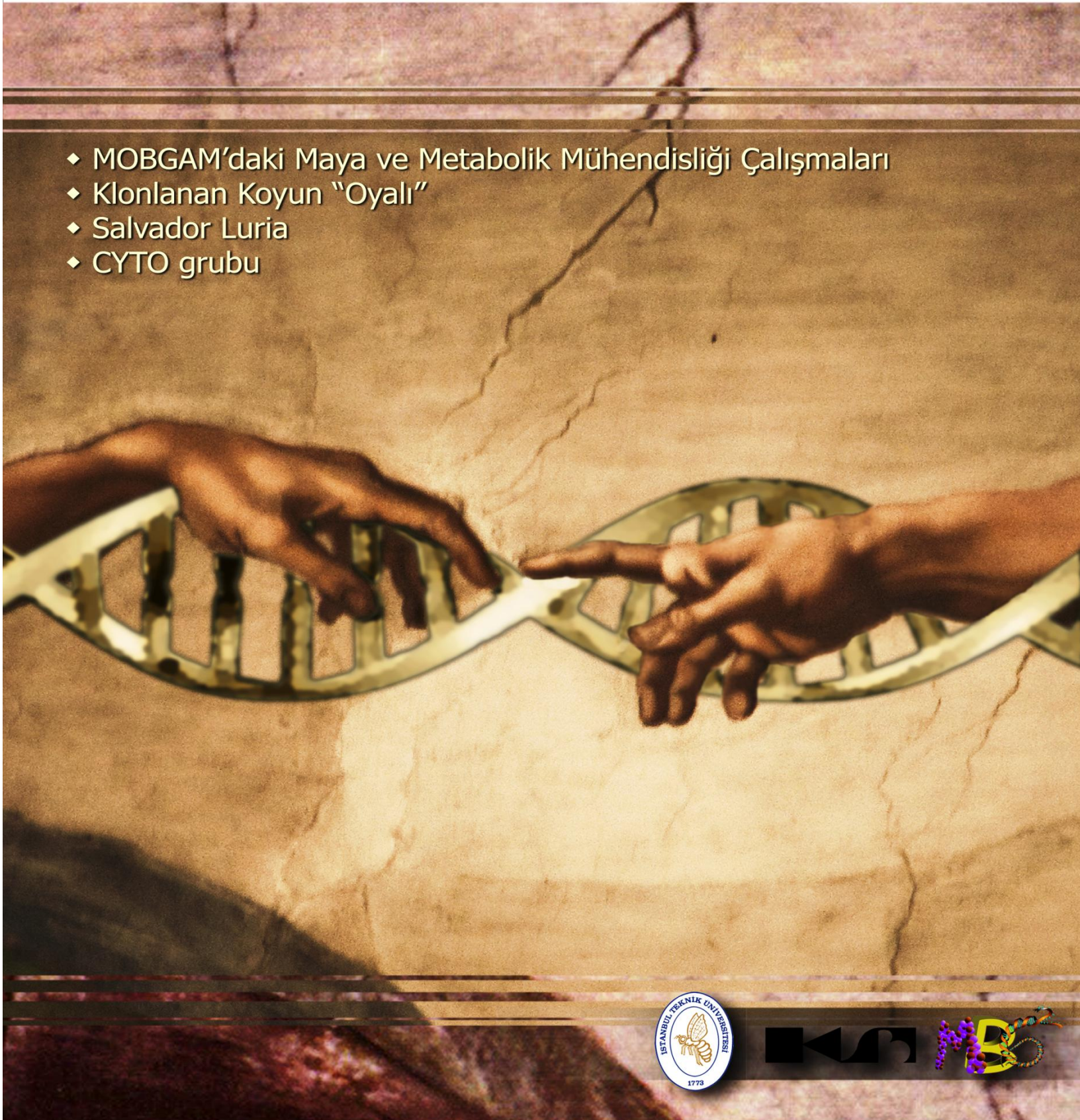


İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü

sarmal

Moleküler Biyoloji ve Genetik Dergisi Sayı 1 - Yaz 2009

- ♦ MOBGAM'daki Maya ve Metabolik Mühendisliği Çalışmaları
- ♦ Klonlanan Koyun "Oyalı"
- ♦ Salvador Luria
- ♦ CYTO grubu



İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Kulübü Adına Derginin Sahibi

Prof. Dr. Candan TAMERLER (tamerler@itu.edu.tr)

Danışman Öğretim Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Fatma Neşe KÖK
(kokf@itu.edu.tr)

Editör

İbrahim Halil MİRALOĞLU
(miraloglu@itu.edu.tr)

Genel Yayın Yönetmenleri

H. Kaya AKYÜZ
(kaya.akyuz@boun.edu.tr)

E. Yağmur ERTEN
(ertenem@itu.edu.tr)

Yazı İşleri Sorumlusu

Cemil Ozan CEYHAN
(coceyhan@yahoo.co.uk)

Salih TOPAL
(topalsa@itu.edu.tr)

Dizgi / Tasarım

Mert TAHMAZ
(tahmazm@itu.edu.tr)

Umut GÜNSEL
(gonsel@itu.edu.tr)

Can HOLYAVKİN
(holyavkin@itu.edu.tr)

Yusuf Kemal METİN
(yusufkemalmetin@hotmail.com)

Yazarlar

Doç. Dr. Zeynep Petek ÇAKAR
(cakarp@itu.edu.tr)

Bahtiyar YILMAZ
(yilmazbah@itu.edu.tr)

İbrahim Halil MİRALOĞLU
(miraloglu@itu.edu.tr)

Aslı ERDOĞAN
(erdoganas@itu.edu.tr)

Tuba KELEŞ
(keles@itu.edu.tr)

Belgin YALÇIN
(yalcin_belgin@hotmail.com)

H. Kaya AKYÜZ
(kaya.akyuz@boun.edu.tr)

E. İlker ÖZAY
(ozayem@itu.edu.tr)

Caner NAZLI
(nazlica@itu.edu.tr)

Özge Deniz BOZKURT
(ozgedeniz88@hotmail.com)

Cemil Ozan CEYHAN
(coceyhan@yahoo.co.uk)

Web Uyarlama

Hasan TÜKENMEZ
(hasantukenmez@hotmail.com)

İletişim: e-posta: sarmaldergisi@yahoo.com

Tel: 0555 749 70 25

Web Adresi: www.sarmal.itu.edu.tr

EDİTÖR'den

Günümüzde, hızla ilerleyen bilim, teknoloji ve sanat trenine tutunmaya çalışmakta olan ülkemiz, bunun ancak gençlerin taşıyabileceği bir sorumluluk olduğunun farkına varmaktadır. Öğrenciler, bilginin her geçen gün biraz daha sektörleştiği gezegenimizde artık ulusal değil küresel gelişim konusunda üzerine düşen görevleri yerine getirmeleri gerektiği hususunda uyanmaya başlamaktadır. Ancak güncelliğini yitirmiş bilgileri henüz öğrenmeye başlayan gençler maalesef gündemden uzak kalarak sürekli geriden gelme eğilimine tutulmuşlardır. Üniversitelerde dahi okutulan kitapların birçoğu yirmi yıl öncesine ait tozlanmış verilerle donatılmışlardır. Devamlı kendilerini geliştirmenin yollarını arayan gençler, kısıtlı kaynaklarla bazı bilim dallarında ilerlemelerini sürdürürken bazı bilim dallarında okuyanlarsa böylesine bir şansa dahi ulaşamamaktadırlar. Ülkemiz gençlerinin büyük üniversitelerde okuyanları haricinde, ülkemizde akademik İngilizce bilen kişi sayısının çok az olması, üniversite okuyan öğrencilerin günümüzün en önemli iletişim aracı olan internetten bile faydalanmasını engellemektedir.

Özellikle moleküler biyoloji ve genetik alanında yapılan çalışmaların henüz Türkçe olan herhangi bir kaynakta yer almaması, bu bölümde okuyan ve İngilizce bilen gençlere başka türlü bir sorumluluk yüklemektedir. Sürekli piyasadan, devletten veya başkalarından gelmesini umduğumuz bu tür çalışmaların artık bize sadece zaman kaybettiren, bizi tembelliğe ve sorumsuzluğa iten bir yaklaşım olduğunu düşünmekteyiz. Yalnızca bilim insanı değil sadece insan sıfatımız bile bize beklemenin en pasif hareket olduğunu düşündürmelidir. Bu bağlamda, ortak amacımız bilimse, ortak sorumluluğumuz da onu birlikte yükseltmektir.

İlk sayımızda İTÜ'de süren Metabolik mühendisliği konusundaki çalışmalarını ve dünyada bu konuda var olan teknolojileri, kanser tedavisinde gen terapisi yöntemlerini, geçmişten günümüze kök hücre teknolojilerini, biyoilaç sektöründe gelecek vadeden gelişmeleri ele alan yazılarla karşınızdayız. Ayrıca Türkiye'nin ilk kopyalanmış koyununu yapmayı başaran Prof. Dr. Sema Birler ile yaptığımız röportaj ve genetik sorgulama için atılan adımlarla ilgili gelişmeleri konu alan yazılarımızın da ilginizi çekeceğini düşünüyoruz.

Hedefimiz Moleküler Biyoloji ve Genetik alanını benimsemiş öğrenciler olarak Biyoloji'nin bu alanına ilgi duyan tüm öğrencilere çalışmalarını yayımlayabilecekleri, ihtiyaç duyacakları haberleri öğrenebilecekleri, gündemin önemli konuları hakkında derinlemesine bilgi alabilecekleri ve paylaşabilecekleri Türkçe olan yazınsal bir platform oluşturmaktır; fakat tek başına bir yazar kadrosu, nesnelliği azaltırken özneliği artırır. Bu bağlamda dergiyi moleküler biyoloji ve genetik ile ilgilenen tüm şahısların eleştirileri, önerileri ve yazılarıyla geliştirmeyi hedefliyoruz. Sosyal ve küresel sorumluluğumuzun bir parçası olan bu göreve hepimizi davet ediyoruz.

Saygılarımla,

İbrahim Halil Miraloğlu

İÇİNDEKİLER:

Prof. Dr. Sema Birler ile Röportaj	5
İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve İTÜ MOBGAM'daki Maya ve Metabolik Mühendislik Araştırmaları	8
Salvador Luria.....	14
GenETİK Sorgulama.....	15
Kök Hücre	17
Kanserde Gen Terapi.....	21
Transfeksiyon - İlaç Biyoteknolojisinde Gelecek Vaat Edici Adımlar.....	26
Cyto Grubu.....	27

RÖPORTAJ

Prof. Dr. Sema Birler ile Röportaj

Uzun zamandır hayvanların *in vitro* ortamda fertilizasyonu ile ilgili çalışmalar yapan Prof. Dr. Sema Birler, 2007 yılının sonlarında Türkiye'nin ilk kopya koyununu üretmeyi başararak Türkiye'nin bilim gündemine oturdu. Sarmal dergisi olarak biz de bu çalışmanın detaylarını öğrenmek ve sizlere sunmak için Prof. Dr. Sema Birler'i İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dölleme ve Suni Tohumlama Ana Bilim Dalı'ndaki odasında ziyaret ettik ve değerli hocamızla bir röportaj gerçekleştirdik.

S.D.: Bu aşamaya nasıl geldiniz, karşınıza çıkan sorunları ve sizi destekleyenleri bizimle paylaşır mısınız?

S.B.: Projemiz 2003 yılında Devlet Planlama Teşkilatı tarafından desteklendi, daha sonra Devlet Planlama Teşkilatı gereksinimleri karşılama yetersiz kalınca TÜBİTAK'tan da yardım aldık. Uzun zamandır koyunlar üzerinde biyoteknoloji çalışıyorduk, 2000 yılında ilk tüp kuzuları (8 tane) meydana getirdik; ama o kadar ilgi görmedi. Bu bir İstanbul Üniversitesi Araştırma Fonu projesiydi. O projeden sonra *in vitro* ortamda mezbahadan elde



edilen yumurtaları fertilize edip *in vitro* ortamda olgunlaştırdıktan 6 gün sonra taşıyıcı anneye transfer etmiştik. *In vitro* ortamda gerçekleştirdiğimiz bu projeden sonra klonlama projesi için kendimizi hazır hissettik; fakat 2003 yılına kadar destek bulamadık ve 2003 yılında

projeye başladık. Gereken malzemeleri yıllara bölünmüş bir şekilde aldığımız için ancak 2005 yılında projeye başlayabildik. Ekip bu konuda deneyimli değildi. Her şeyi kendimiz oturtmaya çalıştık. Bu yüzden biraz uzun sürdü.

S.D.: Ekibiniz hangi uzmanlık alanlarından oluşuyor?

S.B.: Ekibimiz tamamen veterinerlik mezunu araştırmacılardan oluşuyor. Yalnızca bir tıp doktoru vardı, o da doktorasını bizden almıştı.

S.D.: Koyun klonlamadaki amacınız neydi? Bundan sonraki çalışmalarınız ne üzerine odaklanıyor biraz bahseder misiniz?

S.B.: Bunun için klonlama neden yapılır bunu sorgulamalıyız. Klonlama iki nedenden ötürü yapılır. Birincisi hayvancılık alanındaki önemli ilerlemelere zemin hazırladığı için, ikincisi ise insan sağlığı için çok önemli araştırmalara olanak sağladığındandır. Bu iki ana başlığı biraz aralarsak, mesela soyu tükenmekte olan hayvanları klonlama yolu ile çoğaltabiliriz ve bununla ilgili bir proje bir arkadaşımız tarafından yürütülmekte. İnsan sağlığını ilgilendiren kısım oldukça geniş, transgenik hayvanlar yaparak, çiftlik hayvanlarında klonlama oldukça zor. Transgenik hayvanlar biyofabrika olarak kullanılıyor. Mesela sütünden yararlandığımız inek, keçi, koyun gibi hayvanlarda insanlar tarafından üretilmeyen proteinleri yapabiliyorlar. Buna bir örnek verecek olursak hemofili hastalarında faktör 8, 9 vücutta üretilmiyor. Hastalar bunları almazsa kanları pıhtılaşmıyor. Mecburen dışarıdan alınması gerekiyor; ancak oldukça pahalıdır. Bu ilaçları rekombinant hayvanlara salgılatabiliyoruz. Örneğin insülin, artık rekombinant olarak üretiliyor. Bunlar hep bakterilerle yapılıyor; fakat bu işi prokaryotlara yaptırırsanız hem ürün az hem de ökaryot hücrelerde kullanılacağı için verimi düşük oluyor. Bizim amaçlarımızdan biri de bu çiftlik hayvanlarına bunları yaptırabilmek. Bizim

işimiz aslında klonlama değil, klonlama bizim için başlangıç. Bir diğer yararı da organ transferi. Normalde türler arası organ transferinde insandan insana bile olsa birçok veri gözetilir. Ancak buna rağmen reddin önüne geçebilmek için bazen bağışıklık sistemi baskılanmak zorunda kalıyor. Bazı türlerin organ yapısı insana çok benziyor; mesela domuz, ancak aynı red burada da önümüze çıkıyor. İşte burada bağışıklık sistemini harekete geçiren proteinlerin durdurulduğu organ elde edebilirsiniz bu reddin önüne geçmiş oluyorsunuz. Bu şekilde hazırlanan transgenik hayvanların insanda kullanılması hedefleniyor.

S.D.: Etik ya da ahlaki açıdan hiç tepki aldınız mı? Size yöneltilen eleştiriler ne yönde oldu?

S.B.: Hayır aslında bize karşı gösterilen tepkiler hep pozitif oldu. Sadece bir ara internette haber yorumlarına tepki gösterenler oldu, onun haricinde herkes Türkiye'nin başarısı olarak gördü.

S.D.: Mezbahadan aldığınız yumurta hücreesindeki faktörler doğacak olan bireyin gelişimini nasıl etkiledi?

S.B.: Eğer bu hayati bir şeyi değiştiriyorsa cenin ölüyor. Zaten verimin belli bir oranda olmasının nedeni budur. Yumurta hücresi ile DNA'sını kullanacağınız hücre arasındaki uyum burada çok önemli bir rol oynuyor.

S.D.: Peki bu uyumu nasıl sağladınız? Doğum oranınızı etkileyen faktörleri söyleyebilir misiniz?

S.B.: Biz bu projede hep mezbaha ürünü kullandık. Belli bir tür olmasına veya akraba olmasına dikkat etmedik. Bu tür *in vitro* çalışmalarda, mezbaha ürünü kullanmak hep negatif etki yapar. Ayrıca Türkiye'de kesilen hayvanlar genelde genç hayvanlar olduğu için henüz tam olgunlaşmamış yumurta hücreleriyle çalıştık. Bu da olumsuz sonuçlara yol açar fakat yine de iyi bir oran yakalamayı başardık.

S.D.: Neden 69 hücreyi sadece 8 koyuna yerleştirdiniz? Bu diğer çalışmalara göre yüksek bir sayı değil mi?

S.B.: Biz normalde hücreleri blastosise kadar *in vitro* ortamda geliştireyorduk. Bu nedenle bir koyuna en çok üç tane koyabiliyorduk. Burada ise biz hücreleri henüz iki hücreli haldeyken yerleştirdiğimiz için bunların blastosise ulaşma oranı düşük olduğundan (yüzde elli gibi bir oran)



biz de çok koyduk.

S.D.: Peki düşük oranın bu kadar yüksek olmasındaki genetik temel nedir?

S.B.: En büyük nedeni çekirdeğin tekrar programlanması. Bunun haricinde plasenta gelişiminde de bazı gelişim bozuklukları var; ama bunların genetik temeli yine çekirdeğin tekrar programlanmasına bağlı bozukluklar.

S.D.: Doğuma yakın koyunların strese girdiğini söylüyorsunuz, bunun nedeni nedir? Normalde de bu durumla karşılaşılıyor musunuz?

S.B.: Normalde olmaz; ama koyun ve dana gibi hayvanlardaki bütün *in vitro* çalışmalarımızda iri yavru sendromu gibi sendromlar olabiliyor. Ayrıca

koyunlarımızın birinden 3 yavru bekliyorduk; ancak annenin türü yalnızca bir koyun doğuran kıvrıkcık türüydü. Eğer imkanımız olsaydı çoklu doğum yapan sakız türü gibi bir koyun seçerdik. Durum böyle olunca hayvan ister istemez strese giriyor.

S.D.: Klonlanan hayvanın yaşam süresinde bir problem ortaya çıkıyor mu? Bunun nedeni nedir?

S.B.: Dolly'de böyle bir sorun ortaya çıkmıştı. Dolly 6 yaşında bir koyunun meme epitel hücrelerinden alınmıştı ve telomer uzunluğunun normal doğanlardan daha kısa olduğu görülmüştü. Ancak biz çok genç koyunlar kullandığımız için böyle bir sorunla karşılaşabileceğimizi düşünmüyoruz. Oyalı ve Zarife'nin şu anda yaşama isteği çok güçlü, testlerimiz sürüyor.

S.D.: Yaptığınız çalışmalar gerçekten eşsiz mi olacak yoksa daha önce yapılan çalışmaların bu coğrafyaya uyarlanmış bir biçimi mi olacak?



S.B.: Aslında teknolojiye sahip olmak çok önemli. Bir altyapı oluşturmadan birden bire büyük projelere atlamak pek mümkün olmuyor. Çalışmalarımız insan ve hayvan sağlığı açısından ilerleyecek. Mesela felç olmuş bir hayvan üzerinde yapacağımız çalışmada embriyonik kök hücrelerin geliştirilmesi ve kullanılmasını düşünüyoruz. Eğer işe yararsa insanlar üzerinde de kullanılmasını hedefliyoruz.

S.D.: Yaptığınız ve yapacağınız değerli projeler var ve Türkiye'de yankı uyandırdınız. Projelerinize en çok kimler ilgi gösterdi?

S.B.: Okullar çok ilgi gösterdi, özellikle liseler. Ben gençlere yapılan yatırımı en büyük kazançlardan olarak görüyorum. Çağrıldığım her seminere gitmeye çalışıyorum.

S.D.: Klonlama için koyun seçmenizdeki ana unsur nedir?

S.B.: Koyun klonlama da aslında pek kolay bir yol değil. Özellikle klonlama yaptıktan sonra *in vitro* ortamda embriyonik gelişimi çok zor oluyor. Bu nedenle pek tercih edilen bir hayvan değil. Bizim koyun seçmemizin nedeni koyunlar üzerinde çok fazla tecrübemizin olmasıdır. Biz *in vitro* fertilizasyonda koyun embriyolarını istediğimiz boyuta getirebilmiştik. Bu da kopyalamada bizim çok işimize yaradı. Hiç bilmediğiniz bir konuda bildiğiniz sağlam bir şeylerin olması çok önemli.

S.D.: Rekombinant koyun yaptığınızda hukuksal bir engelle karşılaşacak mısınız?

S.B.: Öyle gözükmüyor; fakat üretilen ilacın insana ulaşabilecek hale gelmesinde olabilir. Deneyler önce *in vitro* ortamda, sonra hayvan üzerinde yapılır, ardından Sağlık Bakanlığı'nın izniyle insana geçilebilir. Ancak bunu bizim yapmamız zaten pek mümkün değil. Bu bir ilaç şirketinin işi; ama biz bu yılın sonunda transgenik bir koyun üretmeyi planlıyoruz.

S.D.: Türkiye'de klonlama çalışan başka bir grup var mı?

S.B.: TÜBİTAK Mamara Araştırma Merkezi'nde de TÜBİTAK destekli çalışan bir grup daha var, hepsi o kadar.

S.D.: Verdiğiniz bilgiler için dergimiz adına çok teşekkür ederiz.

H. İbrahim MİRALOĞLU
Aslı ERDOĞAN
Tuba KELEŞ

Fotoğraflar:

<http://arsiv.ntvmsnbc.com/news/427031.asp>

MAKALE

İTÜ Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü ve İTÜ MOBGAM'daki Maya ve Metabolik Mühendislik Araştırmaları

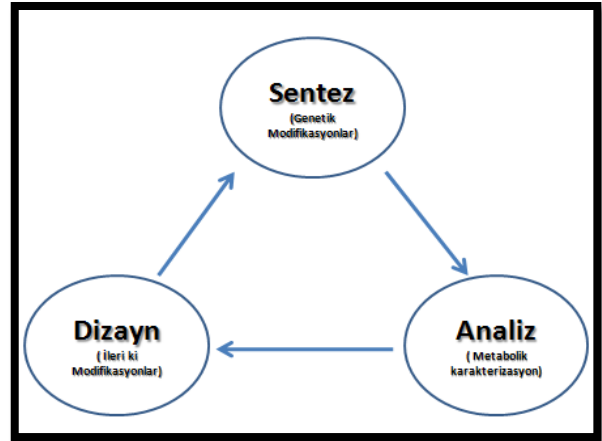
Bahtiyar YILMAZ ^{1,2} ve Zeynep Petek ÇAKAR ^{1,2}

¹ İTÜ Fen Edebiyat Fak. Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Maslak, İstanbul

² İTÜ Dr. Y. Müh. Orhan Öcalgiray, Moleküler Biyoloji, Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmaları Merkezi (İTÜ-MOBGAM), Maslak, İstanbul

Saccharomyces cerevisiae mayası, insanoğlunun asırlardan beri ekmek, şarap ve bira yapımında kullanmakta olduğu, endüstriyel açıdan çok önemli bir mikroorganizmadır. Maya ve mayadan elde edilebilecek ürünlerin verimli bir şekilde eldesi için, bu mikroorganizmaların endüstriyel açıdan önemli özellikleri geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla kullanılan güncel bir yöntem de metabolik mühendislik yöntemidir.

Özellik geliştirme çalışmaları içinde ilk adım olarak türlerin karakteristik seçilimine odaklanılmıştır. Klasik mutasyon tekniklerinin yanında giderek gelişmekte olan rekombinant teknikler bu çalışmalarda ulaşılabilecek sınırları genişletmektedir. Hücresel fonksiyon alanları ve rekombinant DNA teknolojisi tabanlı, endüstriyel özelliklerin geliştirilmesine katkıda bulunacak olan bu rasyonel çalışmalara metabolik mühendisliği çalışmaları denilebilir. Buradan yola çıkarak metabolik mühendisliğin tanımını, hücre içindeki genetik ve metabolik düzenleyici işlemleri rekombinant DNA teknolojisi yardımıyla optimize ederek hücresel yol izlerini tanımlayıp, hücre



Şekil 1. Metabolik Mühendisliğin Esasları [4]

içindeki üretimin ve verimin artmasını amaçlayan yöntem bilim olarak yapabiliriz [1]. Bailey ve çalışma grubu metabolik mühendisliği yaklaşımını iki kategori altında sınıflandırmışlardır [1,2].

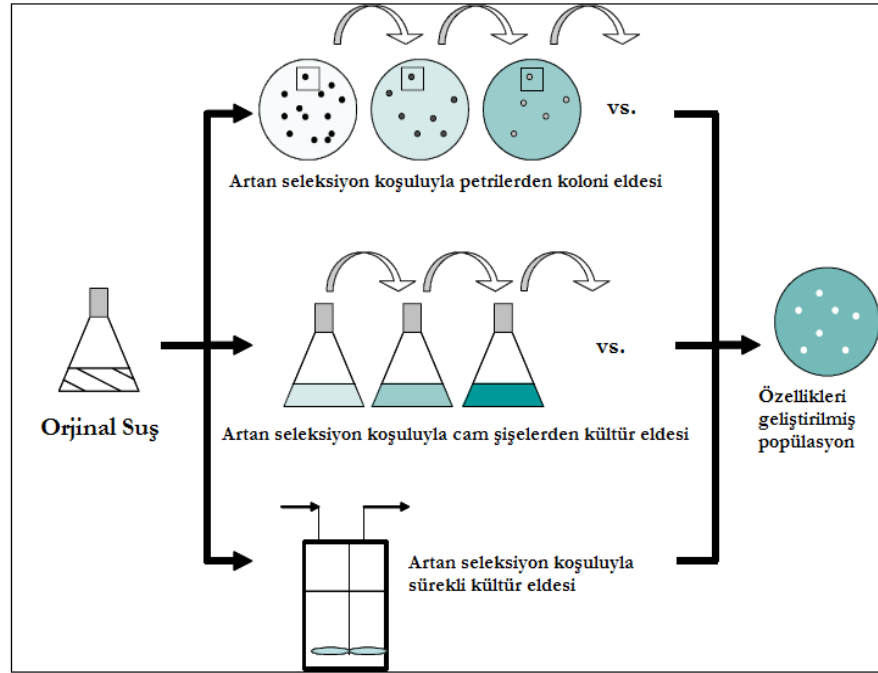
1. Heterolog genlerin yardımıyla suşların geliştirilmesi
2. Metabolitlerin akışının yeniden yönlendirilmesi

Daha sonraki süreçte Nielsen, metabolik mühendisliği tekrar kategorize ederek 7 başlık altında toplamıştır: Rekombinant protein üretimi çalışmaları, mikrobiyal substrat kullanımına dayalı mühendislik çalışmaları, yeni biyosentetik ve katabolik özellikler kazandırmaya yönelik çalışmalar, proses gelişimi için hücresel fizyoloji çalışmaları, yan ürün oluşumunun azaltılması üzerine olan çalışmalar, ürün oluşumu ve verimin artırılmasına yönelik çalışmalar [3].

Her ne kadar tüm bu kategoriler farklı metodolojiler de içerse hepsinin ortak noktası tekrarlayan belirli adımlara sahip olmalarıdır. Geliştirilmiş suşun sentezlenmesi, istenilen koşullar altında suşun analizi ve ileri ki optimizasyonlar için bir sonraki adımın tasarımı metabolik mühendislikteki tüm alt başlıkların ortak noktasını oluşturmaktadır (Şekil 1.) [4].

Biyoteknolojik süreçler ile üretilen, bira, şarap, peynir aminoasitler ve organik asitler gibi çeşitli ürünlerin daha verimli üretilmesini amaç edinen

Ancak hücresel sistemlerin karmaşıklığı ve hücresel düzeydeki dinamik etkileşimlerin hala istenilen düzeyde çözüme ulaşmamış olması metabolik mühendisliğin bazı noktalarda tıkanmasına sebep olmaktadır. Her ne kadar genetik düzeydeki değişikliklerin etkisini araştırmak için yeni algoritmalar ve modeller gelişse de, moleküler ve mekanistik bilginin engin düzeyde olması ve bilinmezliği metabolik mühendisliği için bir dezavantaj teşkil etmektedir. Hakkında çok fazla bilgi sahibi olmadığımız konular arasında hücresel metabolizmanın kinetiği gibi dinamikler de bulunmaktadır.



Şekil 2. Evrimsel Mühendislik Uygulamalarının Esasları [4]

metabolik mühendislik yaklaşımında üstünde durulan önemli bir nokta, araştırma ve geliştirme safhasındaki zorlukların önemli bir kısmı daha büyük ölçekli çalışmalara geçildiğinde artmasıdır. Bunun bir nedeni ise endüstriyel üretim aşamasında mikroorganizmaların çeşitli stres koşullarına maruz kalmalarıdır. Bu stres koşullarına yol açan faktörler, hücre içinde ve hücre dışında etki edebilen fiziksel, kimyasal ve de doğal faktörlerdir. Bu faktörlerin birinin tasarlanan şekilden farklı bir şekilde üretimde baskın çıkması düşük verimliliğe sahip ürünlerin oluşmasına yol açmaktadır [3,5].

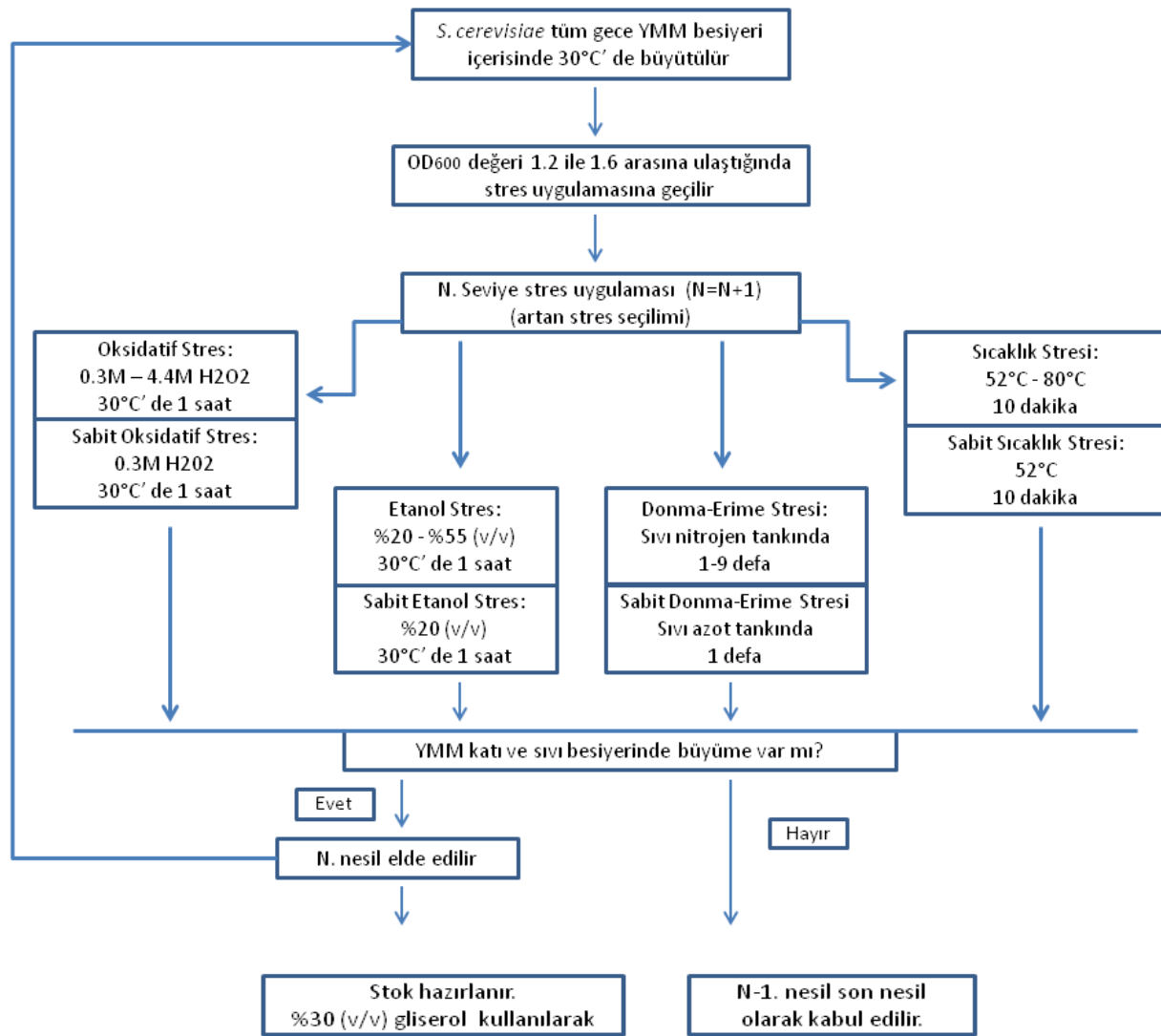
Metabolik mühendislik yaklaşımı, bilimin günümüzde ulaştığı noktada var olan, bilinen fonksiyonel ve moleküler bilgilere bağlı olarak uygulamalar geliştirmeye çalışmaktadır. Fonksiyonel genomik düzeyde çalışmalar, bilinen analitik metotların yardımıyla artarken hücresel özellikleri ve hücrenin tepki mekanizması konusundaki bilgimiz de gün geçtikçe artmaktadır.

bir çoğunluğunun henüz açıklanmamış olması, yapılan modellemelerde yan etkinin ya da ikincil tepkinin tahmini ile ilgili sorunlar oluşturmaktadır. Tüm bunların karşısı olarak, bir tersine metabolik mühendislik yaklaşımı olan evrimsel mühendislik, bu açmazlarda çözüm üreten bir dal olarak karşımıza çıkmaktadır. Evrimsel mühendislik adaptasyona, çeşitliliğe ve de seçilime bağlı olan doğal mühendislik prensiplerini kullanmaktadır. Böylece uygulanabilir metodolojilere katkıda bulunarak, nesil gelişimini, süreç optimizasyonunu mümkün kılıp istenilen fenotipin doğrudan ve dolaylı yöntemlerle seçilimini sağlamaktadır. Rastgele mutasyon ve plakalardan doğrudan seçim yolları gibi ampirik nesil gelişimlerinin yanında rekombinant ve sürekli evrim (nesiller boyu devam eden) uygulamalarını da kapsamaktadır (Şekil 2). Metabolik mühendislik rasyonel bir yaklaşım olmasına bağlı olarak sadece bir seferde, bir veya birkaç fenotip üzerine yoğunlaşırken evrimsel mühendislik ise önce farklılaşmış popülasyonlar elde ederek sonrasında

istenilen popülasyona ulaşmak için seçim ve taramalar yapar. Ayrıca çoklu stres koşullarına dirençli bireylerin eldesinde genetik metotlara bağlı olarak rasyonel yolların yeterli olmaması, alternatif, ampirik hücre gelişimini mutasyon ve katı besiyeri üzerinde doğrudan seçim ile mümkün kılabilir ve bu yöntemle sıcaklık, etanol, metal, oksidatif, donma erime ve ozmotik stres koşullarına dirençli mutant hücreler elde edilebilir [4, 6, 7].

Evrimsel mühendislik, metabolik mühendisliğin eksik olduğu noktaları çok iyi kapatmaktadır.

Birden çok genetik manipülasyon sonucu elde edilmeye çalışılan endüstriyel suşlar buna verilebilecek güzel bir örnektir. Endüstriyel alanlardaki uygulamalar için tasarlanan ve elde edilmeye çalışılan suşların genelde çeşitli stres koşullarına ya da genel anlamda çevresel koşullara dayanıklı olmaları gerekmektedir. Endüstriyel mayalar, şarap yapımı sırasında, mayalama işleminde, fermentasyon sırasında, aynı anda veya ardı ardına çeşitli stres koşullarına veya bu stres koşullarının karışımına maruz kalabilmektedir. Çok basit anaerobik koşulda bir *S. cerevisiae* mayasının üretimi bile, mayanın çeşitli stres koşulları ile



Şekil 3. Kesikli stres uygulamasının algoritması ve stres koşullarına dirençli mutant maya hücrelerinin oluşumu [9]

karşılaşmasına sebep olur. Ayrıca biyokütle üretiminin sonunda durağan faza girmeye zorlanacağı için açlık gibi bir durumla da karşı karşıya kalmaktadır. Bu gibi koşullarda genellikle birden fazla gen tetiklenmektedir. Stres koşullarına direnç özelliği de çoğunlukla birden fazla genin etkileşimi veya onların gen ürünlerinin işlevliliği ile sağlanmaktadır. Bu yüzden genetik manipülasyonların zorluğundan dolayı üretim sırasındaki fizyolojik koşullamalar endüstriyel uygulamalar için daha uygundur. Böyle koşullamalar hücrelerin dayanıklılığını artırmaktadır. Bu alandaki çalışmalarda en çok dikkat çeken maddelerden biri de trehalozdur. Dissakkarit sınıfından olan trehalozun, kuruma, sıcaklık ve de donma-erime stresi koşullarında hücrenin direncini artırmakta olduğu bilinmektedir. Bu çalışmaların yanında, sıcaklık stresine direnç hakkında yapılan bir çalışmada ise, artırılmış büyüme sıcaklığının maya metabolizmasındaki anabolik ve katabolik akıların artışını sağladığı görülmüştür. Başka bir çalışmada ise donma erime stresine direnci olan poliploid ve endüstriyel bir mutant maya suşunun ultraviyole ışınları ile mutasyona uğratılıp 200 döngümlük donma erime stres koşulundan sonra elde edildiği bildirilmektedir. Bu suşun fizyolojik analizinde ise ilginç bir şekilde bu suşun dondurma-kurutma şeklindeki saklamada daha çok gaz üretme kapasitesinde olduğu görülmüştür [6, 8, 9].

Literatürdeki önemli çalışmalardan biri de etanol üretimi için pentoz kullanımı üzerinedir. Amaçlanan, *Saccharomyces cerevisiae* mayasının sübstrat türünde çeşitliliği sağlayarak pentoz kullanımını artırmaktır. Bitkilerde bol miktarda bulunan ksiloz ile pentozdan yararlanma çalışmaları endüstri tarafından da desteklenen çalışmalardandır [10].

Metabolik mühendislik ile yapılan çalışmalarda ksilozun yanı sıra arabinozun da kullanımı sağlanmasına rağmen ksilozu kullanarak yüksek verimlilikle ve spesifik hızla etanole dönüştürme gerçekleştirilememiştir. Prof. Uwe Sauer ve grubu anaerobik ortamda ksilozda büyüyen *S. cerevisiae*

eldesi için yaptıkları çalışmada *Pichia stipitis*'ten *S. cerevisiae*'ye integre edilen the NADPH-dependent xylose reductase (XR), the NADH-dependent xylitol dehydrogenase (XDH) ve the endogenous xylulokinase (XK) genlerinin aşırı ekspresyonlarına bağlı şekilde ksilozu en verimli kullanan bireyleri seçerek evrimsel mühendislik yaklaşımını uygulamışlardır. Metabolik mühendislik çalışmaları ile üretilen *S. cerevisiae* suşuna kimyasal mutasyon yaptıktan sonra en iyi değişime uğramış mutantın seçilimini, sübstrat bağlanması ve kemostat kültürünü kullanmasına bağlı olarak yapmışlardır. Ksilozda büyüeyebilen bireylerin seçilimi 460 nesil sonra ya da başka bir deyişle 266 günlük seçilimin sonucunda ortaya çıkmıştır. Ayrıca anaerobik ksilozda büyümeleri 270 nesil sonra, büyüme koşullarının kademeli olarak anaerobik koşullara çevrilmesinden sonra ortaya çıkmıştır. Elde ettikleri en iyi birey 0,012 h⁻¹ gibi bir maksimum spesifik büyüme hızına sahip olmakla birlikte 0,021 g/g'lık bir biyokütle oluşturulmuştur. Bunun yanı sıra elde ettikleri iki farklı karaktere sahip nesilden *Class I* olarak adlandırdıkları neslin 50 gr/lt glikoz ve ksiloz içeren karışık besiyerinde anaerobik koşullar sağlandığında hacmen %19 oranında etanol biriktirebildiği gözlemlenmiştir [10].

Bir tersine metabolik mühendislik şekli olan evrimsel mühendislik yaklaşımı ile İTÜ'de Araştırma Grubumuzun yürüttüğü çalışmalarda ise haploid *S. cerevisiae* CEN. PK 113 - 7D suşunun çeşitli stres koşullarına karşı dirençli hale getirilmesi amaçlanmaktadır. Etanol, hidrojen peroksit, sorbitol, kobalt, demir, donma-erime gibi stres koşullarını hem sürekli hem kesikli uygulayarak istenilen dirençli bireylerin edinimi üzerinde çalışmalar yürütülmektedir. Grubumuzun 2005 yılında yayınlanan çalışmasında donma erime stres koşulunda sürekli ve sabit olarak yapılan seçimlerden dirençli mutant maya popülasyonları elde edilmiştir. Seçim öncesinde mutant mayalar akilleyici madde olan EMS' ye (Etil Metan Sulfonat) maruz bırakılarak hücre genomunda rastgele mutasyonların oluşması sağlanmıştır. Daha sonra bu mutant maya hücrelerine çeşitli stres

koşulları uygulanmıştır (Şekil 3). Sabit donma erime stresinden elde edilen popülasyonun donma-erime stresinin yanında etanol ve de yüksek sıcaklık stresine de direnç gösterdiği gözlemlenmiştir. Artan donma erime stresinden elde edilenlerin ise donma-erime stresinin yanında yüksek sıcaklık ve oksidatif stresine dirençli oldukları saptanmıştır. Yüzdesel olarak hayatta kalmaları hesaplandığında ise mutant bireylerin yaban tipe kıyasla oksidatif stres koşullarında 1000 kat, diğer stres koşullarında ise 100 kata kadar daha dirençli oldukları gözlemlenmiştir. Bu çalışma, birden fazla strese karşı dirençli endüstriyel suşların gelişiminde uygulanabilecek seçim prosedürü için ilk referans çalışma olması bakımından önemlidir [9].

Bu çalışmanın dışında, çoklu stres koşullarına dirençli mayaların eldesine yönelik bir başka çalışma da 1988'de Iida'nın yaptığı çalışmadır. Iida çalışmasında Ty retrotransposonunu (en çok bulunan maya transposable elementi; etkileri genelde zararlı, normal veya faydalı olabilir) *Saccharomyces cerevisiae*'nin adenylate cyclase (CYR1 veya CDC35) geninin 5' ucuna ve de kodlamayan bölgesine ekleyerek sıcaklık stresine dirençli mutantlar elde etmiştir. Her ne kadar adenylate cyclase aktivitesi yaban tipe göre 3 kat azalsa da mutantların ultraviyole ışığına ve etanola karşı direnç gösterdikleri kaydedilmiştir. Ancak bu çalışmada stres direnci, transpozon eklenmesi sonucunda beklenmedik bir özellik olarak ortaya çıkmış ve stres dirençli mutantların elde edilmesini sağlayabilecek bir ortamda seçim yapılmamıştır [11, 12].

Evrimsel mühendislik biyoteknoloji alanındaki özgün uygulamalardan olup binlerce yıldır amaca yönelik bitkilerin ve hayvanların yetiştirilmesinde kullanılmaktadır. Son yüzyılda ise maya nesillerinin seçimi konusunda yapılan evrimsel mühendislik tabanlı çalışmalar endüstriyel açıdan daha iyi üretimleri etkin kılmaktadırlar. Bunun yanı sıra, son yarım yüzyılda ise klasik suş geliştirme yöntemleri, sayısız yüksek verimli fermentasyon ürünü üreten organizmaların üretilmesini

sağlamıştır. Günümüzde ise bu mühendislik tekniği özelleştirilerek, ancak ana mantığı değişmeden yine evrim algoritmasına dayandırılarak, daha da moleküler düzeyde değişiklikler oluşturulmaya başlanmıştır [5].

Özetle, evrimsel mühendislik yaklaşımı kullanarak istenilen özellikte mutant mayalar ve mikroorganizmalar mutasyon ve seleksiyon prensibine dayanarak kolayca seçilebildiği gibi, günümüzde hızla gelişen '-omik' teknolojiler diye de adlandırılan genomik, transkriptomik, proteomik ve metabolomik vb. teknolojiler ile istenilen yapı ve fonksiyondaki fenotiplerin moleküler yapısının aydınlatılması bulundukları metabolik ağın, istenilen ürünün üretiminde izledikleri yol izlerinin ve de onları oluşturan düzenleyicilerin açıklanması ve daha da önemlisi diğer canlılara bu özelliklerin aktarılması giderek daha kolay ve daha yaygın olacaktır. Ayrıca global anlamda tepki mekanizmasının metabolik ve genetik düzeyde açıklanabileceği görüşü mevcuttur. Genel analitik teknikler, ileri teknoloji genom dizilemeler, gen - özellik (karakter) haritalamalar, biyoinformatik ve bilgisayarlı uygulamalar ile evrimsel mühendislik ile metabolik mühendisliğin bir noktada birleşerek evrimsel mühendisliğin başlattığı nesil gelişimi çalışmalarının metabolik mühendislik ile ileri taşınabilmesi mümkündür.

Kaynaklar

- 1- **Bailey, J. E.**, (1991), Toward a science of metabolic engineering. *Science*, **252**: 1668 – 1677
- 2- **Bailey, J. E., Sburlati, A., Hatzimanikatis, V., Lee, K., Renner, W. A., Tsai, P. S.**, (2002), Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnology and Bioengineering*, **79**: 568 – 579

- 3- **Petri, R., Schmidt-Dannert, C.,** (2004), Dealing with complexity: evolutionary engineering and genome shuffling. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**: 298 – 304
- 4- **Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Gorgens, J., Van Zyl, W. H.,** (2005), Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, **4**: 31
- 5- **Koffas, M.,** (2005), Forward: Evolutionary metabolic engineering. *Metabolic Engineering*, **7**: 1 – 3
- 6- **Sauer, U.,** (2001), Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes. *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology*, **73**: 129 – 169
- 7- **Butler, P. R., Brown, M., Oliver, S. G.,** (1996), Improvement of antibiotic titers from *Streptomyces* bacteria by interactive continuous selection. *Biotechnology and Bioengineering*, **49**: 185 – 196.
- 8- **Teunissen, A., Dumortier, F., Gorwa, M.-F., Bauer, J., Tanghe, A., Loiez, A., Smet, P., Van Dijck, P., Thevelein, J. M.,** (2002), Isolation and characterization of a freeze-tolerant diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**: 4780 – 4787
- 9- **Çakar, Z. P., Seker, U., Tamerler, C., Sonderegger, M., Sauer, U.,** (2005), Evolutionary engineering of multiple-stress resistant *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, **5**: 569–578
- 10- **Sonderegger, M., Sauer, U.,** (2003), Evolutionary Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for Anaerobic Growth on Xylose. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**: 1990–1998.
- 11- **Iida, H.,** (1988), Multistress resistance of *Saccharomyces cerevisiae* is generated by insertion of retrotransposon Ty into the 5' coding region of the adenylate cyclase gene. *Molecular and Cellular Biology*, **8**: 5555 – 5560
- 12- **Blanc, V. B., Adams, J.,** (2003), Evolution in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of mutations increasing fitness in laboratory populations. *Genetics*, **165**: 975 – 983

Doç Dr. Zeynep Petek ÇAKAR

Bahtiyar YILMAZ

TANITIM

Salvador Luria (13 Ağustos 1912 – 6 Şubat 1991)



İtalyan asıllı Birleşik Amerikalı mikrobiyolog Salvador Luria, bilim dünyasına yaptığı en büyük katkısı arkadaşları Max Delbrück ve Alfred Hershey ile birlikte gerçekleştirmiş ve 1969 yılında “*Virüslerin replikasyon mekanizmaları ve genetik yapılarına ilişkin keşifleri için*” Nobel ödülüne layık görülmüştür.

Bilime yaptığı katkının yanında dünya tarihinin en önemli dönüm noktalarından birinin, İkinci Dünya Savaşı’nın, tam ortasına düşen hayat hikâyesi de bir o kadar ilginçtir.

İtalya’nın Turin kentinde dünyaya gelen Luria, aldığı tıp eğitiminin ardından bir arkadaşının iknasıyla fiziğe yönelir ve Roma’daki Enrico Fermi laboratuvarına girer. Burada Franco Rasetti’den spektroskopik dersleri aldığı sırada Rasetti, Luria’yı Delbrück’ün, genin yapısı üzerine yazdığı makaleleriyle tanıştır ve Luria bu makalelerden çok etkilenir. Bakteriyofajlarla tanışması ise tam tesadüf eseridir. Bir gün tramvayda, bakteriyolojist Geo Rita ile karşılaşır ve sohbet etmeye başlarlar.

Bu sohbetin sonunda Rita, Luria’yı, bakteriler ve fajlar üzerine çalıştığı laboratuvarına davet eder. Luria, ilgisini çeken bu konu üzerine daha çok şey öğrenmek için Berkeley üniversitesine gitmek ister ve bunun için de İtalyan Hükümeti’ne burs başvurusunda bulunur. Kabul almasının hemen ardından Mussolini iktidara gelir ve Luria Paris’e kaçar (1938). Burada Pasteur Enstitüsü’nde çalışmaya başlar. 1940’da Almanların Paris’i işgal etmesinden 2 gün önce bisikletle Marsilya’ya gider ve buradan ABD’ye, 1940’ların sonunda Delbrück’le tanışacağı ve bilim dünyası adına önemli çalışmalara imza atacağı yere kaçar...

Luria, Delbrück'le birlikte çalışırken



Kaynaklar

- 1-<http://web.mit.edu/biology/www/biology/images/luria.jpg>
- 2-Michel Morange, A History of Molecular Biology, Harvard University Press, 2000

Cemil Ozan CEYHAN

GÜNCEL

GenETİK Sorgulama

2007 yılı Eylül ayında, Amerikalı biyolog Craig Venter, İnsan Genom Projesi sonrasında yine bir ilkle akademik ve popüler yayınlarda kendinden bahsettirdi. Venter, birey olarak baştan sona gen haritasını tamamen çıkartan ilk kişi olarak tarihe geçti. Kendisinin sahibi ve yönetisi olduğu J. Craig Venter Enstitüsü'nde (Rockville, Maryland, A.B.D.) uzun bir çalışma sonucunda Venter'ın 2,810 milyar baz çiftinden oluşan genomu çözülmüş oldu ^[1]. Venter, şu anda çok maliyetli olmasına rağmen, benzer optimize edilmiş bir prosedürle tüm insanların genetik haritalarının çıkartılması gerektiğini düşünüyor. Kendi haritasını çıkartmak için 70 milyon dolar harcanmış olmasına rağmen, yakın gelecekte gelişmiş ülkelerde ortalama gelir düzeyinde bireylerin, doğumdan önce bile gen haritalarını çıkartabilecekleri bir gerçek ^[2].

Venter'ın gerçekleştirdiği ve gen haritasıyla ulaşılabilecek amaç, bireyin zayıf ve güçlü yönlerini öğrenmesi, gelecekte ortaya çıkabilecek rahatsızlıklara karşı tedbirli olması ve erken teşhişin önemli olduğu hastalıklara karşı tetikte olmasının sağlanmasıdır. Görünürde hiçbir sorun olmamasına rağmen, gen haritası çıkartılmasının ucuz ve kolay olduğu günlerde, bireyi ve kurumları birçok sorunla karşı karşıya bırakacak senaryolar şimdiden tartışılıyor. Örneğin, sigorta şirketlerinin hastalığı belli kişileri sigortalamaması ya da bu hastalığın sigorta dışı tutulması gibi durumlar, gelecekte genetik haritası bilinen bir kişinin sigorta hizmetlerinden yararlanmasında kişi açısından olumsuz bir faktör olarak yer alabilecektir. Genomu belirli bir kansere yakalanma riskinin yüksek olduğunu gösteren bireyin tedavi masraflarının karşılanmaması gibi durumlarda uygulanması gerekenler hakkında etik

değerlendirmelerin yapılması ve yasal mevzuatın en kısa sürede hazırlanması gerekmektedir.

Gen haritası çıkartacak yerlerin denetlenmesi ve bireyin genetik materyalini inceleme, genomunu açıklama hakkına sahip kişilerin belirlenmesi ile ilgili yasal prosedürlerin gelişmiş ülkelerde şimdiden hazırlanmaya başlandığı biliniyor; fakat haklar ve sorumluluklar yanında, psikolojik etkilerin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir. Gen haritasını çıkartan bireyin, ölümcül ya da tedavi edilmesi mümkün olmayan Alzheimer gibi hastalıklara yakalanma riski olduğunu öğrenmesi kendisinin ve çevresinin psikolojik sorunlarla karşı karşıya kalmasına sebep olabilecektir ^[2].

Tüm bunların yanında en ufak bir saç kökü örneğinden bile DNA analizinin yapılabileceği düşünülürse, kişinin genetik haritasının yanlış ellere geçmesinin sonuçları tahmin bile edilemez. Belirli genetik belirleyicilerin (marker) bulunduğu bireylere ölümcül olabilecek biyolojik silahlar da dahil olmak üzere birçok olumsuz senaryo şimdiden komplo teorisyenlerinin ilgisini çekmektedir. Yine de, kişiye özel ilaçlar, uygun yaşam biçimi, bireyselleştirilmiş tedavi yöntemleri gibi birçok olumlu getirisiyle gen haritası çıkartma işleminin doğum öncesi bile uygulanabilecek rutin bir işleme dönüşmesi çok yakın bir zamanda mümkün gibi görünüyor. Önemli olan kontrol mekanizmaları oluşturulmuş bir sistemin, güvenilir ve çoğunluk tarafından ulaşılabilir hale getirilmesi ve böylece yaşam kalitesinin ve süresinin uzatılabilmesidir.

Eylül 2007'den günümüze kadar geçen sürede James Watson, Yang Huangming ve son olarak Aralık 2008 itibarıyla Kim Seong-jin'in genomu deşifre edildi ^[3]. Kim Seong-jin'in gen haritasının çıkarılması yaklaşık olarak 700,000 dolara mal oldu ve sekiz ay sürdü ^[3]. Aralarında

uzun bir süre olmamasına rağmen Craig Venter'la karşılaştırıldığında maliyet açısından %99 oranında düşüş gözlemlenmesi, gen haritası çıkartma işleminin birkaç bin dolar ile gerçekleştirileceği günlerin yakın olduğunu gösteriyor. Bu durumda en kısa zamanda yapılması gereken, bilimin öncülüğünde ve toplumsal konsensüse ulaşma amacını koruyarak, konuyla ilgili yasal altyapının gerçekleştirilmesi ve bireyin çıkarlarının gözetileceği bir sistemin oluşturulmasıdır.

Kaynaklar

- 1- "Technology Review: Craig Venter's Genome". 04/09/2007. 10/02/2008.
<http://www.technologyreview.com/Biotech/19328/>
- 2- Şenel, Ferda. "Geleceğimizi Bilmek". Bilim ve Teknik. Şubat 2008.
- 3- "First Korean Genome Mapped". 05/12/2008. 06/07/2009.
<http://english.chosun.com/w21data/html/news/200812/200812050003.html>

H. Kaya AKYÜZ

KÖŞE YAZILARI

Kök Hücre

Tarih boyunca insanlar, hastalıklara çare bulmaya ve ömürlerini uzatmaya çalıştılar. Binlerce yıldan beri çeşitli bitkilerden ilaç yapıp hastalıkları tedavi etmeye çalışmışlardır. Eski Mısır anıt ve hiyerogliflerinde insanların hastalıklı organları değiştirdiğini gösteren resimler vardır. Babilliler'in M.Ö. 1700'lü yıllarda, bıçak kullanarak ameliyat yaptıklarına ait bilgiler mevcuttur. Görülüyor ki, insanoğlu geçmişten günümüze hep hastalıkları yenmeye uğraşmış ve daha uzun yaşamının formüllerini aramıştır. Belki de bu ölümsüzlüğe ulaşma isteği tıp biliminin bugünkü seviyeye gelmesinde önemli bir etken olmuştur. Bu alanda geline son nokta; genetik şifrenin ve hücre davranışlarının daha iyi anlaşılmasıyla, insanların bir hücresi kullanılarak deri, kemik, kalp kası gibi çeşitli dokular üretilebilmesidir. Bu sayede birçok hastalığa çözüm getirilmesi amaçlanıyor [1].

Farklı özellikteki hücelere dönüşebilme ve kendisini yüksek oranda yenileyebilme yeteneğine sahip hücelere kök hücre denir [1]. Kök hücreler insan vücudunu oluşturan 200 kadar hücre çeşidine farklılaşma özelliğine sahiptir [2]. Bu özelliği sayesinde kök hücreler tıpta devrim yaratabilecek düzeydedir [2]. Kök hücreler aldıkları sinyallere göre farklı hücre tiplerine dönüşebilmektedir. Farklılaşma sırasında bazı genler aktif hale gelirlerken bazıları baskılanmaktadır. Laboratuvar ortamında kök hücreler istenilen hücre tiplerine dönüştürülebilmektedir. Tüm organizmayı oluşturma yeteneğine sahip ya da tüm hücre tiplerine dönüşebilen kök hücreler, insan gelişiminin ilk aşamasındaki hücrelerden elde edilebilmektedir. Biraz daha özelleşmiş ve tüm hücre tiplerine dönüşemeyenler ise çocuklarda ve erişkinlerde bulunabiliyor. Örnek olarak, kemik

iliğindeki kan kök hücreleri verilebilir. Bu kök hücreler, yetişkinlerin kemik iliğinde mevcuttur. Kan kök hücreleri, vücutta kan hücrelerine dönüşebilirken, laboratuvarında gerekli ortam ve sinyaller sağlandığında sinir hücresi gibi hücelere dönüştürülebiliyorlar. Kök hücrelerin, embriyonik kök hücreler, fetus kök hücreleri, erişkin kök hücreleri ve kordon kanı kök hücreleri çeşitleri vardır [1].

Döllenmiş yumurta olan zigotun gelişiminin 5. gününde oluşan hücre topluluğuna blastosit denir. Bu topluluktan alınan her bir hücreye de embriyonik kök hücre denir [1]. Minger ve ekibi 2003 yılında İngiltere'de ilk insan embriyonik kök hücresi kolonisini çoğaltmışlardır [2]. Fetus kök hücreleri, düşük sebebiyle veya çeşitli sakatlıklar nedeniyle gebeliğe son verilip alınan fetüslerden elde edilmektedir. Bu hücreler, gerekli koşullar sağlandığında çeşitli dokulara dönüşebilmekte ancak, yeni bir birey oluşturmamaktadır. Erişkin kök hücrelerse, farklılaşmış dokularda bulunan farklılaşmamış hücrelerdir. Her yaştan her insanda bulunabilen bu hücreler; ihtiyaç duyulduğunda bulundukları dokudaki değişik hücre türlerine dönüşebilmektedir. Bu hücreler; kemik iliği, kas, göz, sinir, karaciğer ve deri gibi dokularda bulunabilmektedir [1]. Kordon kanı; kemik iliği gibi alyuvarları, akyuvarları ve dolaşım ve bağışıklık sistemindeki diğer unsurları üretebilen kök hücre kaynağıdır. Kemik iliği ve kordon kanı kök hücreleri insan kemiklerinde kalıcı bir yer edinip insan yaşamı için önemli hücre çeşitlerini üretebilmektedir. Kordon kanından elde edilen kök hücrelerin nakli, 1988 yılından beri gerçekleştirilebilmektedir [2].

Kök hücreler kullanılarak Parkinson, Alzheimer, kanser, organ yetmezliği gibi

hastalıkları tedavi etmek amaçlanmaktadır. Bu hastalıklar tam olarak tedavi edildiği takdirde insan ömrünün uzayacağı düşünülmektedir. İnsandan alınan tek bir hücrenin DNA'sı, embriyodan alınan kök hücrenin DNA'sı ile değiştirilip kişiyle aynı genetik bilgiye sahip istenilen tür doku elde edilebilecektir [1]. Bunun yanında kök hücreler kullanılarak hasarlı organların tamamı değiştirilmeden sadece bozuk hücreleri yeni kök hücrelerle değiştirip tedavi etmek mümkündür. Kalp krizi geçirerek kalp kasları zarar gören bir hastaya, kök hücrelerden üretilen sağlıklı kalp kası hücreleri damardan enjekte edilerek kalbin onarılması sağlanabilmektedir [1]. Bir hastanın kalçasından alınan erişkin kök hücreler hasta kalbinin tamirine yardımcı olmuştur. Hücrelerin kalp hücrelerine dönüşüp dönüşmediği belli değildir; ama varlıklarının, onarımı desteklediği bir gerçektir [2]. Kök hücreler kendini tamir edemeyen sinir hücreleri yerine geçerek sinir sistemini tamir edebilmektedir. Kopan sinir liflerini kök hücreler aracılığıyla bağlayıp düzeltmek mümkündür. Bu sayede Alzheimer, Parkinson, felç gibi sinir sistemi bozukluklarından kaynaklanan hastalıkların tedavi edilmesi amaçlanmaktadır [1].

Devrimler sırasında çoğu zaman bir kargaşa ortamı hakim olur. 1998 yılında James Thomson üreme sağlığı kliniklerinden aldığı embriyoları kullanarak, embriyonik kök hücre keşfini yapmıştır. Bu keşifle ortaya çıkan en önemli sorular, gerekli embriyoların nereden sağlanacağı ve araştırmacıların kaç embriyoya zarar vereceğidir.

Bizi meydana getiren ve ilk hücremiz olan zigotun da toplumun tüm bireyleriyle aynı haklara sahip olduğu düşüncesi mevcuttur. Bu düşünceye paralel olarak, embriyolardan kök hücre alınması yamyamlık olarak görülmektedir. Embriyonik kök hücre uygulamalarının artmasıyla her yerin embriyo çiftlikleri ve klonlama fabrikaları ile dolup

taşacağı iddia edilmektedir. Bu nedenle kök hücre çalışmalarının yalnızca gelişmiş kök hücreler kullanılarak yapılması istenmektedir. Bu görüşlere katılmayıp tersini savunanlar ise, embriyonik kök hücreler, tüm hücre çeşitlerine dönüşebilirken, erişkin kök hücrelerin bu açıdan yetersiz olduklarını söylemektedirler. Üreme sağlığı kliniklerindeki derin dondurucularda istenmeyen ve atılmasına karar verilen embriyoların sayısı hızla artmaktadır. Bu embriyoların bağışlanması şartıyla, insanları hastalıktan kurtarmak amacıyla kullanılmasının etik olabileceği savunulmaktadır. Örnek olarak; yapay dölleme sonucunda fazla embriyolarını kök hücre araştırmalarına bağışlayan bir anne olan Marie Dooley: "Kalpleri atsaydı, o zaman durum çok farklı olurdu. Ama embriyolar hücre yumağından başka bir şey değil ve bilimin ilerlemesi için kullanılabilecekken onları çöpe atamam." diyor. Dooley üç çocuğundan ikisine yapay dölleme yöntemiyle hamile kaldı ve fazla embriyolarını Harvard'a bağışlayarak tarihe geçti. Embriyonik kök hücre çalışmalarında karşılaşılan diğer bir sorun ise; embriyonik bir hücrenin istenilen doku ya da organ yerine tümör ve istenmeyen doku çeşitlerine dönüşme ihtimalidir. Kök hücre araştırmacıları bu sorunla nadiren karşılaştığını ve önleme konusunda önemli gelişmeler gerçekleştirdiklerini söylemektedirler. Bu konudaki tartışmalar olanca hızıyla devam etmektedir. Dünyaya baktığımızda bu konuyla ilgili farklı görüşler ve kararlar vardır. Almanya'da çalışmaların etik olmayan boyutlara ulaşabileceği endişesi nedeniyle, kök hücre araştırmalarının bazı tiplerine yasaklamalar getirilmiştir. Amerika'da, hükümetin verdiği desteğe sınırlama getirilmiştir. İngiltere, Çin, Kore ve Singapur'da ise; çalışmalar etik açıdan denetlenerek desteklenmekte ve kök hücre araştırmalarının merkez üsleri olmak amaçlanmaktadır. Avusturya ve İrlanda gibi birçok ülkede de embriyo araştırmalarına tamamen karşı çıkmaktadır. İngiltere'de embriyonik kök hücre araştırmaları, İnsan Üremesi ve Embriyoloji

Araştırmaları Birimi tarafından denetlenmektedir. Bu kurul, kapalı kapılar ardında, yapılan embriyo ile ilgili araştırma başvurularını değerlendirmektedir. Bilim insanlarının, etik bilimcilerin, avukatların ve din görevlilerinin oluşturduğu kurul, konunun uzmanı olmayan kişilerden oluşmaktadır [2].

Kök hücre teknolojisi ile ilgili olarak her dinde farklı görüşler hakimdir. 2002 yılında Raelian dini mezhebi ilk insanın kopyalandığını iddia etmiştir. Bu iddia bilimsel olarak destek bulmasa da dünya üzerinde geniş yankı uyandırmıştır. Özellikle de çoğu Avrupa ülkesindeki Hristiyan kiliselerini etkileyen bu olay sonucunda, birçok Hristiyan kilisesi insan kopyalanmasını ve embriyonik kök hücre çalışmalarını yasaklamıştır. Tanrısal dinlerin çoğu klonlamaya kesinlikle karşılar; çünkü hayatın tanrının bir hediyesi olduğunu düşünüyorlar. Çoğu inanç böyle olsa da Budist Güney Kore gibi bu teknolojiye sıcak bakan ülkeler de vardır. İnsan klonlama ve kök hücre teknolojisiyle ilgili kesin olarak cevaplanamayan birçok soru vardır: Embriyo insan statüsünde mi? Embriyonun yok edilmesi bir cinayet mi? Klonlama aile ilişkilerini bozacak mı? Klonlama Tanrı'nın işine karışmak mıdır? Katolik kilisesi klonlamaya ve insan embriyonik kök hücresi üretimine karşı çıkanların başında gelmektedir. Onların yasaklayıcı tutumu 1987'de inanç öğretisi amacıyla çıkan bir yayına dayanmaktadır. Bu yayına göre yumurta döllendiği andan itibaren insan statüsünde sayılmaktadır.

Ortaçağ Kilisesi, Aristo öğretisini benimsemişti. Aristo'ya göre bir embriyo insan formuna büründüğünde ruha sahip olabiliyor. Buna göre ortaçağda kürtaj, cinayet gibi ağır günah sayılmak yerine daha az günah sayılıyordu. 1869'da Papa 9. Pius'ın yumurtanın döllenmesiyle beraber insan statüsüne kavuştuğu görüşünü belirtmesiyle Aristo'nun görüşünden vazgeçildi. Bu görüşü

benimseyen Katolik Kilisesi'ne göre embriyoya verilen zarar bir cinayetle aynı seviyededir ve doğal olarak meydana gelen embriyo ile yapay olarak üretilen embriyoların arasında hiçbir fark olmadığını düşünmektedirler. Bunun yanında çoğu Hristiyan lider de embriyo ile ilgili çalışmalara karşıdır. Dinlerin çoğunda yaşamın tanrının bir hediyesi olduğu düşünüldüğünden bu teknolojinin tanrının yaratma gücünü gasp edeceği savunulmaktadır [3]. Bunun yanında farklı görüşte olan Katolikler de vardır. Bu görüşe göre, eğer bir tedavi insanlara yardım edebilecekse, hükümetin ve kilisenin görevi bunu yasaklamak değildir[2]. Tek tanrılı dinlerden farklı olarak Budizm'de bu konuda farklı görüşler savunulmaktadır. Genel olarak klonlamanın herhangi bir tehdidinin olmadığını düşünmektedirler. İslam Dini'ne göre de insanı tedavi edici amaçlı yapılan uygulamalara saygı duyulmaktadır. Müslüman bilginler, kök hücre teknolojisini ve klonlamayı Kuran-ı Kerim'e göre değerlendirmektedirler. Vatikan gibi bir merkezlerinin olmaması nedeniyle bu konuda farklı etik yaklaşımlar bulunmaktadır. Müslüman bilim adamlarına göre embriyo döllenmeden 120 gün sonra ruh kazanmaktadır. Kök hücre çalışmaları İslami kurallara ters düşmemektedir. İslam'da aile ilişkilerinin önemli bir yeri olduğundan klonlamanın aile ilişkilerini bozacağı endişesi mevcuttur. Bu nedenle klonlamaya pek sıcak bakılmamaktadır. Ancak, kısır çiftlere yardım amaçlı yapılan uygulamalara izin vermektedirler. Bu farklı din görüşleri nedeniyle bu konuda fikir birliğine ulaşmanın zor olduğu açıktır[3].

İnsan embriyonik kök hücre çalışmaları tıp açısından çok büyük öneme sahiptir; ancak konuyla ilgili farklı kültürel, politik, yasal ve dinsel bakış açıları olması nedeniyle, uluslararası bir iş birliği yapılamıyor. Bu konuda ortak bir fikir oluşturmak amacıyla, uluslararası sosyal kök hücre araştırma kurulu oluşturuldu. 14 farklı ülkeden bilim adamlarının, etikçilerin ve hukuk

uzmanlarının oluşturduğu kurul, Şubat 2007’de kök hücre araştırmaları hakkında yönerge hazırladı.

Bu yönergedeki maddelerin birkaçı:

- Yapılan hiçbir deney etik açıdan problem yaratmamalıdır.
- İnsan embriyosunun laboratuvar kültürü çalışması 14 günü aşmamalıdır.
- Hayvanları genetik açıdan karıştırarak üretme çalışmalarında insan gametleri kullanılmamalıdır.

Maddelerde yer alan 14 günlük limit, ilk olarak 1984 yılında İngiltere’deki Warnock komitesi tarafından belirlenmiştir ^[4].

2004 yılında Türkiye’de embriyonik kök hücre araştırmalarının düzenlenmesiyle ilgili ilk olarak “Kök Hücre Araştırmalarında Güncel Kavramlar” adlı rapor Türkiye Bilimler Akademisi (TÜBA) tarafından hazırlandı. Raporda kök hücre konusunda yasal düzenlemelerin bir an önce yapılması öngörülmektedir ^[5]. Eylül 2005’te Sağlık Bakanlığı’ndan yayımlanan genelgeye göre; embriyonik kök hücre araştırmaları konusuyla ilgili hukuksal düzenlemeler sürdüğünden, çalışmalar bitene kadar embriyonik kök hücre araştırmaları yasaklanmıştır ^[6].

İnsan embriyo kök hücresi çalışmaları ABD gibi gelişmiş ülkelerde önlenmeye çalışılmasına rağmen; İsveç, İsrail ve Güney Kore gibi ülkelerde çalışmalar hızla sürmektedir. Bu nedenle, dünya üzerinde iki kutuplu bir anlayış oluşmuştur; bir tarafta bu çalışmalara sıcak bakanlar, diğer tarafta sınırlandırılmasını isteyenler... ^[6].

Kaynaklar

- 1- **Şenel, F.** (2002). Kök Hücreler. *Bilim Teknik*. Yeni Ufuklara Eki. s: 2-15.
- 2- **Weiss, R.** (Temmuz 2005). Kök Hücre. *National Geographic*. s. 65-91
- 3- **Frazzetto, G.** (2004). Embryos, cells and God. *Science*. Alınma Tarihi 25 Nisan 2007. Web Adresi: <http://www.sciencemag.org>
- 4- **Daley G. & Lars A.** (2 Şubat 2007). The ISSCR Guidelines for Human Embryonic Stem Cell Research. *Science*. Alınma Tarihi: 6 Nisan 2007. Web Adresi: <http://www.sciencemag.org>
- 5- **Akdağ, R.** (19 Eylül 2005). Sağlık Bakanlığı Genelgesi. Web Adresi: <http://www.saglik.gov.tr/TR/BelgeGoster.aspx?F6E10F8892433CFF7A2395174CFB32E164B5516ED5B497B2>
- 6- **Aydın, E.** (2005). Kök hücre çalışmalarında etik. *Hacettepe Tıp Dergisi*. sayı:36. s. 202

Caner NAZLI

KANSERDE GEN TERAPİ

Gen Terapi Nedir?

Genetik materyalin vektör kullanılarak hücre zarından geçmesini ve daha sonra çekirdeğe taşınıp orada replike olmasını amaçlayan, bazı genetik hastalıkların tedavisinde kullanılan bir yöntemdir. Gen terapisi hastalıklarla mücadele etmek için tıbbın üzerinde çalıştığı yeni bir yöntemdir. Temel prensibi iyileştirici proteinlerin üretilmesini sağlamak olduğundan hasta kişinin genleri o şekilde programlanıyor. Gen terapisi denilince ilk aklı gelen, ölümcül hastalıkları ve çeşitli bedensel sakatlıkları iyileştirmek olduğu halde hastalıklardan korunmak da, gen terapisi ile mümkün olacağı öngörülen hedeflerden biri. Gen terapisini laboratuvarlarda insanlar üzerinde uyguladığımızda insan yaşamının ne şekilde değişebileceği hakkında bazı şeyler görüyoruz [1].

Gen terapisini geliştirmek için en önemli unsur, hastalıkların genetik temelini kavramak. Genler, bize anne ve babamızdan aldığımız özellikleri taşıyor. Doğal olarak bazı hastalıkların da bu şekilde genler tarafından kuşaktan kuşağa aktarıldığını görüyoruz. İnsan vücudunda yaklaşık olarak 29,000 farklı gen bulunmaktadır. Bütün bu genleri tanımlamak için başlatılan İnsan Genom Projesi geçtiğimiz yıllarda tamamlandı. Böylece pek çok hastalık için gen terapisinin uygulanması mümkün oldu ve hastalıkların genetik köklerinde durdurulması için çalışmalar başladı.

Şu anda yapılan iki çeşit gen terapisi var: Birincisi "somatik gen terapisi". Buradaki amaç, hücrelerdeki genetik ifadeyi değiştirerek hastalıkları tedavi edici özellikler yaratmak [2]. İkincisi ise "Germline Gen Terapisi". Bu metot, kalıtsal olarak aktarılan hücre çekirdeklerinin tamamen değiştirilmesi mantığına dayanıyor. Şunu belirtmeliyiz ki bu iki yöntemde de önemli olan değiştirilmiş genetik materyali hastanın doğru hücresine emin bir şekilde yerleştirebilmek. Buradaki en ufak bir hata hastanın olumlu yerine olumsuz şekilde etkilenmesiyle sonuçlanabilir [3].

Kanserde gen terapi

Günümüzde en yaygın görülen hastalıklardan olan kanser üzerine gen terapi yöntemleri geliştirilmiştir. Kanserın ortaya çıkmasında pek çok faktör bir araya gelmektedir ve bu durum gen terapisinin son yıllarda kanser üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur.

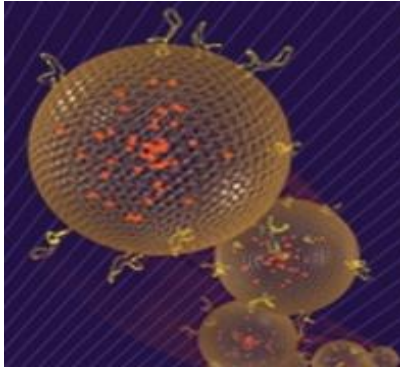
Konuya biraz daha moleküler düzeyde bakarsak kanserdeki gen terapinin 3 temel hedefi vardır: Mutasyona uğramış DNA tamir genlerini düzeltme, hücre bölünme döngüsündeki checkpoint genlerinin kontrolünü sağlama ve karsinogeneze (normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesi) yol açan bazı proteinlerin ekspresyonunu engelleme. Bu olaylar için bazı yöntemler vardır. "Gen transplantasyonu", gen delesyonlu hastalar üzerinde, "gen düzeltme", ilgili genin spesifik mutasyonunun düzeltilmesi hastalar üzerinde ve "gen ekspresyonunu artırmak", ilgili genin ekspresyonunun artması gereken hastalar üzerinde uygulanmaktadır [4].

Genlerin vücuda verilmesi için vektör denilen özel taşıyıcılar kullanılır. Bu taşıyıcılar, ihtiyaç duyulan proteinleri kodlayan genlerini barındıran bir çeşit kapsül olarak tanımlanabilir. Peki, niçin vektörler kullanılıyor? İlk olarak vektörler, hedef DNA'yı hücre içinden çekirdek içine koruyarak taşıyabilmektedirler. Bunun yanında genin ilgili olduğu bölgeyi regüle edecek özelliğe sahiplerdir. Minimal toksik etki göstermesinin (özgül hücreye hedef geni taşıyabilme) yanısıra kolay kullanılabilir ve düşük maliyetli olması, geniş kullanım alanının olması bu seçimi açıklayan sebeplerden birkaçı. Kanserde iki ana grupta toplanan vektörler kullanılıyor [5].

Viral vektörler: Retrovirüsler, Onkolitik virüsler, Adenovirüsler, Adeno-associated virüsler.

Non-viral vektörler: Plazmidler, Lipozomlar, Moleküler konjugatlar, Mikro-enjeksiyon, Elektroporasyon, Nanopartiküller (altın, gümüş...)

Lipozom, belirli oranda akışkanı çevreleyen çift katlı lipit tabakadır. DNA sahip olduğu yükten dolayı katyonik lipozomların dış yüzeyine kendiliğinden tutunabilmektedir ve hücre zarı ile etkileşmektedir. Lipozomlar transfeksiyon oranını arttırarak güvenli bir şekilde genleri paketler. İlk gen terapi çalışması 1992’de katyonik lipozomlar kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışmada 3betakolesterol/DOPE katyonik lipozomu kullanılarak ilgili gen hücreye taşınmıştır. Lipozomlar aracılığıyla genlerin taşınmasının avantajları incelendiğinde, virüslere göre daha ucuz olduğu, immün cevabın olmadığı, katyonik



lipozomların tümör hücrelerine doğrudan gen aktarımında güvenli ve etkin olduğu ve ayrıca kistik

fibrozis hastalığı için iyi bir vektör olduğu görülür [6].

Retroviral vektörler kanser için bir numara

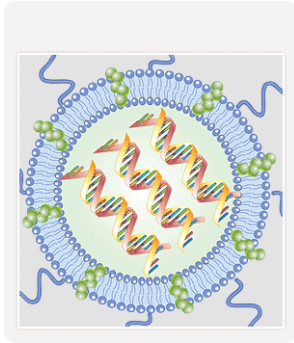
Sık kullanılan viral vektörlerden birincisi retrovirüslerdir. Retrovirüslerde dsDNA kopyaları RNA genomuna yerleşir. Genoma entegre olur. Örneğin; HIV, gen transferinde etkin bir vektördür, özellikle bölünen hücreleri enfekte eder. Adenovirüsler ise dsDNA içeren üst solunum yolu epitelin enfekte ederler; fakat kendi DNA’sı konağın DNA’sına entegre olmaz. Günümüzde etkin bir vektör olmasına rağmen, konak canlıda bağışıklık sistemine toksik etkileri en büyük dezavantajdır. Retroviral virüsler bölünen hücrelerde çekirdek zarlarının yıkılmasını, sonra viral genomun içeri girip kromozomların içine entegre olmasını sağlar. Bu nedenle kanser gen terapisi için iyi bir vektördür [7].

Gen Transferi Metotları

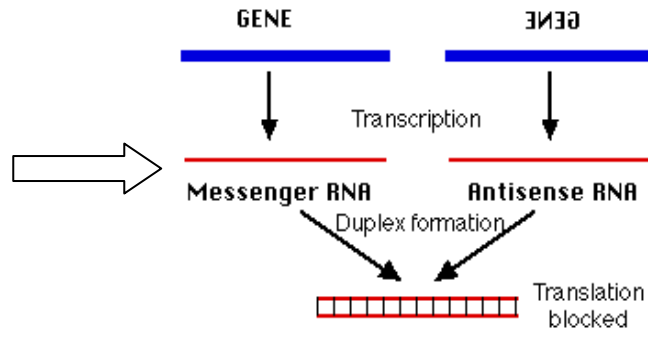
Gen transferi için *in vivo* ve *ex vivo* olmak üzere iki metot vardır. *In vivo* gen transferinde vektörle taşınan DNA doğrudan hastaya aktarılır. Daha az rastgele süreç içerir ve küçük özellikler kontrol edilebilir; bunun sonucunda bazı manipülasyonların uygulanması için *in vivo* tercih edilir. *Ex vivo* gen transferinde ise hastadan alınan hedef hücreye genin aktarılması, vektörlü genin alınan hücrelere maruz kalması, transgenik hücrelere genin aktarılması marker olarak kullanılması, genetik olarak düzeltilmiş hücrelerin hastalara yeniden tanıtılması (immünomodülasyon) gibi işlemler uygulanır [8].

Peki gen terapi kanserde neler için kullanılmalı?

- Gen terapi onkogenik proteinlerin ekspresyonunu bloke etmeli.



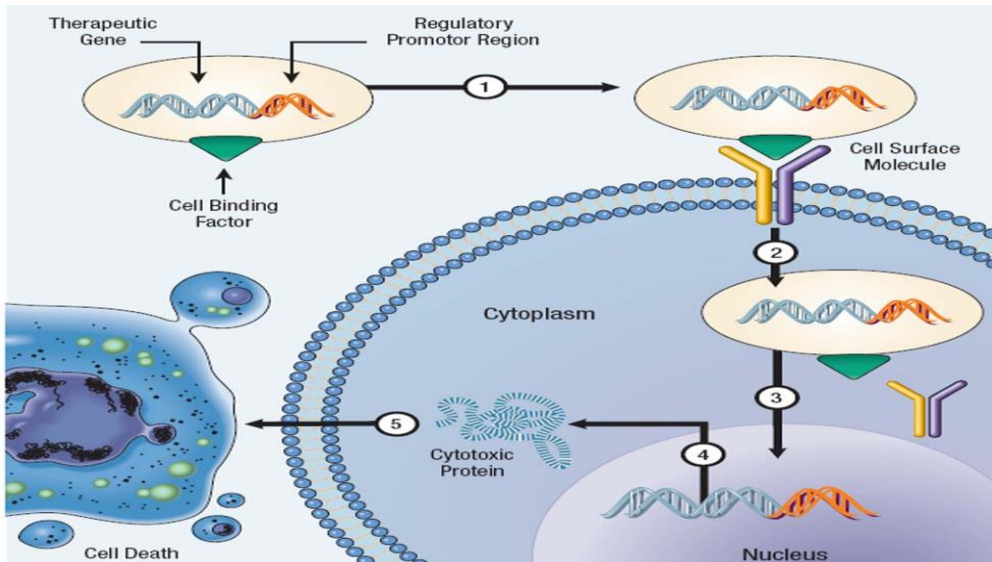
Lipozom [9]



K-ras, *c-myc*, veya *bcl-2* ekspresyonunun

(translasyonunun) bloke edilmesi [10]

- Gen terapi kemoterapinin etkisini artırmak için kullanılmalı.



Vektör ile verilen terapeutik bir genin kanser hücrenin apoptozuna yol açması [11]

- Gen terapi genellikle tümör-supressör genlerin normal fonksiyonlarını yeniden düzenlemek için kullanılmalı.



Hasarlı DNA'daki p53 geninin yeniden aktivasyonu ile kanserli hücrenin apoptozuna yol açması ^[12]

Gen terapinin geleceği

Gen terapinin geleceği gen transferinde bulunacak güvenli, etkin ve spesifik kanser hücrelerine seçici olan vektör geliştirilmesinde yatmaktadır. Bu alanda çalışmalar devam etmekte olup *in vivo* ve *in vitro* kullanılacak yeni vektör arayışları sürmektedir. Bununla beraber, epigenetik modifikasyonların ve antisense teknolojisinin de onkogenlerin etkilerini ortadan kaldırılabildiği gözlemlenmiştir. Bazı ilaçların tasarımı bu teknolojilerin mekanizmalarına göre tasarlandığında tümör dokusunda küçülmelerin

olduğu son yapılan çalışmalarda gözlemlenmiştir. Gen terapinin yeri ise biraz daha farklıdır. Spesifik uygulamalarla kanserin etkisinin ortadan kalkabileceği bir yöntem olan gen terapisi genetik biliminin altın buluşlarından biridir. Geleceğin ilaç tedavisi artık genlerle olacaktır. Gen mühendisliğindeki, biyoinformatikteki ve moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde kanser-spesifik gen terapisinin uygulanabilirliği üzerinde çalışılmaktadır...

Kaynaklar

- 1- “Gene therapy”. (tarih yok). Bu kaynak, http://www.oml.gov/sci/techresources/Human_Genome/medicine/genetherapy.shtml adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.
- 2- **Kinnon, C. & Levinsky, R. J.** (1990, Ocak). Somatic gene therapy for genetic disease. Archives of disease in childhood, Vol. 65 (1); 72-73.
- 3- “Germline gene therapy”. (tarih yok). Bu kaynak, <http://www.ess.uda.edu/huge/germdef.html> adresinden Eylül 2008 de alınmıştır. UCLA Program on Science Technology and Society.
- 4- **Curiel, D. T. & Douglas, J. T.** (2005). Cancer Gene Therapy. Humana Press. Totowa, New Jersey.
- 5- “Virus vectors & Gene therapy”. (tarih yok). Bu kaynak, <http://www.microbiologybytes.com/virology/peel/peel1.html> adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.
- 6- **Ewert ve arkadaşları.** (2004, Ocak). Cationic lipid-DNA complexes for gene therapy: understanding the relationship between complex structure and gene delivery pathways at the molecular level. Curr Med Chem. Vol. 11 (2): 133-149.
- 7- **Miller, A. D., Miller, D. G., Garcia, J. V. & Lynch, C. M.** (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. Methods in enzymology, Vol. 217, pp. 581-599.
- 8- **Lu, Z. & Ghazizadeh, S.** (2007). Loss of Transgene following ex vivo Gene Transfer is Associated with a Dominant Th2 Response: Implications for Cutaneous Gene Therapy. Molecular Therapy, Vol. 15 (5): 954-961.
- 9- “Alnylam Pharmaceuticals: RNA interference”. (tarih yok). Bu kaynak, http://www.alnylam.com/mai_primer/ma-interference-pg9.htm adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.
- 10- “Antisense RNA”. (tarih yok). Bu kaynak, <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/A/AntisenseRNA.html> adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.
- 11- “Transcriptionally Targeted Gene Therapy for Small Cell Lung Cancer”. (tarih yok). Bu kaynak, http://www.tuxenblog.com/?page_id=12 adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.
- 12- “Apoptosis activation as a therapeutic strategy for cancer”. (tarih yok). Bu kaynak, <http://www.researchapoptosis.com/apoptosis/introduction/cancer/index.m> adresinden Eylül 2008 de alınmıştır.

Emrah İlker ÖZAY

TRANSFEKSİYON - İlaç Biyoteknolojisinde Gelecek Vaat Edici Adımlar

“Biyoteknoloji ile üretilen ilaçlar dünya ilaç sektörünün %10-20’sini kapsayan bir pazara sahip. Önümüzdeki birkaç yıl içerisinde, ilerleyen üretim teknikleriyle bu oranın %50’yi aşması bekleniyor. Lisanslı PEI (polyethyleneimine) gibi kimyasal olarak tanımlanmış transfeksiyon ajanları sayesinde üreticiler yüksek kalitede ürün elde edebilecekler.”

Jeanne Francoise Williamson

Pharmaceutical Technology Europe

1 Temmuz 2008

Transfeksiyon; DNA, mRNA, siRNA, miRNA, shRNA, protein ve antikor gibi moleküllerin ökaryotik hücre içine gönderilmesidir. Gen fonksiyonu, sinyalleşme yolları ve regülasyon mekanizmalarına ışık tutan transfeksiyon çalışmaları “gen terapisi”, “DNA aşısı” ve “RNA terapisi” alanlarında gelişmeleri tetikliyor.

Gen terapisi belli bir dokunun hücrelerine, hastalığı iyileştirmek amacıyla genellikle virüsler aracılığıyla fonksiyonel DNA gönderilmesi anlamına geliyor. Virüslerle yapılan araştırmalarda karşılaşılan en önemli sorun dışarıdan verilen DNA parçasının onkogenik etki yaratması (SCID-x1 gen terapisinde lösemiye neden olması gibi) ya da immün tepkiye neden olması. Virüsler kadar etkili olmasa da katyonik lipidlerin ve katyonik polimerlerin (PEI gibi) vektör olarak kullanıldığı transfeksiyon metotları da mevcut.

DNA aşısı, son yıllarda önem kazanan ve tedaviden çok koruma amaçlı kullanılabilecek bir yöntem. Hastalığın antijenini kodlayan DNA

parçasının hastada *in situ* üretilmesi şeklinde uygulanıyor. Bu yöntem geleneksel aşı üretimini devre dışı bırakabilir; fakat aşırı protein ekspresyonu tehlikesi bulunmaktadır.

RNA terapisi, hücre içine gönderilen siRNA ya da shRNA gibi nükleik asitlerin gen ekspresyonunu durdurma özelliklerini kullanarak nörodejeneratif hastalıklar, viral enfeksiyonlar ve kanserin tedavisini amaçlıyor. Verilen moleküllerin tam hedeflerinin belirlenememesi ise RNA terapisi araştırmalarında üstesinden gelinmeye çalışılan en önemli sorun olmakta.

Biyoteknoloji ve ilaç şirketlerinin ortak atılımlarıyla bu araştırmaların klinikte uygulanmaya başlanması hedefleniyor. Klinik öncesi denemelerde ürünlerin saflaştırılması ve kalite kontrolü gibi endüstriyi ilgilendiren yönleri de incelenerek GMP (Good Manufacturing Procedures) kurallarına uygun proseslerin geliştirilmesi için adımlar atılıyor.

Nükleik asit terapisinin dünyadaki pazar payı %67 ile ABD, %27 ile Avrupa’da. Uzakdoğu ve Asya’nın şimdilik katkısı %3 oranında. Önümüzdeki senelerde araştırmaların klinik uygulamalara geçişi hızlandıkça ve yeni üretim teknikleri geliştikçe birçok insan transfeksiyon temelli gen tedavisi ile sağlığına kavuşabilecek.

Kaynak

- 1- Advances and perspectives in intracellular biomolecule delivery. (tarih yok). Bu kaynak <http://www.ptemag.com/pharmtech/europe/article/articleDetail.jsp?id=525671&pageID=1&sk=&date=> adresinden Eylül 2008’de alınmıştır.

Özge Deniz BOZKURT

DERLEME

Cyto Grubu

Hücre iskeleti üzerine yaptıkları çalışmalardan dolayı **Cyto** adını alan araştırma grubu Doç. Dr. Arzu Karabay Korkmaz başkanlığında çalışmalarını sürdürmektedir. Doktora öğrencileri Meray Akkor, Güney Akbalık, Şirin Korulu, Ayşegül Yıldız, Ayşegül Dilsizoğlu, ve yüksek lisans öğrencisi Duygu Esen ise grubun üyelerini oluşturmaktadır. Grup üyelerinin ilgilendikleri çalışma alanları ise şunlardır;

- Meray Akkor - Nöron farklılaşması ve yaşamı ile ilgili moleküler mekanizmalar, mikrotübül bölme proteinleri: Katanin ve spastin, mikrotübül bağımlı proteinler.
- Şirin Korulu - Mikrotübül bölünmesinin düzenlenmesi, mikrotübül bölme proteinleri, nörodejeneratif hastalıklar.
- Ayşegül Yıldız - Mikrotübül bölme proteinleri, tavuk katanini, mikrotübül dinamikleri.
- Duygu Esen - Protein katlanması, protein etkileşimleri.

Cyto grubunun şimdiye kadarki çalışmalarında kullandığı yöntemler arasında şunlar yer almaktadır: Sıçandan doku diseksiyonu, hücre kültürü, nöronal ve mitotik hücrelere transfeksiyon.

Cyto, şu sıralar nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer üzerine çalışmalarını sürdürüyor. Bu konuyla bağlantılı olarak yazının devamında Doç. Dr. Arzu Karabay Korkmaz'ın Orta Doğu Teknik Üniversitesi'nde gerçekleştirdiği sunumdan derlenen bilgileri bulabilirsiniz.

NÖRONLARDA HÜCRE

İSKELETİNİN ORGANİZASYONU

Sitoiskelet; hücre şekli ve bütünlüğünü koruyan, hücre hareketini sağlayan, kromozom ayrılmasında ve hücre içi taşınımında görevli bir yapıdır ve üç farklı yapı içerir. Bunlar

mikrotübüller, ara filamentler ve mikrofilamentlerdir. Bunlar da **MAP** ve motor proteinleri olmak üzere ikiye ayrılır. **MAP**'ler **MAP2**, **MAP4** ve **TAU**'dan oluşan bir grup ve **MAP1** den oluşan farklı diğer bir gruba ayrılır. Motor proteinler ise **dynein** ve **kinezinler** olarak ikiye ayrılır.

Tek bir hücre mitozla çoğalır ve iki hücre oluşur. Hücre farklılaşması sonucunda bu iki hücre genlerinde taşıdıkları özelliklere göre birbirinden tamamen farklı olan nöron ve epitel hücresine dönüşür.

Mikrotübüller **β -GTP** ve **α -GTP** tübülün heterodimerlerinden oluşur. Mitoz bölünmeden sonra mikrotübüllerin bir kısmı aksonda birikirken, bir kısmı da dendritlere doğru itilir.

MAP: Mikrotübüllerle bağlantılı proteinlerdir. Tübülün alt birimlerine bağlanarak, kararlılığını/sağlamlığını sağlar. Farklı hücre çeşitlerinde farklı türleri bulunur.

TAU: Mikrotübüllere iki şekilde bağlanır ve sabitleştirir: Moleküler yapıstırıcı gibi çalışarak ya da biçimsel değişikliklere sevk ederek.

MAP2c: Gelişen aksonlarda C terminalinde üç tane “+” yüklü MT bağlanma bölgesi ve N terminalinde “-” yüklü uzantı bulunur.

MAP1b: Gelişmekte olan sinir sisteminde en erken sentezlenen MAP proteinidir. N terminalinde “+” yüklü MT bağlanma bölgesi vardır.

Katanin: Kaderinlerin hücre iskeletine yapışmasını sağlayan proteinlerdir. Hayvan hücrelerinde, **kaderinlerin** hücre adhezyon molekülleriyle kompleks halde bulunur. ATPaz özelliğine sahiptir. İki alt ünitesi bulunur: **p-60**

katanin, p-80 katanin. Mitotik hücrelerde hücre bölünmesi, sinir hücrelerinde akson ve dendrit oluşumunda görevlidir.

Spastin: Mikrotübül ayırıcı proteindir. ATPaz özelliğine sahiptir. Mutasyonu spastik paraplejiye neden olur. **p-60 katanin** ile homolojisi bulunmaktadır.

MİKROTÜBÜL İLİŞKİLİ **PROTEİNLER VE** **NÖRODEJENERASYON**

Nöron hasarı geri dönüşümsüzdür ve nörodejeneratif hastalıklara sebep olur.

ALZHEİMER HASTALIĞI

Hafıza kaybı, davranış ve kavrama yeteneği bozukluklarıyla tanımlanır. Tanı ve tedavi tam olarak belirli değildir. Dünyada artan orta yaş nüfusunu en fazla etkileyen hastalıktır. Araştırmalara göre, 2010 yılında 480.000 kişi Alzheimer hastası olacaktır. Alzheimer hastalığının patolojik göstergeleri; amiloid plaklar ve nörofibriler yumaktır.

Amiloid plakların nöronlar dışında birikmesi, hücrelerin ölümüne yol açar. Aynı zamanda nöron içinde nörofibriler protein birikimi nörofibriler yumak oluşumuna ve sonunda hücre ölümüne sebep olur.

Olası mekanizmalar sonucunda ya hücre bölünmesi tetiklenir ya da MT'ler yeniden düzenlenir. Hücre bölünmesi olursa nöron ölür, Alzheimer hastalığı oluşur. MT proteinlerinin aktivasyonu MT parçalanmasına neden olur. Bu da Alzheimer hastalığına yol açar.

NÖRONLARDA MİTOZ

Nöronlar mitozdan sonra farklılaşarak G0 evresine giren hücrelerdir. Amiloid metabolizmasının bozulması, stres gibi nedenlerden dolayı nöronlar G0 evresinden G1

evresine girebilirler. G1/S evresi kontrol noktasından hücre geçer fakat sonunda S evresine girmeden apoptoza uğrar. Alzheimer hastalığında, G1/S ve G2/S noktası denetleyicileri nörofibril düğümler oluştururlar.

Belgin YALÇIN