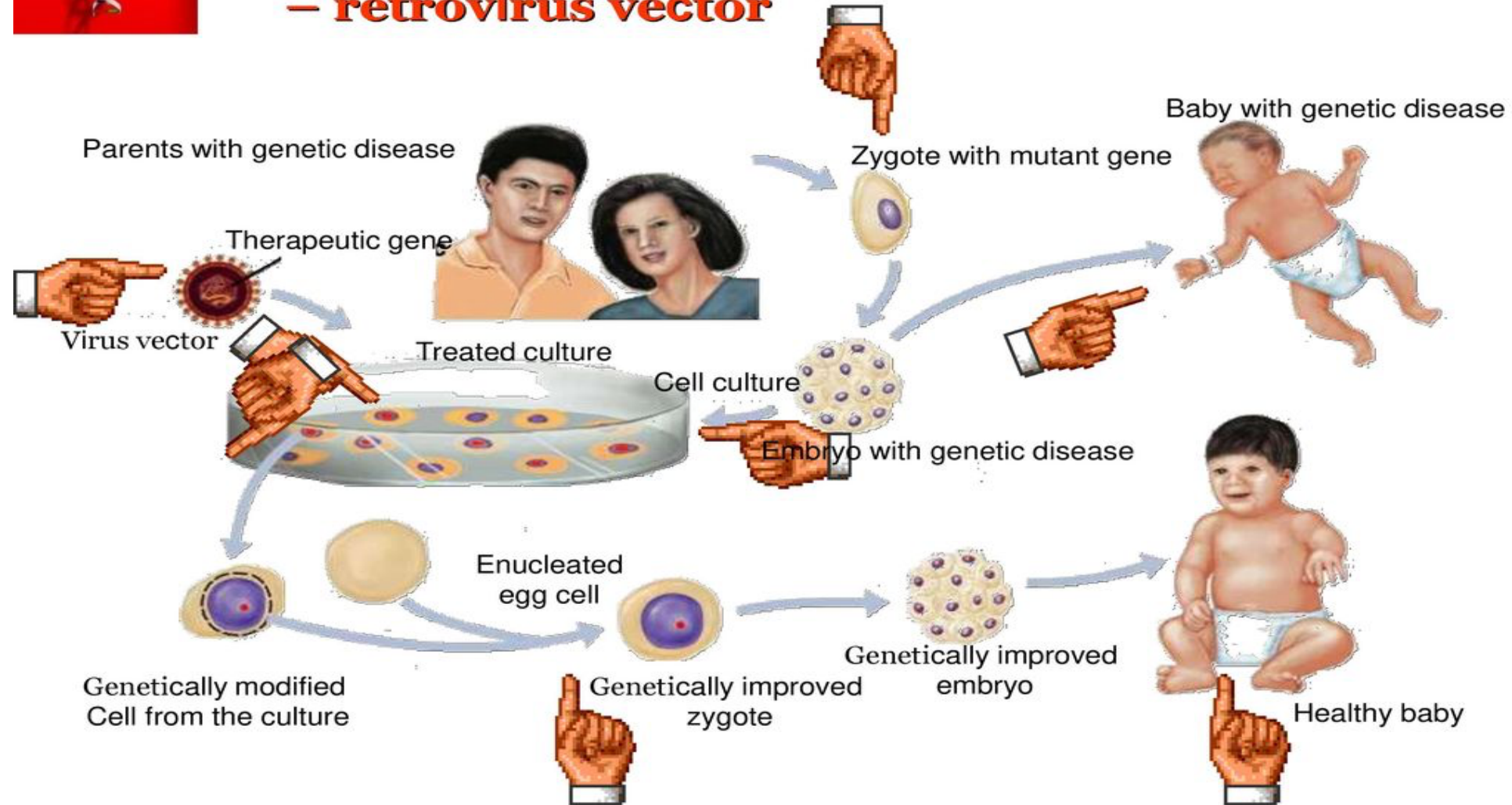




Germline gene therapy

– retrovirus vector

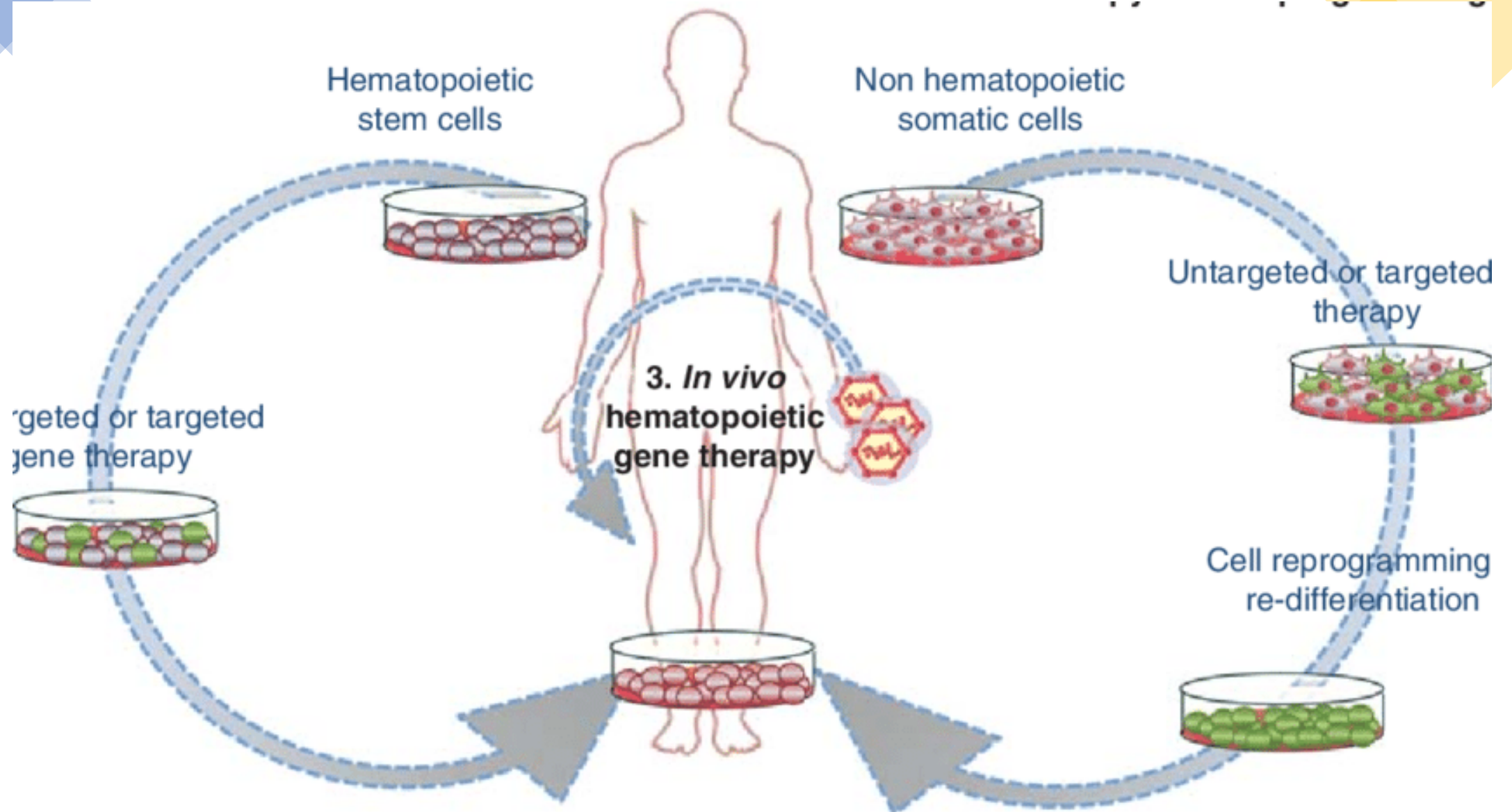
4



Somatik Hücre Gen Terapisi



- Somatik hücre gen tedavisi uygulamasında, tedavi edici gen somatik hücrelere transfer edilir. Hastanın kemik iliği, kan ve deri hücrelerine gen transferi, vücut hücresi gen tedavisi kategorisinde yer alır. Sonuçta genler düzeyinde yapılan değişiklikleri ve gen tedavisinin farklı etkileri sadece vücut hücreleri düzeyinde kalır; eşey hücrelerine ve ardından gelecek nesillere aktarılmaz



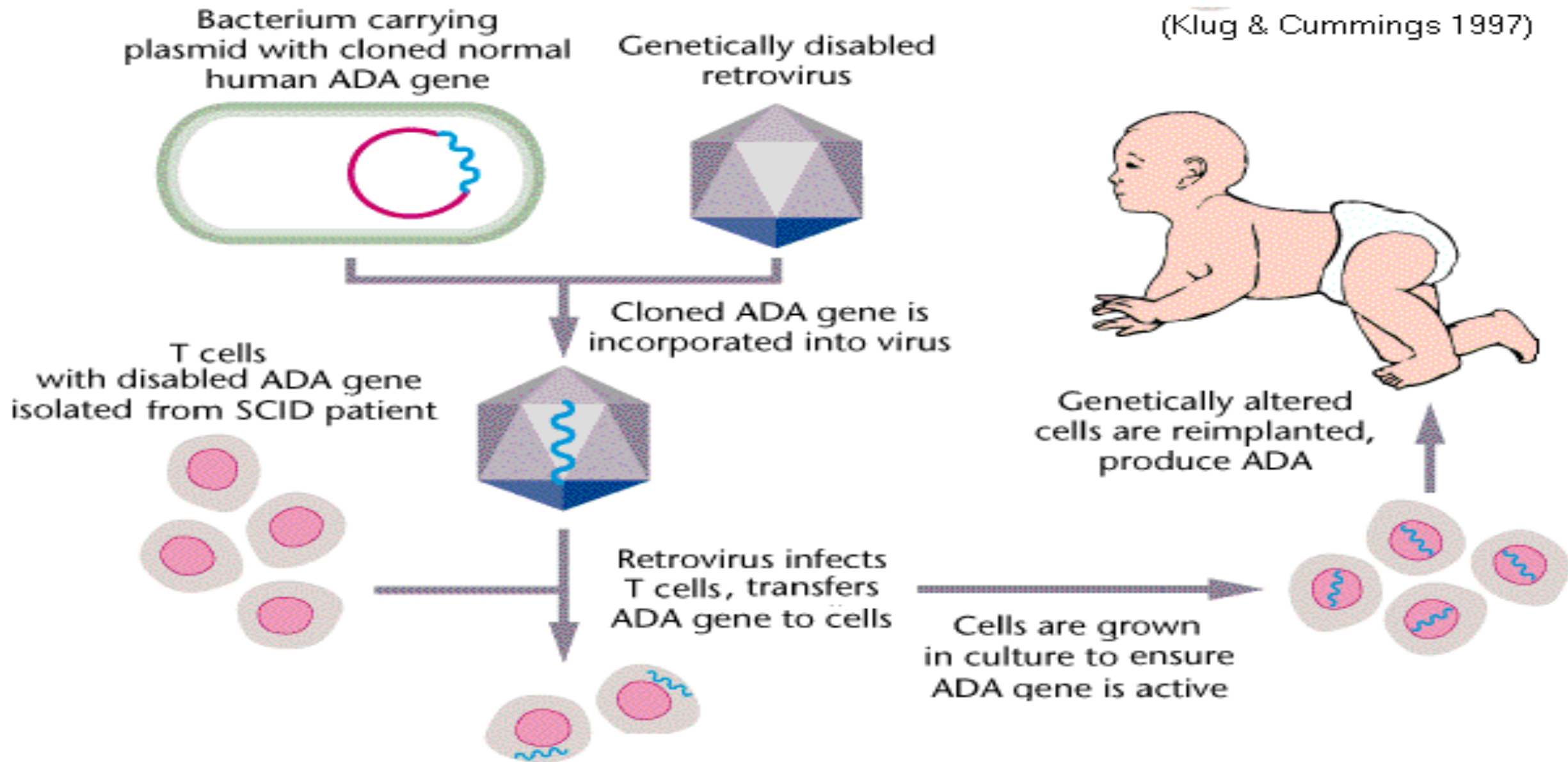
TYPES OF GENE THERAPY

SOMATIC CELL GENE THERAPY	GERM LINE GENE THERAPY
▪ Therapeutic genes transferred into the somatic cells. ▪ Eg. Introduction of genes into bone marrow cells, blood cells, skin cells etc. ▪ Will not be inherited later generations. ▪ At present all researches directed to correct genetic defects in somatic cells.	▪ Therapeutic genes transferred into the germ cells. ▪ Eg. Genes introduced into eggs and sperms. ▪ It is heritable and passed on to later generations. ▪ For safety, ethical and technical reasons, it is not being attempted at present.

Ex Vivo Gen Terapi

- Hastadan alınan hücreler doku kültürlerinde üretilip rekombinant genlerden oluşan bir vektör ile transdüksiyon yapıldıktan sonra hastaya geri verilir. Bu transfer edilen DNA dizisi hedef hücrelerinin kromozomundaki DNA'ya stabil olarak bağlanır.

(Klug & Cummings 1997)



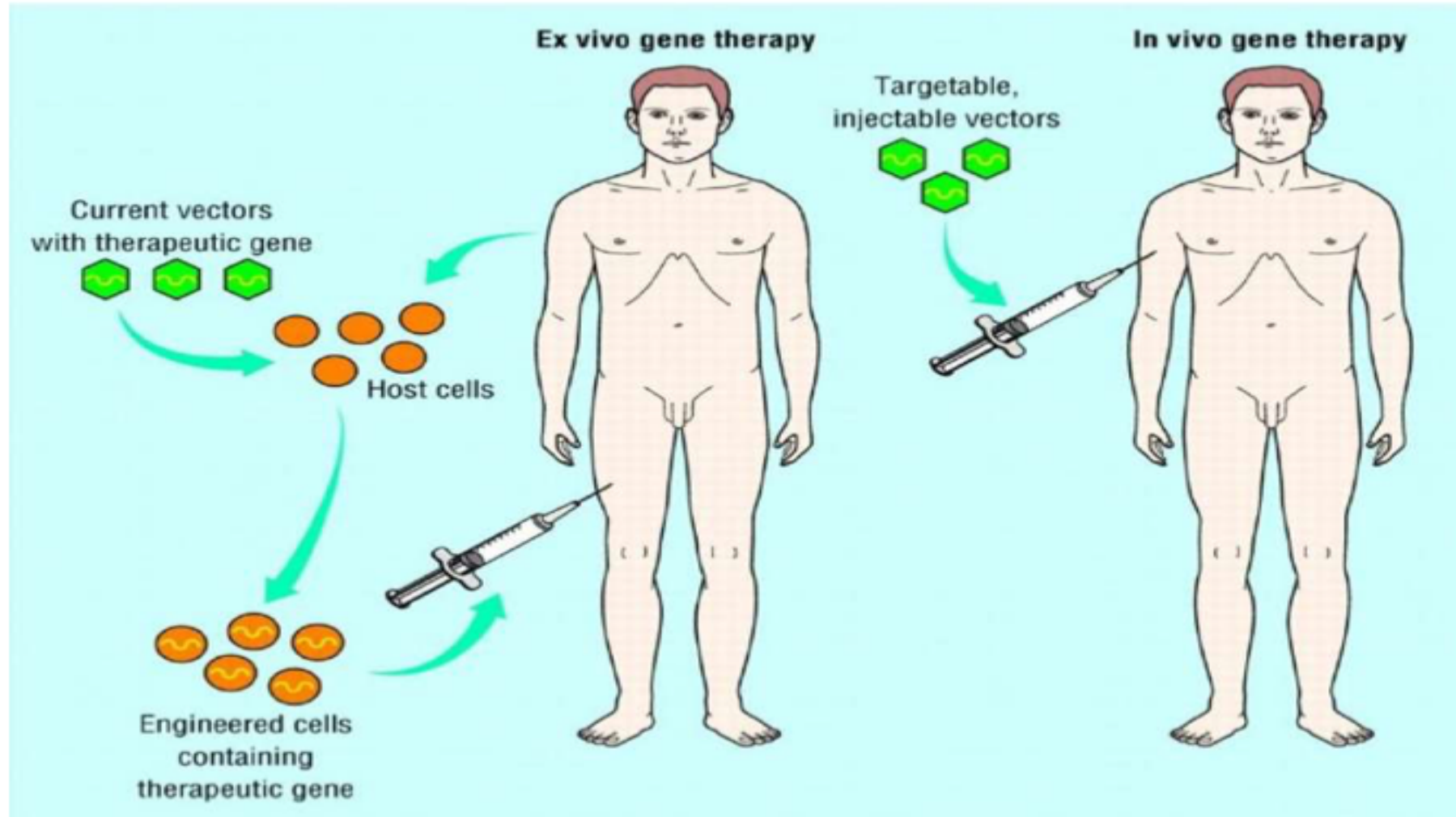


In Vivo Gen Terapi

- ***In vivo gen tedavisi*** ise, alıcı hücrelerin in vitro kültürünün yetersiz olduğu (ör. beyin hücreleri) veya kültürü yapılan hücrelerin hastaya re-implantının etkili bir şekilde yapılamadığı durumlarda tek seçenektir. Doku hedeflemesi bu yöntemde önemli bir sorundur.

In Vivo Gen Terapi

- Transfer edilen gen doğrudan hedef dokuya veya genel dolaşıma verilebilir ancak aktarım için kullanılan vektör sadece hedeflenen hücreler tarafından alınacak şekilde veya sadece hedeflenen hücrelerde gen ifadesi olacak şekilde tasarlanmış olmalıdır.
- Bu yöntemde geni almış veya ifade eden hücreleri çoğaltma ve seçme imkanı olmadığından *in vivo* gen tedavisinin başarısı gen aktarımı ve ifadesinin (ekspresyonunun) etkinliğine bağlıdır.



EX VIVO GENE THERAPY

Isolate cells with genetic defect from a patient



Grow the cells in culture



Introduce the therapeutic genes .



Select genetically corrected cells and grow.



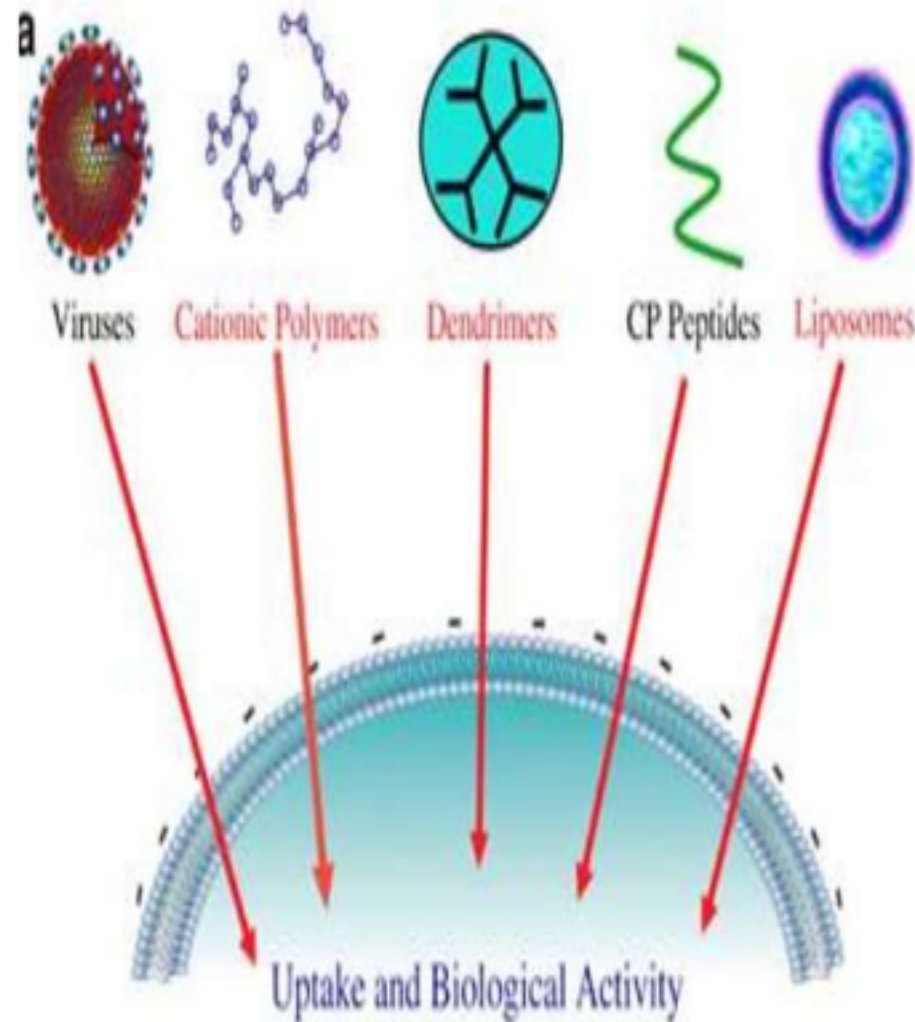
Transplant the modified cells to the patient.

Vektörler

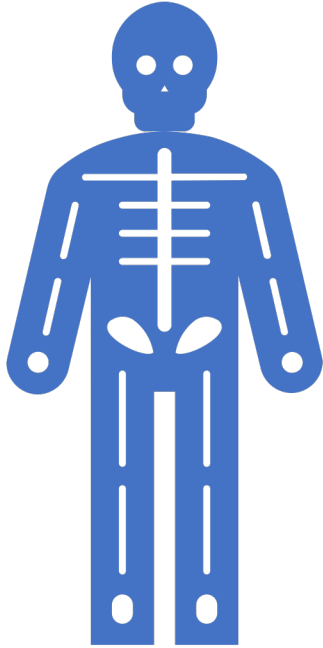
- Hedef hücrelere tedavi edici geni sunmak için kullanılan taşıyıcılara vektör denmektedir. Gen tedavisi başarısı büyük ölçüde gen parçasını aktarabilen vektöre bağlıdır. Uygun bir vektör, DNA parçasını seçimli ve verimli bir şekilde, en az toksisite ile hedef hücrelere sunabilmelidir.

VECTORS IN GENE THERAPY

- To transfer the desired gene into a target cell, a carrier is required. Such vehicles of gene delivery are known as **vectors**.
- 2 main classes
 - **Viral** vectors
 - **Non viral** vectors



Vektörler



- Hücre çekirdeğine ulaşıncaya kadar genlerin hem hücre dışında hem de hücre içinde degradasyonu önemli sorunlardandır
- Dolayısıyla tedavinin başarısı, esas olarak terapötik genin herhangi bir biyodegradasyon olmadan hedeflenen hücreye girişine bağlıdır.
- Bununla birlikte DNA 'nın biyolojik ortamdaki nükleaz duyarlılığı, polianyonik hidrofil ve oldukça büyük makromolekül yapısı hücre zarından pasif bir şekilde geçişini sınırlandırır

İdeal Vektörün Özellikleri

- DNA parçalarını aktarabilmesi için yeterli kapasiteye sahip olmalı,
- Kolaylıkla yüksek konsantrasyona ulaşabilmeli,
- Hedef dokuya spesifik olmalı,
- Stabil olmalı,
- İmmun yanıt oluşturmamalı, toksik olmamalı,
- Etkinliği yüksek olmalı,
- Uzun süreli gen ifadesi sağlamalı.

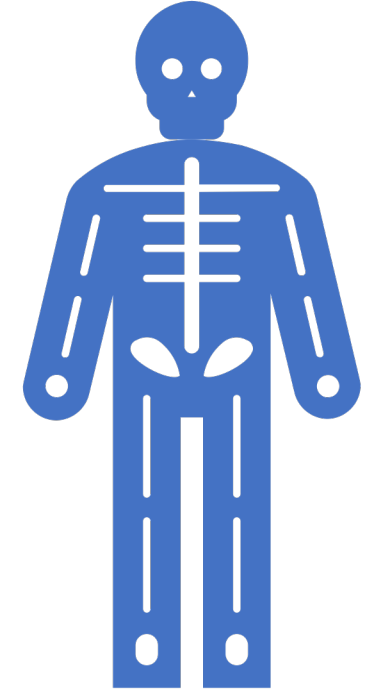


İdeal Vektörün Özellikleri

- 1- Vasküler endotelial hücreler ve kan bileşenleri ile etkileşim içinde olmamalı,
- 2- Retikuloendotelial sistemden (RES) kaçabilme yeteneğine sahip olmalı, güçlü bir immün yanıt oluşturmamalı,
- 3- Hücre zarından geçip hedef bölgeye ulaşabilecek kadar küçük olmalı,
- 4- Hazırlanması kolay ve büyük miktarlarda ticari olarak üretimleri ucuz olmalıdır.

Vektörler

- Şu ana kadar, bu özelliklerin tümüne sahip olan mükemmel bir vektör bulunamamıştır.
- Hasta doku özellikleri ve bozuk genin büyüklüğüne göre her hastalık için özel bir vektör tasarlamak gerekir.
- Çünkü her vektör, belli ölçülerde, dışardan verilen DNA parçasını taşıyabilir. Genlerin büyüklüğü de vektör seçimi için önemlidir.





Viral Vektörler

- Terapötik genleri taşıyan non-patojenik hale getirilmiş virüslere viral vektörler denir.
- Vektör olarak kullanılan virüslerin genlerinin hastalık yapıcı kısımları genetik mühendisliği uygulamalarından yararlanılarak uzaklaştırılır ve bu genlerin yerini terapötik genler alır
- Taşıyıcı olarak en çok kullanılan virüsler; adeno virüsler, retro virüsler, adeno-ilişkili virüsler, herpes virüsüdür

Retrovirüs Aracılı Gen Terapisi



Retrovirüs aracılı gen terapisi için iki virüs yapısının kullanılması gerekir.



1. Bunlardan biri tedavi edici vektördür ve klonlanmış sağlam geni ve paketleme sinyalini taşır;



2. diğeri ise uzun terminal tekrarları (LTRs) ile çevrelenmiş retrovirüsün üç yapısal genini taşıyan virüs RNA'sıdır ve paketleme sinyali içermez.

Retrovirüs Aracılı Gen Terapisi

- Yapısal vektör kapsid proteinlerinin üretilmesi ve virüsün montajı için gereklidir; gag, pol ve env genlerini taşır. (GAG: matriks proteini, POL: revers transkriptaz enzimi, ENV: envelope proteinini kodlar).
- Vektör, paketlenme sinyali içermediği için üretilen virüs partiküllere giremez ve hastayı enfekte edemez.

Retrovirüs Aracılı Gen Terapisi

- Her iki virüs yapısı aynı anda mevcut olduğunda, klonlanmış geni içeren tedavi edici vektör, kapsit içine paketlenir.
- Tedavi edici vektörün kapsit içine paketlenmesi, uygun bir hücre kültürü kullanılarak gerçekleştirir; bu hücre hattına “paketleme hücre hattı” denir.
- Gag, env ve pol genlerinin delesyonu vektör replikasyonunu defektli hale getirir ve bu yüzden paketleme hücre hattı kullanılır

A) TYPICAL RETROVIRUS GENOME



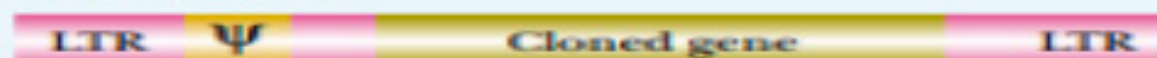
B) RETROVIRUS VECTOR SYSTEM

Packaging construct



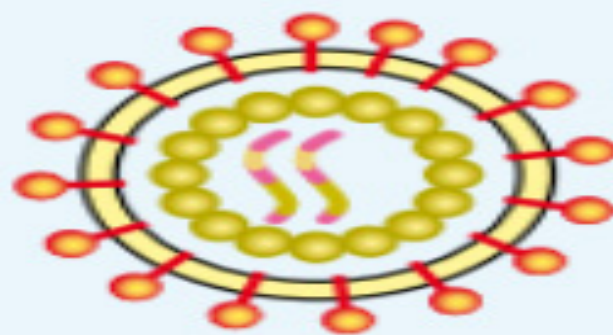
↓
Needed for assembly
but NOT packaged

Vector genome



↓
Packaged inside particle

Retroviral
vector
particle



↓
Infect patient

A) Retrovirüs genomunun yapısı



B) Retrovirüs vektörün üretilmesi için gereken DNA parçaları

1- Yapısal vektör



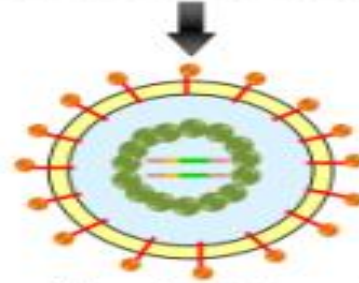
2- Terapötik vektör



Yapısal ve terapötik vektör aynı anda bir memeli hücre hatına verilecektir



Paketleme hücre hattı



Terapötik retrovirüs partikülleri

Hastaya nakil edilmesi

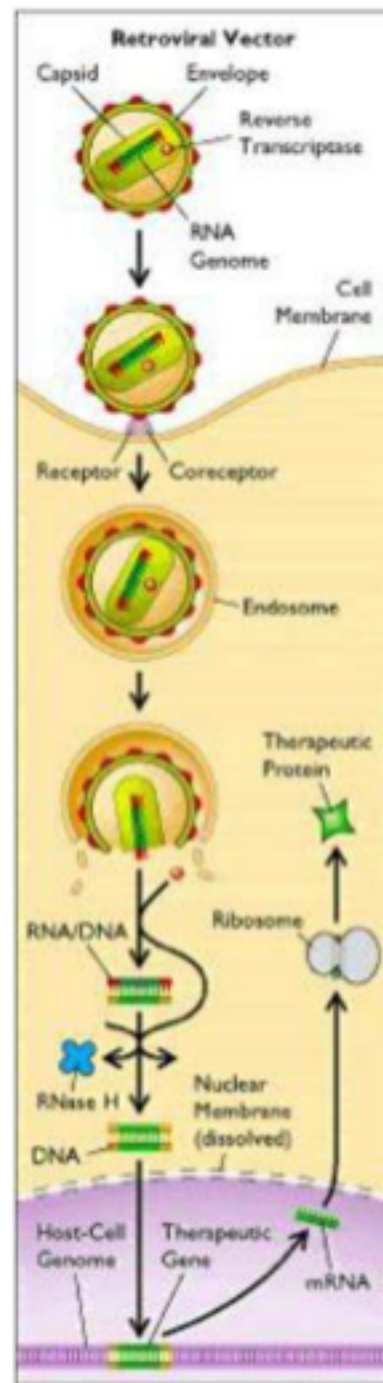


Tablo-1. En Sık Kullanılan Viral Vektörler ve Özellikleri (24).

Aile	Adenovirüs	AAV	Retrovirüs / Lentivirüs	Herpesvirüs
	Adenoviride	Parvoviride	Retroviride	Herpesviride
Genom	dsDNA	ssDNA	ssRNA ⁺	dsDNA
Enfeksiyon / tropizm	Bölünen ve bölünmeyen hücreler	Bölünen ve bölünmeyen hücreler	Bölünen hücreler	Bölünen ve bölünmeyen hücreler
Konakçı genomu ile etkileşimi	Entegre olmaz	Entegre olmaz	Entegre olur	Entegre olmaz
Transgen ifadesi	Geçici	Potansiyel uzun ömürlü	Uzun ömürlü	Potansiyel uzun ömürlü
Paketleme kapasitesi	7.5 kb	4.5 kb	8 kb	>30 kb

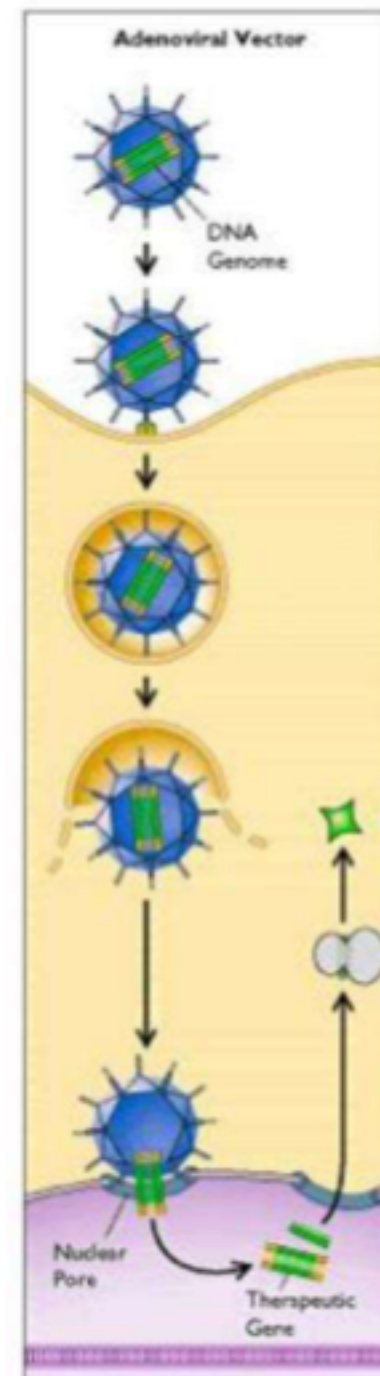
AAV: Adeno-assosiyé virüs, +: Pozitif iplikçikteki RNA, dsDNA: Çift zincirli DNA, ssDNA: Tek zincirli DNA

Retrovirus RNA



Integration to
the genome

Adenovirus DNA



No integration
to the genome

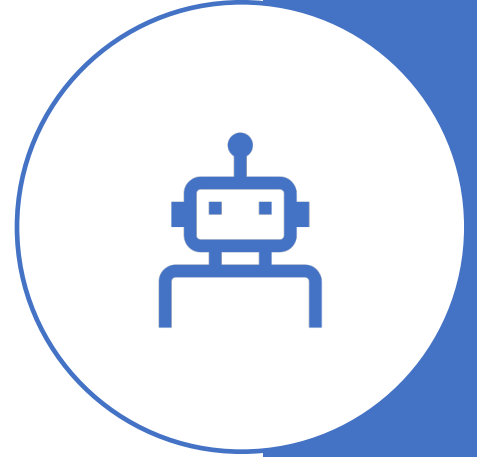
Viral Vektörlerin Dezavantajları

- Retrovirüs bölünmeyen hücreleri enfekte edemez, Adenovirüs immünolojik yanıt gösterir, herpesvirüsün sitotoksik etkisi vardır ve adeno-assosiye virüs kısıtlı yabancı genetik materyal taşıyabilme kapasitesine sahiptir.
- Tüm virüslerin ortak dezavantajı genin **yanlış bir yere yerleşme tehlikesidir.**



Viral Vektörlerin Dezavantajları

- 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



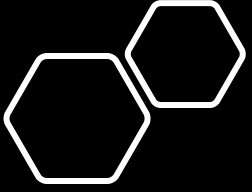
Non-Viral Vektörler



- Non-viral vektörler nispeten güvenli,
- düşük immün cevap oluşturan,
- hazırlaması kolay,
- düşük maliyetli ve
- büyük miktarlarda üretimi mümkün olan taşıyıcılardır.

Non-Viral Vektörler

- Ayrıca farklı ve büyük genlerin taşınmasını gerçekleştirebilirken, stabilitelerinden dolayı uzun süre depolanabilirler. Fakat düşük transfeksiyon verimine sahip olmaları geniş bir yelpazede kullanımlarını sınırlamaktadır



Non-Viral Vektörler

1. Taşıyıcı Sisteme İhtiyaç
Duymayan Uygulamalar
2. Taşıyıcı Sistemler

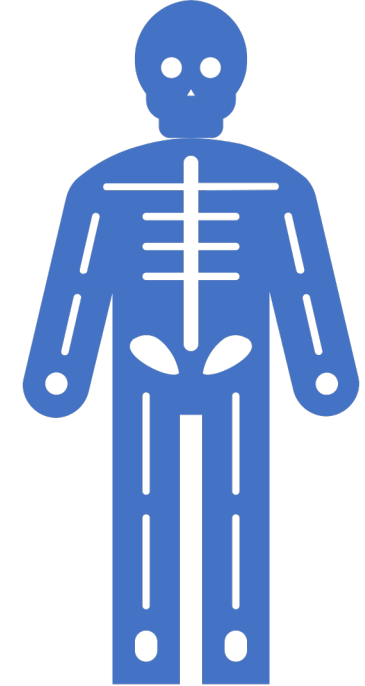


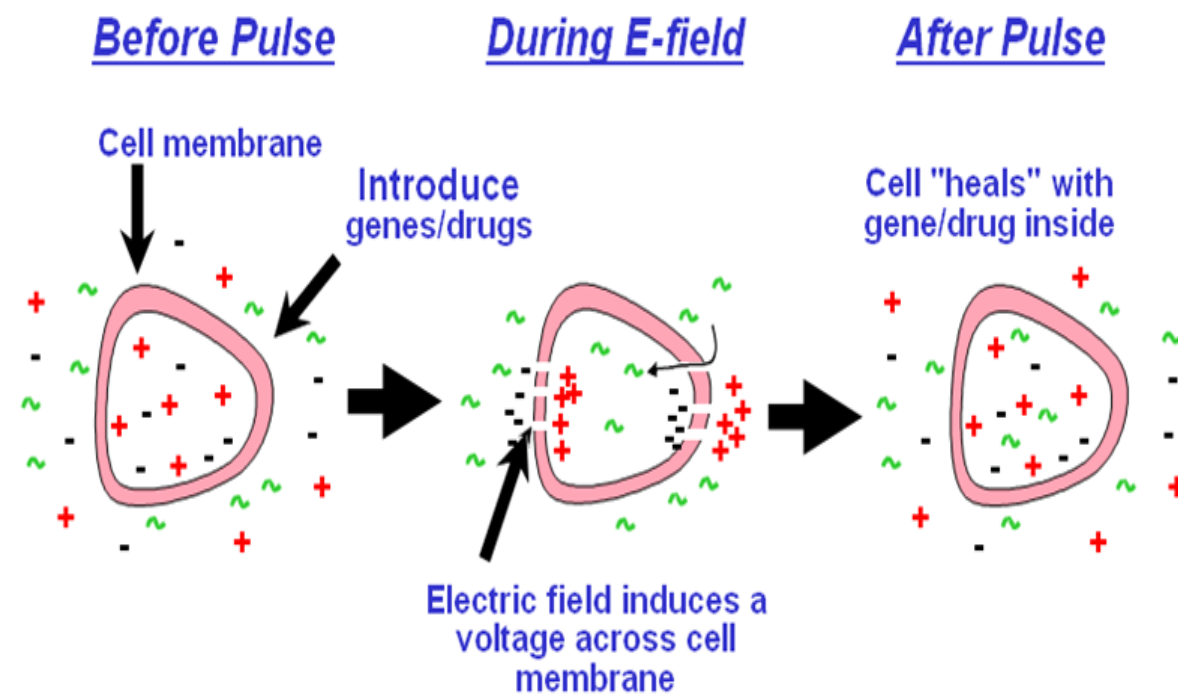
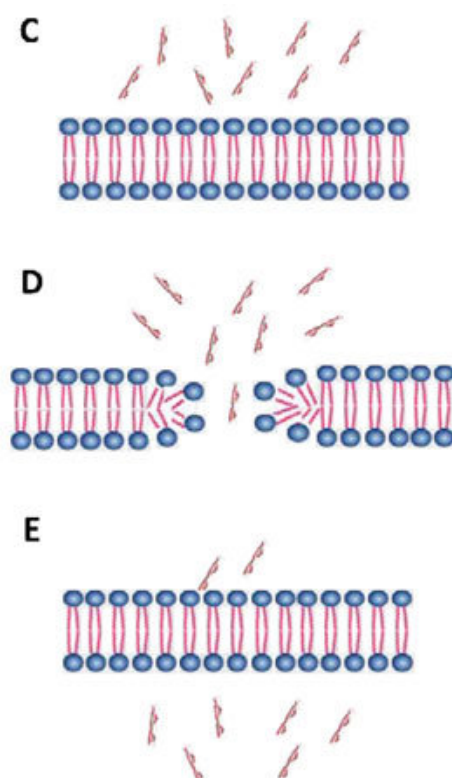
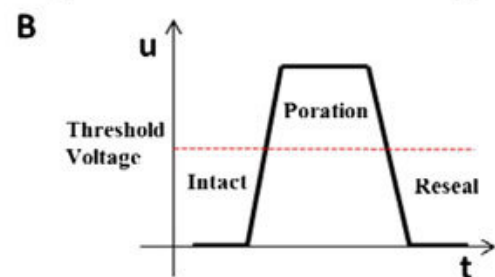
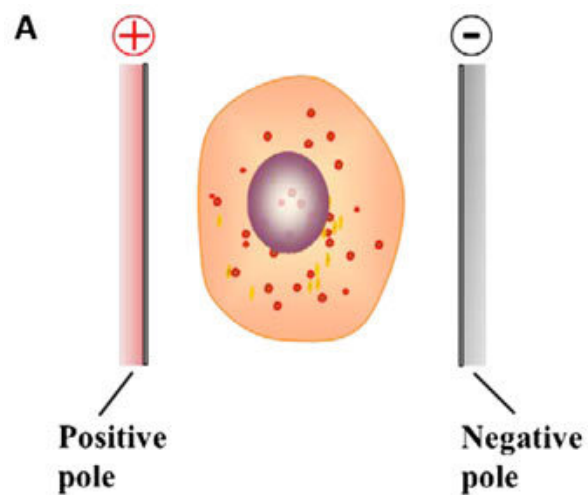
Non-Viral Yöntemler

- Herhangi bir taşıyıcı sisteme ihtiyaç duymadan hücre zarını daha geçirgen hale getirmek için fiziksel kuvvetlerin kullanıldığı ilk grupta hücre zarını geçici olarak zayıflatmak için mekanik, ultrasonik, elektrikli, hidrodinamik ya da lazer tabanlı sistemlerden yararlanır.
- Hücre zarındaki bu geçici değişim taşıyan DNA'nın hedef hücreye girişini sağlar

Elektroporasyon

- Elektroporasyon yönteminde; hücre zarının geçirgenliğini kontrollü bir elektrik alan uygulayarak arttırmanın sonucunda aktarılabacak olan DNA'nın hücre içine geçişi sağlanır.
- Başarılı bir şekilde çeşitli dokularda kullanılmıştır (Deri, kas, karaciğer ve tümör vb.).
- Güvenli, verimli ve tekrarlanabilir bir yöntem olmasına rağmen in-vivo uygulamalarda kısıtlamalara sahiptir





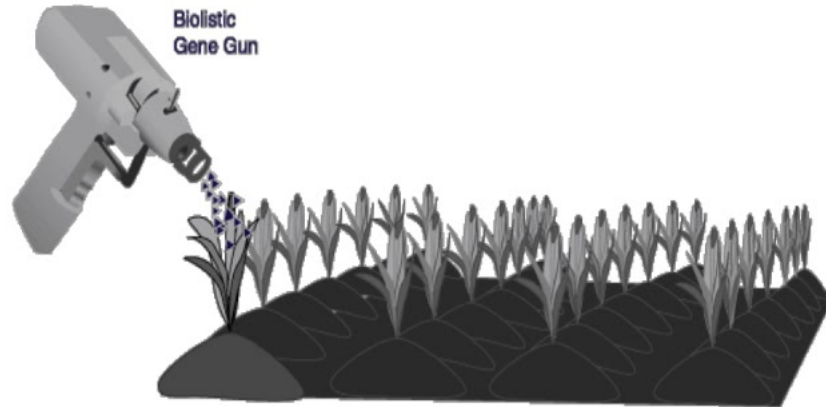
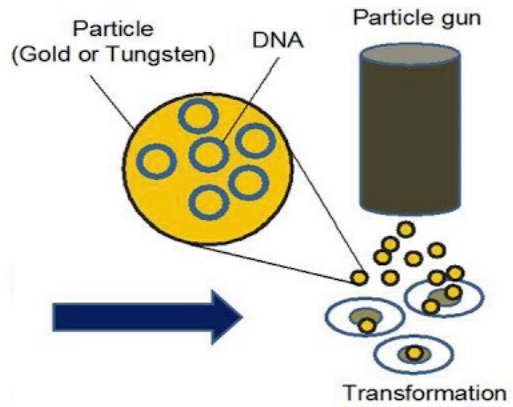
Gen Tabancası

- Gen tabancası yönteminde; hedef hücre veya doku içerisine gönderilecek gen; biyouyumlu, hızlandırılmış altın, tungsten, gümüş gibi ağır metal partikülleri kullanılarak taşınır.
- İdeal partikül taşıyıcı; biyouyumlu, inert ve küçük çaplı olmalıdır

Gene Gun

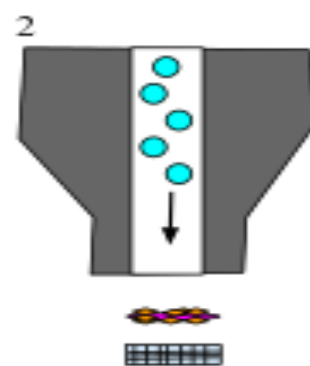
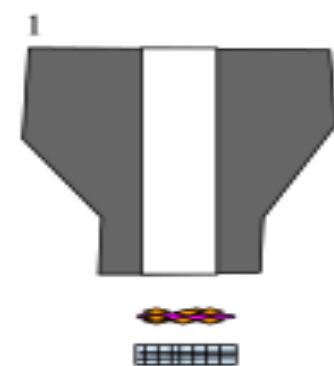
No vacuum required. Portable

Microcarriers coated on the inside of a plastic tube and accelerated using pressurized He.



Gen Tabancası

- Taşıyıcılar, plazmit DNA ile kaplanır ve gerekli hızlandırma yüksek voltajlı elektrik kıvılcımı altında su buharlaştırma veya helyum deşarjı aracılığıyla sağlanır.
- Gen tabancası aracılığıyla transfer yönteminin pek çok avantajı vardır.
- Hızlı şekilde gerçekleştirildiğinde yüksek seviyede ve uzun ömürlü gen ekspresyonu başarılabilir.
- Fakat; tüm dokuya gen transferinde düşük penetrasyondan dolayı verimlilik oldukça azdır



Helium Gas



Plastic Disk



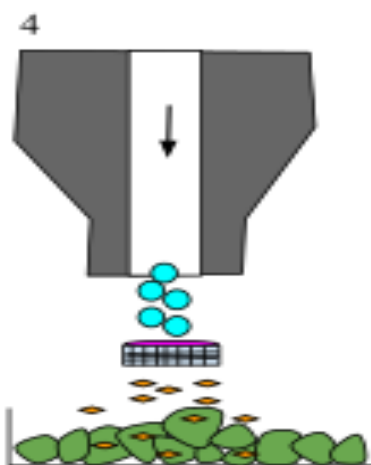
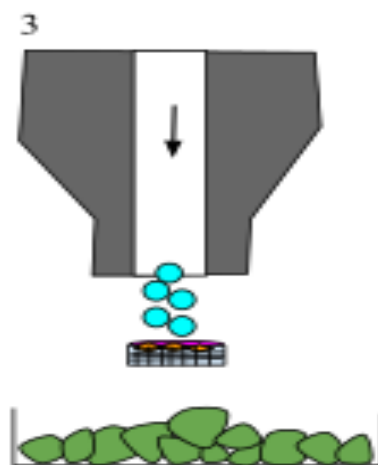
DNA Coated
Gold Particles



Screen

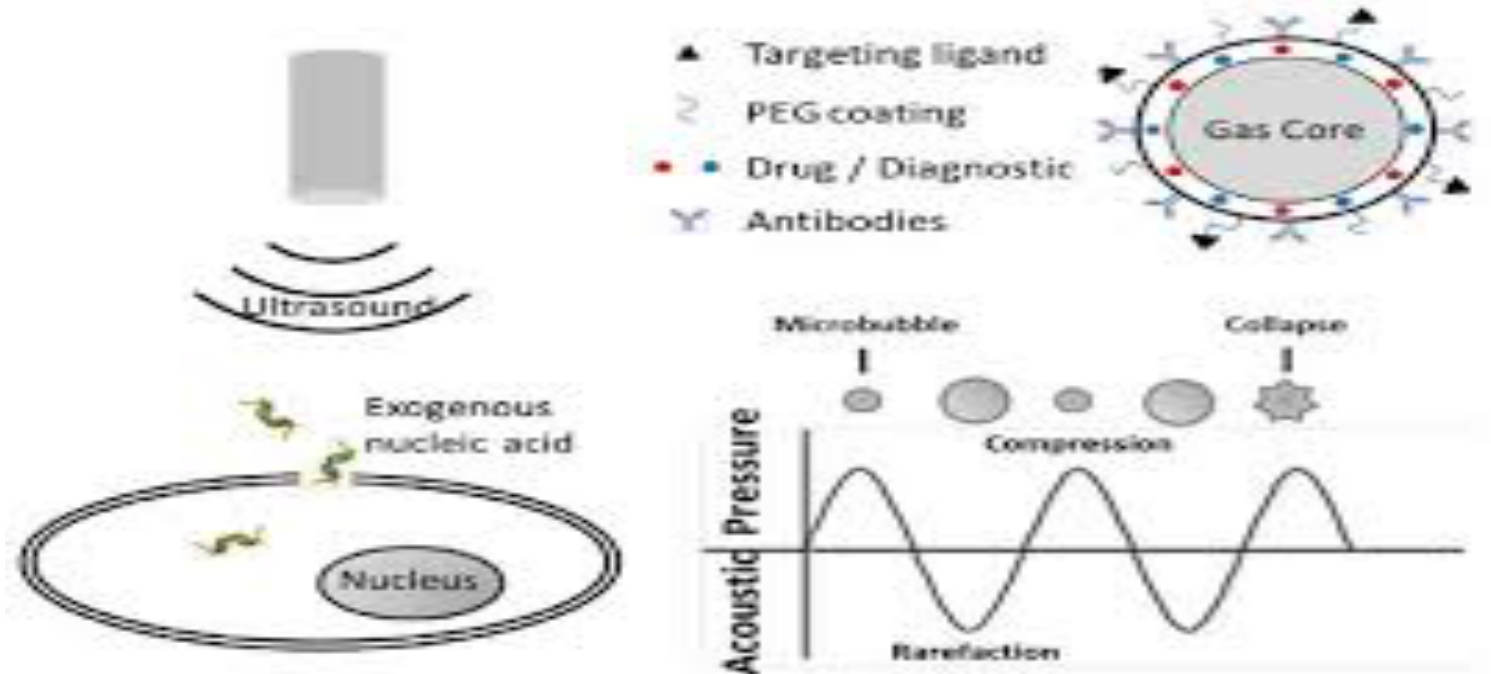


Target Plant
Cells



Sonoporasyon

- Ultrason aracılı gen transferi ya da sonoporasyon; ultrason dalgaları kullanılarak hücre zarının geçirgenliğini, zarda meydana gelen porlar ya da akustik kavitasyonlar aracılığıyla arttıran yeni yöntemler arasındadır. Güvenli olması, non-invaziv olması ve ameliyat gerekmeden iç organlara ulaşabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır

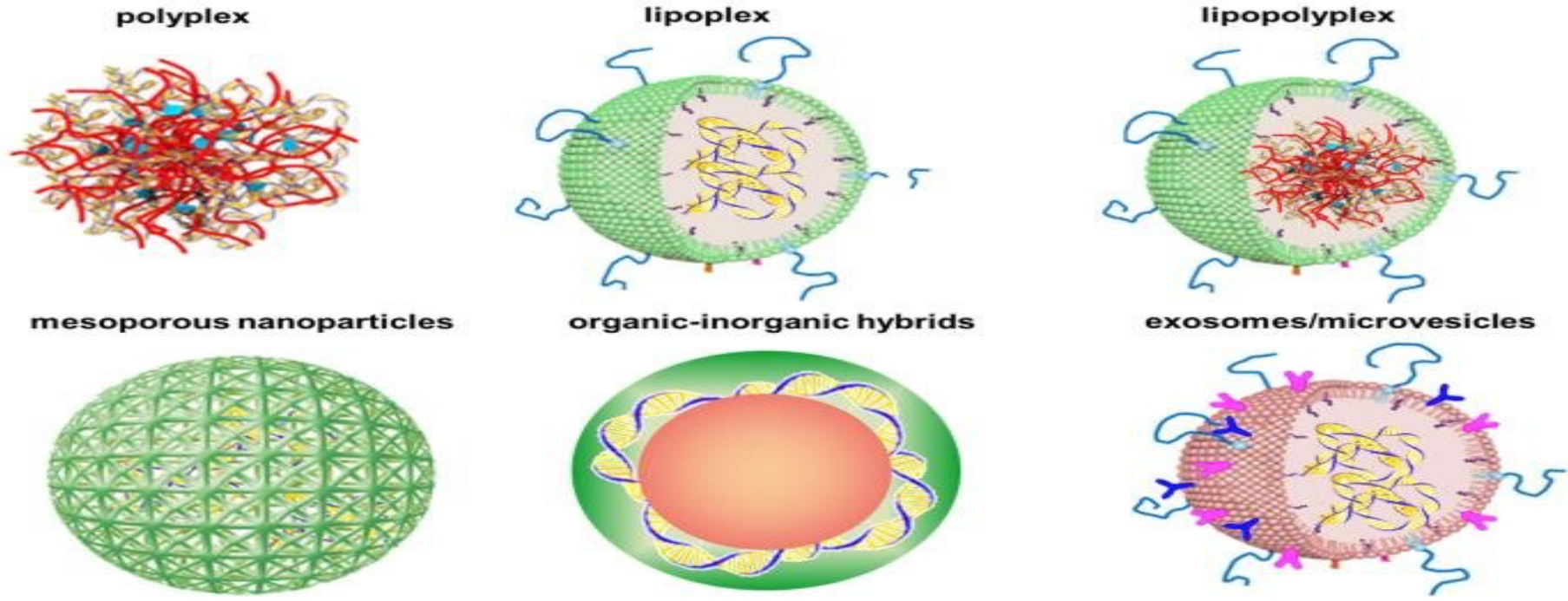


Taşıyıcı Sistemler

- Non- viral taşıyıcı sistemlerin ikinci grubunda; DNA çekirdeğe ve hücre içerisine çeşitli kimyasal reaksiyonlar aracılığıyla sentezlenmiş taşıyıcılarla taşınır. Kimyasal vektörler viral vektörlerin taşıdıkları sakıncaları aşmak için ortaya çıkmış umut verici, alternatif taşıyıcı sistemlerdir.

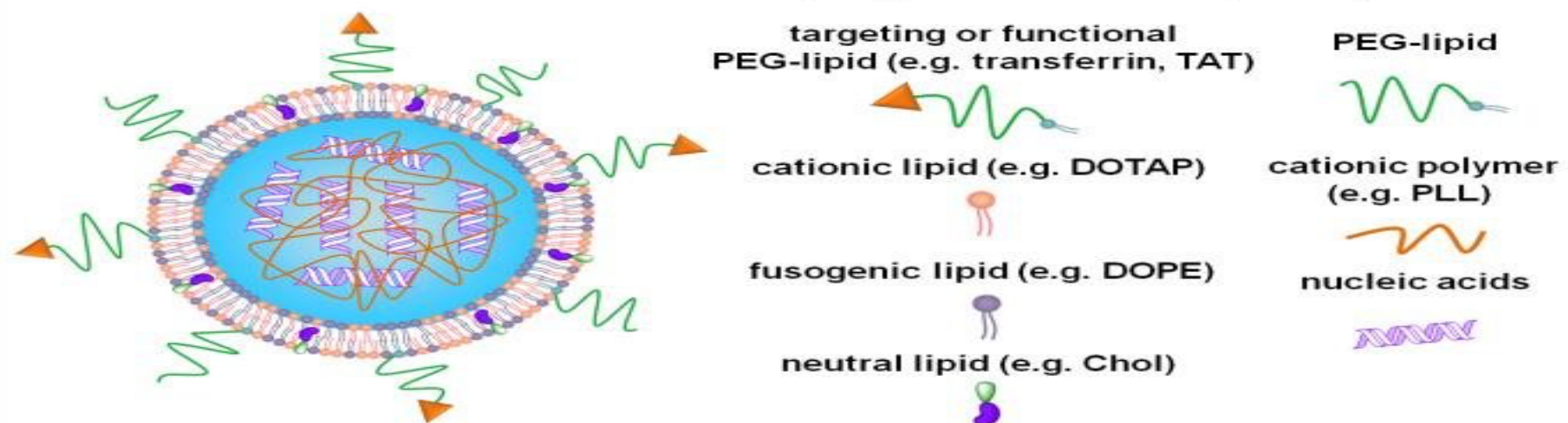
A

Nonviral gene vectors



B

multifunctional envelope type nano device (MEND)



Non-Viral Vektörler

- Bu vektörler hücre çekirdeğine gen transferini iyileştirmek için üç amaç taşırlar:
 - 1- DNA'nın (-) yükünü maskelemek,
 - 2- DNA'yı daha küçük yapmak için sıkıştırmak,
 - 3- DNA'yı hücre içi nükleazlar tarafından yıkımdan korumak.

Non-Viral Vektörler

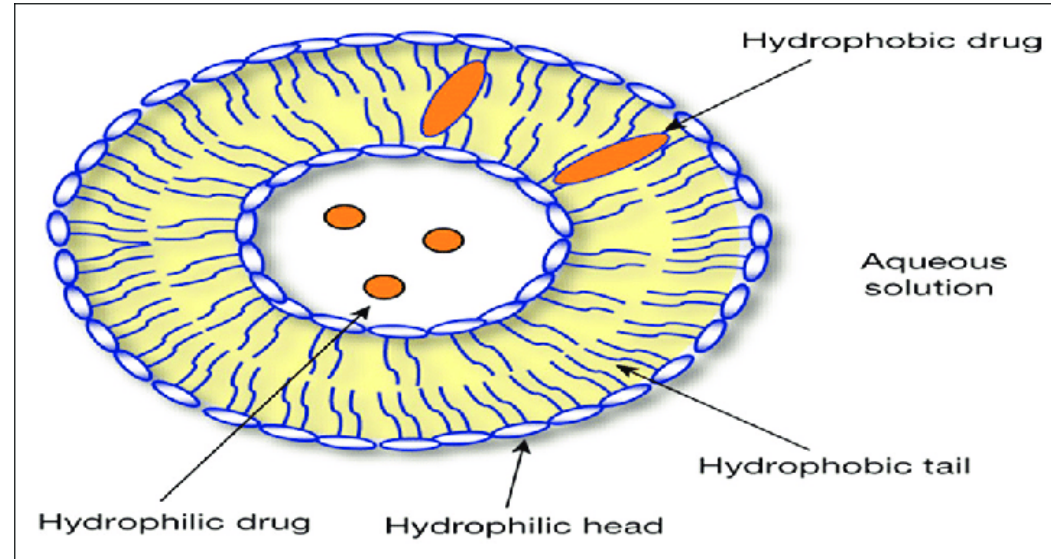
- Bu amaçlar anyonik DNA ile polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimler, biyobozunur polimerler aracılığıyla enkapsülasyon veya DNA'ya adsorbsiyon ile gerçekleştirilir
- DNA ve polikasyonlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerden yararlanılarak oluşturulan gen salım sistemleri anyonik DNA ile katyonik lipidler veya polimerler arasındaki elektrostatik ilgiyi kullanırlar

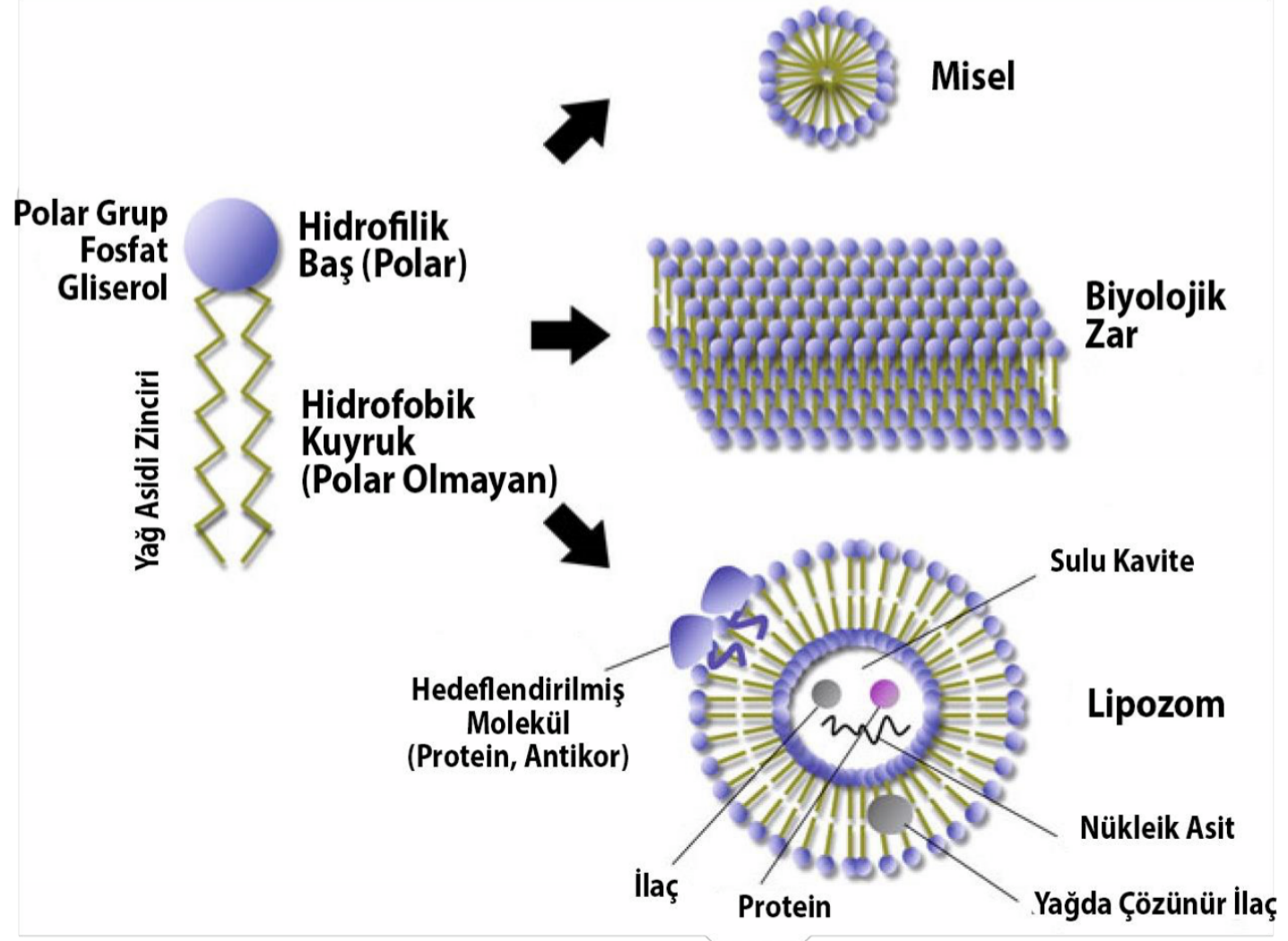
Non-Viral Vektörlerin Avantajları

- Virüs haricindeki vektör sistemlerinin üretimi kolay ve göreceli olarak ucuzdur, paketleme kapasiteleri büyüktür ve her şeyden önemlisi biyogüvenirliliği yüksektir.
- Laboratuvarda yabancı DNA'yı hücre içine aktarma görece olarak kolaydır ve viral sistemlerin güvenlik problemlerinin kontrol altına alınamadığı durumlarda bu yöntemlerin bazılarının gen tedavisinde kullanılma potansiyeli vardır. Ancak günümüzde tüm bu yöntemlerin, düşük gen transfer etkinliği ve kısa süreli ekspresyon oluşturabilme problemleri vardır

Lipozomlar

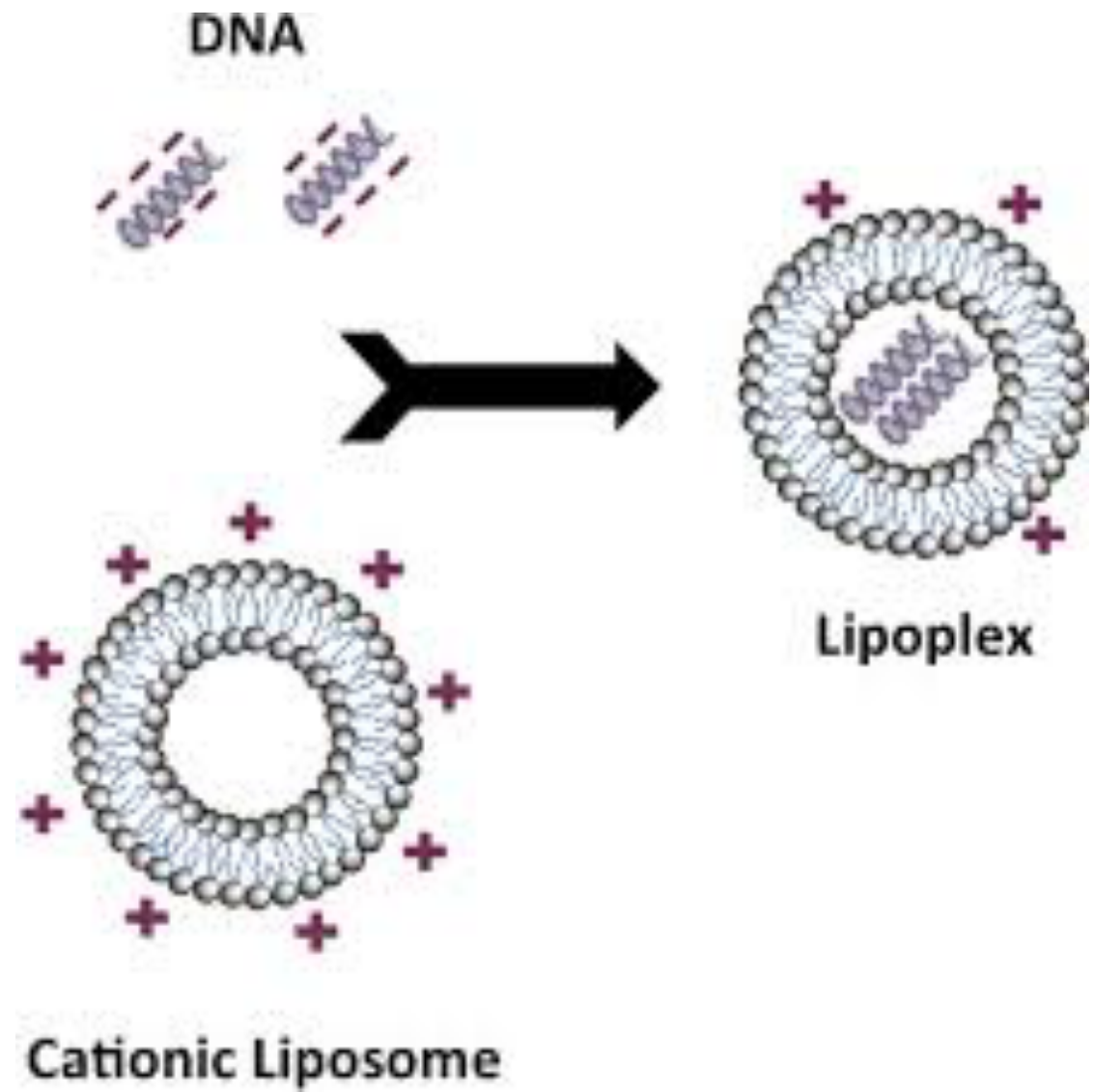
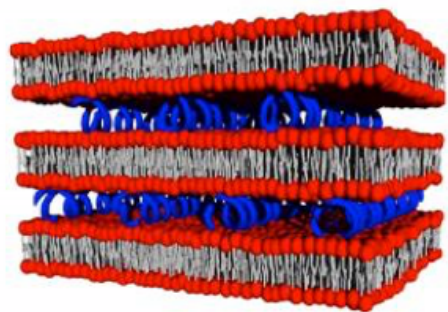
- Lipozomlar, memeli hücrelerinin membran yapısı model alınarak yapay olarak belli lipidlerin sıvı ortamda karıştırılması ile oluşturulan sentetik araçlardır.





Lipozomlar

- Örneğin fosfolipidler, biyolojik membranların yapısını taklit eden çift tabakalı araç oluşturur. Fosfolipidlerin oluşturduğu araçta hidrofilik fosfat grupları dış tarafta, hidrofobik lipid kuyrukları iç tarafta bulunur.
- Aktarılacak DNA in vitro lipozom ile paketlenir ve in vivo hedef dokuya doğrudan gen transferi için kullanılır. Lipozom-DNA kompleksi lipopleks, polimer-DNA kompleksi ise polipleks olarak adlandırılır. Katyonik lipozomların pozitif yüzey yükü olduğundan DNA ile doğal olarak kompleks oluşturur.

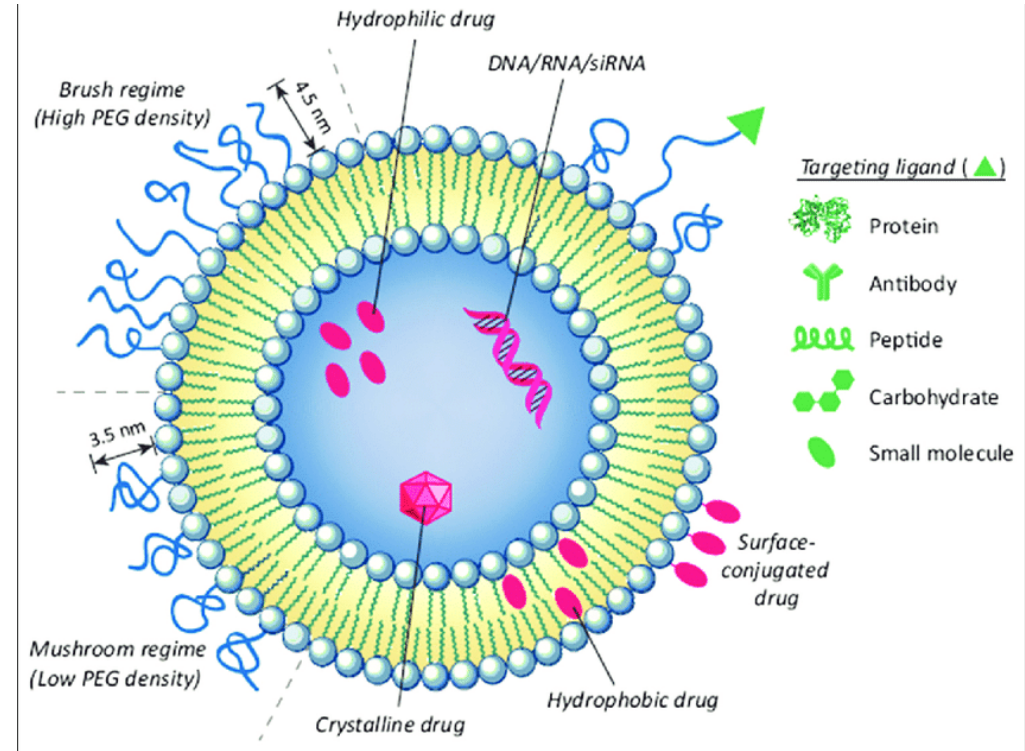


Lipozomlar

- DNA'nın lipid kılıf ile sarılması DNA'nın in vivo ortamda parçalanmasını önler ve hücre içine endositoz ile alınmasını sağlar.
- Katyonik lipozomların gen aktarım etkinliği daha iyi olduğundan (negatif yüklü membranlara kolaylıkla penetre olur) ve hücre içinde aktarılan DNA'yı yıkımdan etkin bir şekilde koruyabildiğinden, gen aktarım deneylerinde en fazla tercih edilen formdur

Lipozomlar

- Ancak, gen aktarım etkinliği viral vektörlerden 10 000 kez düşüktür ve aktarılan DNA kromozomal DNA içine entegre olacak şekilde tasarlanmamıştır.



Lipozomlar

- Lipidler kimyasal ve yapısal özelliklerine göre membrandan geçiş yolları değişse de yapılan çalışmalardan çoğu, klatrin-aracılı endositoz ile membrandan geçtiklerini göstermiştir. Lipidler, membrandan geçtikten sonra DNA'yı sitoplazmada serbest bırakırlar.
- Kompleksten ayrılan DNA moleküllerden çok düşük bir miktarı nükleusa ulaşabilmektedir. DNA'nın nükleusa transportu lipofektin aracılığıyla gerçekleşir. Nükleusta DNA, nüklear membranın yapısında bulunan nüklear gözenek kompleksi (nuclear pore complex, NPC) ile korunur

Polimerler

- Gen transferinde kullanılan polimerler DNA'ya afinitesi ve hücreye transferi en yüksek olan katyonik polimerler olup DNA/Polimer kompleks yapısına polifleks denir. Bu katyonik polimerler; linear, dallı ya da dendrimerik yapıya sahiptirler. Polimerin pozitif yüklü amin grubu DNA'ya bağlanır



A

Doğrusal Polimer



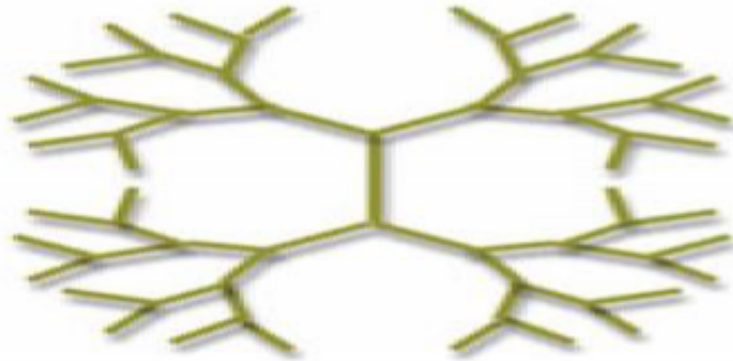
B

Dallı Polimer



C

Dendrimer



Polimerler

- Polimerik nanopartiküllerin en önemli özellikleri biyouyumluluk, biyobozunurluk, kimyasal transformasyonlar aracılığıyla kolaylaştırılmış yüzey modifikasyonları, mükemmel farmakokinetik kontrol ve kontrollü ilaç salımıdır



Polimerler

- Fakat bu sistemde de hazırlama koşullarındaki olumsuzluklardan (organik solventler, yüksek sıcaklık, yüksek kayma kuvveti) dolayı transfer edilecek DNA'nın parçalanması, düşük enkapsülasyon verimliliği, düşük DNA biyoyararlanımı sebebiyle tamamlanmamış DNA salımı gibi problemler mevcuttur