

Antisens, Antigen Oligonukleotidler ve Hastalık Tedavisinde Kullanılma Potansiyelleri

Doç.Dr.Füsun UÇAR*

1973'lerden bu yana kullanılmakta olan gen mühendisliği yöntemlerine son yıllarda bir yenisi daha eklenmiştir. Antisens ve antigen teknolojisi olarak bilinen bu yöntemler, önceleri moleküler biyologlar tarafından gen fonksiyonlarını araştırmakta kullanılmış, fakat daha sonraları bu yöntemlerden arzu edilmeyen ve gen aktivitelerini engellemek için yararlanılma olanakları araştırılmaya başlanmıştır (1). "Reverse" genetik olarak isimlendirilen bu yöntemler, bugün ziraat ve tıp alanlarındaki yoğun araştırmalarda kullanılmaktadır. Özellikle insan enfeksiyon hastalıkları ve kanser tedavisinde önemli bir potansiyel oluşturmaktadır (2-5).

ANTİSENS VE ANTİGEN TEKNOLOJİSİ NEDİR?

Tıp alanında büyük beklentiler vaad eden antisens ve antigen teknolojilerin nasıl çalıştıklarını anlamak için gen yapısı ve ifadesi hakkındaki bilgilerin gözden geçirilmesinde yarar vardır. Bilindiği gibi, DNA molekülü iki iplikten oluşmaktadır. Bunlardan biri sens (anlamalı), diğeri antisens (anlamsız) ipliktir. Protein sentezinde sadece tek iplik kalıp olarak kullanılmakta ve mRNA sentezlenmektedir. Antisens DNA ipliğindeki bilgiler kullanılarak oluşturulan mRNA, nukleustan çıkarak sitoplazmadaki ribozomlara ulaşmakta ve ribozomlarda okunarak ilgili gene ait proteinler sentezlenmektedir. Bu olaylar sırasında sens ipliğinin görevinin ne olduğu hakkında, bilim dünyası son 3-4 sene öncesine kadar yeterli bilgi birikimine sahip değildi. Son yıllarda, moleküler biyologlar hücre içinde sens DNA ipliklerinden antisens RNA moleküllerine genetik bilginin aktarıldığını ve bu moleküllerin hücre içinde bazı genlerin fonksiyonlarını düzenlediğini saptamışlar ve bu bilgiler ışığında antisens teknoloji fikrini ortaya atmışlardır (2-5).

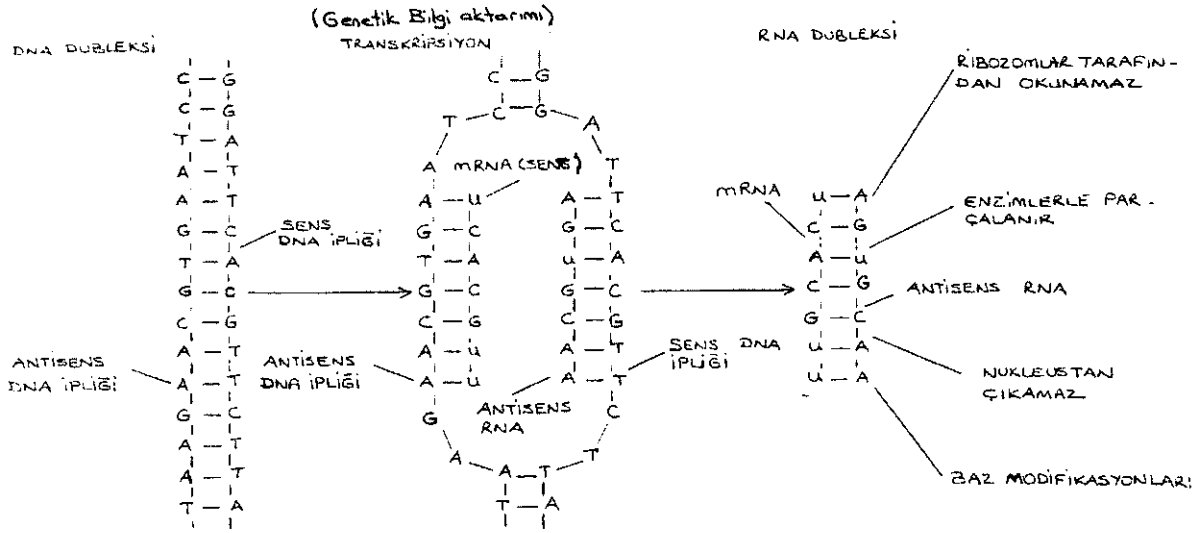
Antisens RNA moleküllerinin doğal biyolojik fonksiyonları hakkında ilk önemli bulgu, 1981 yılında National Institute of Health (NIH) laboratuvarında çalışan Jun-Ichi Tomizavva tarafından COIE1 olarak isimlendirilen,

çift iplikli küçük bir plazmidin DNA replikasyonuna ilişkin çalışmalar sırasında elde edilmiştir. Bu plazmidde DNA replikasyonu orijin olarak isimlendirilen spesifik bir diziden başlamaktadır. DNA polimeraz enzimi, RNA primerlerine bazları ilave etmektedir. Böylece orijini içeren ipliğe komplementer olan yeni bir DNA ipliği sentezlenmektedir. Tomizavva, plazmidin genetik materyelinin kopye sayısının hücre içindeki uygun RNA primerlerinin sayısına bağlı olduğunu, bu primerlerin oranının spesifik inhibitör moleküllerin oranıyla kontrol edildiğini saptamış; İnhibitör moleküllerin sens DNA ipliklerinin antisens ürünleri olduğunu belirtmiştir. Sens ve antisens DNA iplikleri komplementer olduğuna göre, sens RNA primerleri ve antisens RNA molekülleri de birbirlerinin komplementer olup, hibrid oluşturabilirler. Bu dupleks safhada RNA primerleri plazmidin orijini ile eşleşemeyecekleri için, DNA replikasyonunu başlatmayacaklardır. Sonuç olarak araştırmacı, antisens RNA moleküllerinin hücre içinde DNA replikasyonu ve genetik bilginin aktarım mekanizmasının düzenlenmesinde görev aldıklarını belirtmiştir (3). Daha sonraki araştırmalarla antisens RNA molekülleri ile hücredeki gen aktivitesinin baskılanması ve kontrolü olayının, bütün bakteri ve virüs hücrelerinde bulunabilen doğal bir olay olduğu gözlenmiştir. Fakat tüm mekanizma henüz bilinmemektedir (Şekil 1) (3).

Araştırmacılar, hücreler içinde doğal olarak çalışan bu sistemden istenmeyen genlerin ifadesinin engellenmesinde, yararlanabileceklerini düşünerek denemelere başladıklarında, antisens teknolojinin temelleri atılmıştır.

1983 yılında Tomizavva ve Izant, genetik mühendisliği yöntemleriyle, antisens RNA oluşturan ifade vektörlerini geliştirmişler ve bunları hücreler içine sokmuşlardır (Şekil 2). Araştırmaları sonucunda, antisens ifade vektörlerinin sens vektörlerinin aktivitesini engellediğini gözlemişlerdir. 1985 yılında Melton ve Harland, kurbağa yumurta hücrelerine antisens RNA ifade vektörlerine enjekte ettiklerinde, sens RNA'nın ifadesinin engellendiğini görmüşlerdir (2,3).

* Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,
Temel ve Endüstriyel Mikrobiyoloji ABD, İZMİR



Şekil 1. DNA'nın sens ve antisens iplikleri birbirine komplementerdir. DNA'nın RNA'ya genetik bilgisinin aktarılması esnasında, antisens DNA ipliği, mRNA için bir kalıp olarak iş görür. mRNA ribozomlarda proteine çevrilir. mRNA çoğu genlerin tek genetik bilginin aktarımı ürünüdür. Mamafih, bazı genler sens DNA ipliğinden oluşan antisens RNA'nın oluşumu ile düzenlenmektedir. Bu antisens RNA molekülleri ve mRNA molekülleri birbirlerine bağlanabilirler ve o gene alt protein sentezini engelleyebilirler. Oluşan RNA dubleks ribozomlar tarafından okunamaz, endonukleaz enzimleri ile parçalanabilirler, nukleousu terk edemez veya adenin bazıları kimyasal olarak farklı inozin bazlarına dönüşebilir, bunun sonucu olarak mRNA üzerindeki genetik kod fonksiyon gösteremez (Vveintraub'dan, 1990).

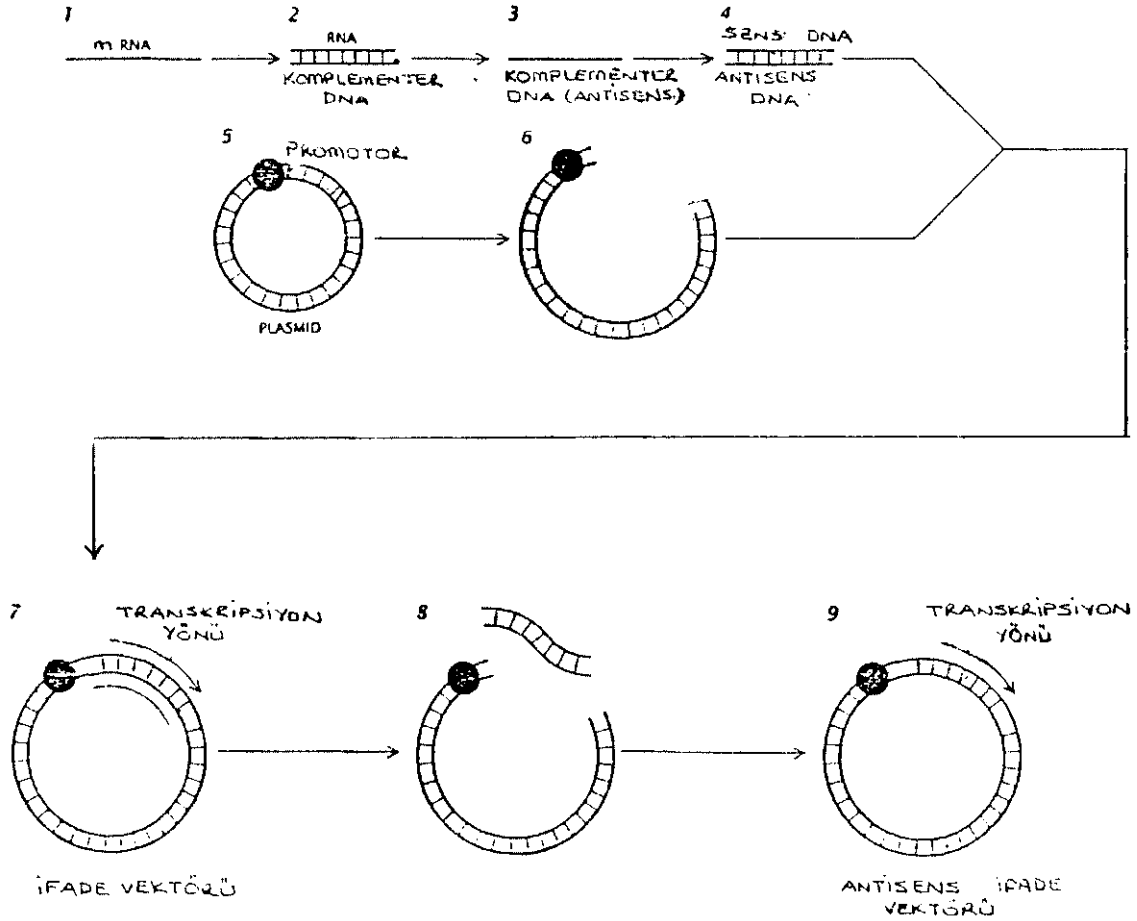
Daha sonra antisens ifade vektörleri ile yapılan çalışmaların uzun zaman alması dolayısıyla, hedef genlere karşı, sentetik olarak hazırlanan 15-25 mer'lik antisens RNA ve DNA oligonukleotidlerinin de hücreler içine enjekte edildiğinde, hedeflenen genlerin protein sentezinin engellendiği gözlenmiştir. Yapılan çalışmalardan birinde, timidin kinaz genine karşı hazırlanan sentetik DNA oligonukleotidi fare hücrelerine enjekte edilerek sonuçta hatalı DNA molekülünden oluşan RNA ile normal genden oluşan mRNA'nın birbirlerine bağlanması sonucu timidin kinaz enziminin üretimini engellendiği rapor edilmiştir (2-5).

Günümüzde spesifik genlerin ifadesini kontrol etmek için, sentetik oligonukleotidlerin iki amaca yönelik olarak kullanılabilceği rapor edilmektedir. Birincisi; mRNA'lar hedef alınarak hazırlanan RNA ve DNA molekülleriyle ilgilenilen genin protein sentezinin engellenmesidir (3-6). Bu işleme antisens teknoloji adı verilmektedir, ikincisi; çift iplikli DNA'nın spesifik dizilerini hedefleyen sentetik DNA molekülleri olup, bunlar ilgilenilen genin genetik bilgiyi aktarma mekanizmasını engeller ve bu işleme de antigen teknoloji adı verilmektedir (4,7-9).

mRNA'nın protein sentezinin oligonukleotidler tarafından en az iki mekanizma ile baskılandığı belirtilmektedir, ilki, oligonukleotid-mRNA hibridleri, bu hibridleri tanıyarak onu RNA bölgesinden kesen RNazH enziminin faaliyeti sonucu (10); ikincisi ise oligonukleotidin

mRNA'nın tercüme edilmeyen 5' bölgesine bağlanmak suretiyle ribozomlarda okunmasının engellenmesi (4,11) yoluyla. Mekanizmalardan bir diğeri 40 S ribozomal alt birimin atlanması ya da protein sentezi esnasında başlatıcı faktörlerin bağlanmasına engel olunması sonucunda gerçekleşmektedir (Şekil 3). Bu mekanizmalar, hücreden arındırılmış deney sistemlerinde, Xenopus oositlerine mikroenjeksiyon sonrası (12,13) ve oligonukleotidlerle inkübe edilen hücrelerde gözlenmiştir.

Antigen mekanizmada ise, DNA'nın genetik bilgisinin aktarılması engellenmektedir. Bu amaçla oluşturulan oligonukleotidler, çift iplikli DNA'yı hedeflemektedirler. Onlara bağlanarak bir üçlü heliks oluşturmaktadırlar. Bir homopirimidin oligonukleotid, çift iplikli DNA'nın homopürin-homopirimidin baz dizilerinde çift iplikli DNA'nın büyük girintisine bağlanır. Oligonukleotide çift heliksin her iki ipliği üzerinde dönüşsüz reaksiyonları uyarılmakta kullanılan reaktif bir grup bağlanmaktadır. Üçlü heliks timin ve pozitif yüklü sitozinin Watson-Crick-AT ve G-C baz çiftlerine Hoogsteen hidrojen bağlarıyla bağlanması sonucu oluşmaktadır (Şekil 3,4) (8,10). Bu üçlü heliks formları restriksiyon enzimleri veya genetik bilginin aktarılmasındaki faktörler gibi baz dizisine spesifik olan DNA'ya bağlanan proteinlerin fonksiyonlarını durdurmaktadır. Dolayısıyla DNA replikasyonu ve DNA'dan genetik bilginin aktarılma mekanizması gerçekleşmektedir (Şekil 3,4) (7-9). Laboratuvarda sentezlenen bu antisens DNA ve RNA molekül-



Şekil 2. Antisens RNA'yı yapan ifade vektörleri laboratuvarında DNA dublekslerinden genetik mühendisliği yöntemleri ile oluşturabilir ve hücrelere sokulabilir, izole edilen bir mRNA molekülü (1) antisens DNA'nın ipliğine komplementer bir kalıp olarak iş görür. (2) Bu DNA ipliği (3) sense DNA'yı yapmak için bir kalıp olarak faaliyet gösterir ve DNA dubleksi oluşturur (4). Bir plazmid (5) promotor bölgesine yakın bir bölgeden restriksiyon enzimleri ile kesilir (6) DNA dubleksi bir ifade vektörü oluşturmak için plazmid içine sokulabilir (7). Bu ifade vektörünün etkinliği hücrelerde test edilebilir. Promotor genetik bilginin aktarılması başlatıldığında, ifade vektörü orijinal mRNA'nın kopyalarını yapabilecekler. Eğer ilave edilen DNA daha sonra restriksiyon enzimleri ile ifade vektöründen kesilir (8) ve yeniden zıd pozisyonda halkaya sokulursa (9) genetik bilginin aktarılması esnasında bu ifade vektörü, antisens RNA'yı oluşturacaktır (VVeintraub'dan 1990).

leri çeşitli hücre kültürleri üzerinde hedef genlere karşı denenmiş, deney sonuçları bu moleküllerin hedef gen ürünlerinin sentezlenmesini engellediğini göstermiştir (2-4).

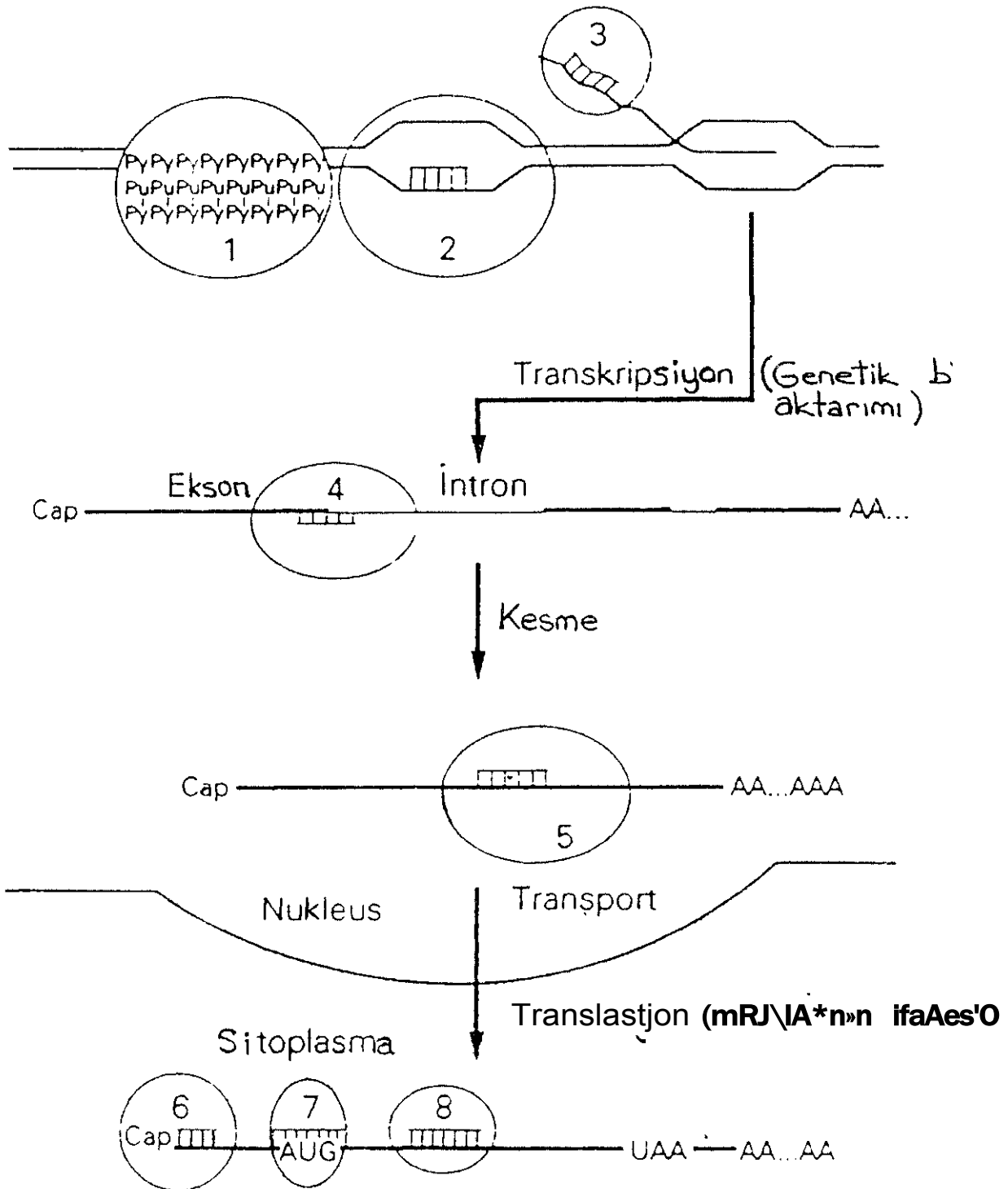
Günümüzde bu yöntemlerin tedavi amacıyla Herpes (14), influenza (15) ve AIDS virus enfeksiyonlarında ayrıca kanser genlerine karşı kullanılabilirliği araştırılmaktadır (4-28).

ANTİSENS VE ANTİGEN OLİGONUKLEOTİDLER KULLANILARAK YAPILAN ARAŞTIRMALAR

Claude ve Toulme, trypanosomiasis etkeni *Trypanosoma brucei* paraziti hastalığı yapan gen dizisine

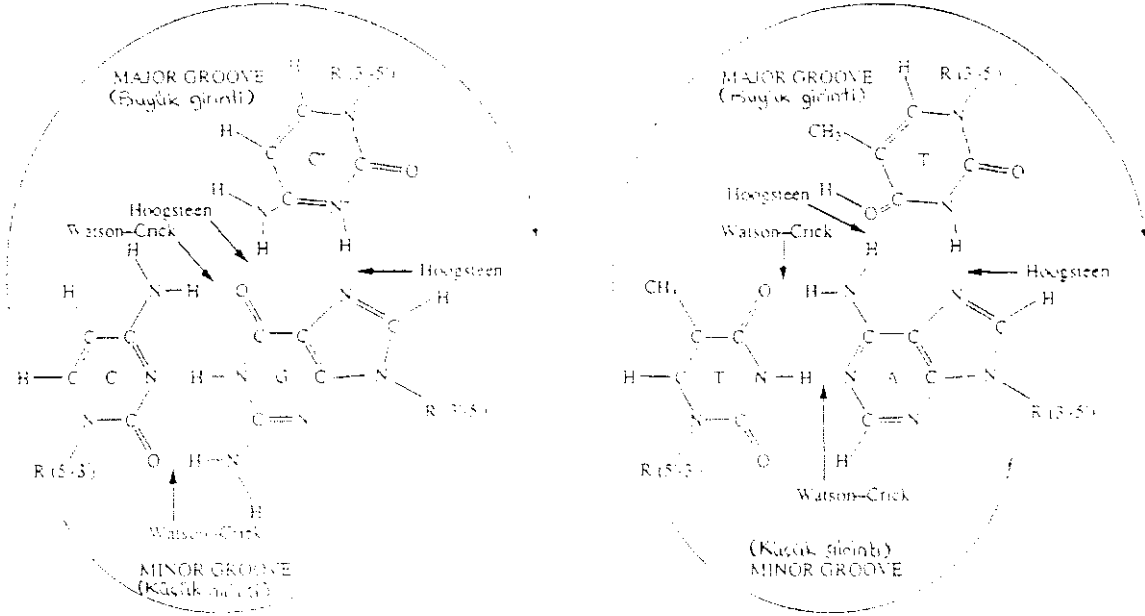
karşı bir antisens oligonukleotidi denemişler ve hücre kültürlerinde trypanosomların öldüğünü gözlemişlerdir (2).

Bu antisens oligonukleotidler normal hücreleri kanserli hücre haline dönüştüren, mutasyona uğramış tehlikeli onkogenlere karşı da araştırılmıştır. Aktive edilmiş onkogen, diğer genler etkilemeksizin selektif olarak inhibe edilebilmektedir. Aktivasyon, birkaç mekanizma ile gerçekleşebilir. Eğer bir nokta mutasyonu sonucunda oluşursa, mutasyona uğrayan baz dizisini hedefleyen bir antisens oligonukleotid, mutasyonlu mRNA'nın RNAZH tarafından parçalanmasını uyarabilir. Bu etki, normal mRNA'larda çok daha zayıftır. Çünkü mutasyonlu ve normal baz dizili mRNA'lar arasındaki ayırım, oligonukleotid-mRNA hibridinin, nokta mutasyon bölgesinde bir yanlış eşleşme sonucunda kararlılığının orta-



Şekil 3. Bir eukaryotik hücrede, DNA'dan proteine giden olaylar boyunca oligonukleotidlerin baz dizisine spesifik olan faaliyetlerinin olası mekanizmalarının özeti.

Oligonukleotidler A. Üçlü heliks oluşumu ile (1); DNA'nın bir ipliği üzerindeki purinlerle diğer ipliği üzerindeki purinidinlerle komplementer olan ve RNA polimeraz tarafından oluşturulan lokal olarak açılmış bölgeye hibridize olarak (2); veya olgunlaşmamış RNA ile hibrid oluşturarak (3); genetik bilginin aktarılmasını önlerler. B. Ekson-intron birleşme yerindeki baz dizisine hibridize olduktan sonra bu intronların kesilip çıkarılması sonucu mRNA'nın olgunlaşmasını önlerler (4); C. RNazH teşviki ayrılma yolu ile kesilip atılmış mRNA'nın geri dönmesi ile mRNA'nın faaliyetini engellerler (5); protein sentezi esnasında başlatıcı faktörlerin bağlanmasını engellerler (6); başlatma kodonundan ribozomal alt birimlerin aktivitesini engellerler (7); veya polipeptid zincir uzamasını önlerler (8); ve bütün bu mekanizmalarla protein sentezi ihlale edilir. Cap ve poliadenilasyon oluşumu; kesilip çıkarılma mekanizmasındaki öncül mRNA ile snRNP'lerin reaksiyonu; polizonlar içindeki mRNA'nın yerinin doldurulması ve nükleik asit-protein komplekslerindeki mekanizmalar burada açıklan-



Şekil 4. Çift iplikli DNA'yı hedefleyen oligonukleotidler. a. Homopürimidin oligonukleotid DNA çift heliksinin büyük girintisindeki homopürin-homopürimidin baz dizisine bağlanır. Oligonukleotid çift heliksin her iki ipliği üzerinde, dönüşsüz reaksiyonları teşvikleyen bir reaktif grup taşımaktadır, b. Timin ve protonlanmış sitozinin Watson-Crick A.T. ve G.C. baz çiftlerine Hoogsteen hidrojen bağlarını içeren üçlü heliks oluşumu görülmektedir (Helene'den, 1991).

dan kalkması nedeniyledir. Alternatif olarak, Örneğin HA-ras mRNA'dan, mutantın ayırımında bir ribozom kullanılabilir. Mutant RNA 12. pozisyonda GUU kodonuna sahip olup ribozom tarafından kesilmekte; hal-buki GGU kodonu taşıyan normal RNA değiştirilmeden sentezlenmektedir (4,20,21).

Aktivasyon, translokasyon sonucu yeni bir füzyon geninin oluşumu ile gerçekleştiğinde; örneğin, kronik myeloid lösemilerde görülen Philadelphia kromozom translokasyonunda, 9.kromozomdaki c-CBL (Murin Abelson Lösemi) protoonkogeni; 22.kromozomdaki c-sis (Simian Sarkoma) onkogeni ile yer değiştirmiş ve buradaki BCR geni ile komşu olmuştur (4,29-31). 22.kromozomun bu haline Ph kromozomu denilmektedir. ABL protoonkogeni tirozin kinaz aktivitesini kodlamaktadır. Bu aktivite BCR-ABL hibrid-ğenlerini taşıyan hücrelerde artmaktadır. Araştırmacılar antisens oligonukleotidleri kullanarak, bunların translokasyon sonucu oluşan kimerik mRNA'ya bağlanmasını; translokasyon işleminin oluşmadığı hücrelerdeki iki genin ilgili mRNA'larına bağlanmasını sağlayarak BCR-CBL protein sentezini engellemişlerdir (4,30). Keza, akut promyelositik lösemideki (APL) t(15;17) translokasyonunda, retinoik asit reseptör a geni myl geni ile translokasyonu sonucu myl/RAR o füzyon mRNA sentezi oluşmaktadır. Ayrıca t(14;18) translokasyonu bulunan B hücre lenfomalarında, bc12 immunoglobulin füzyonunu içeren kimerik mRNA'lar meydana gelmektedir. Bu kimerik mRNA'ları

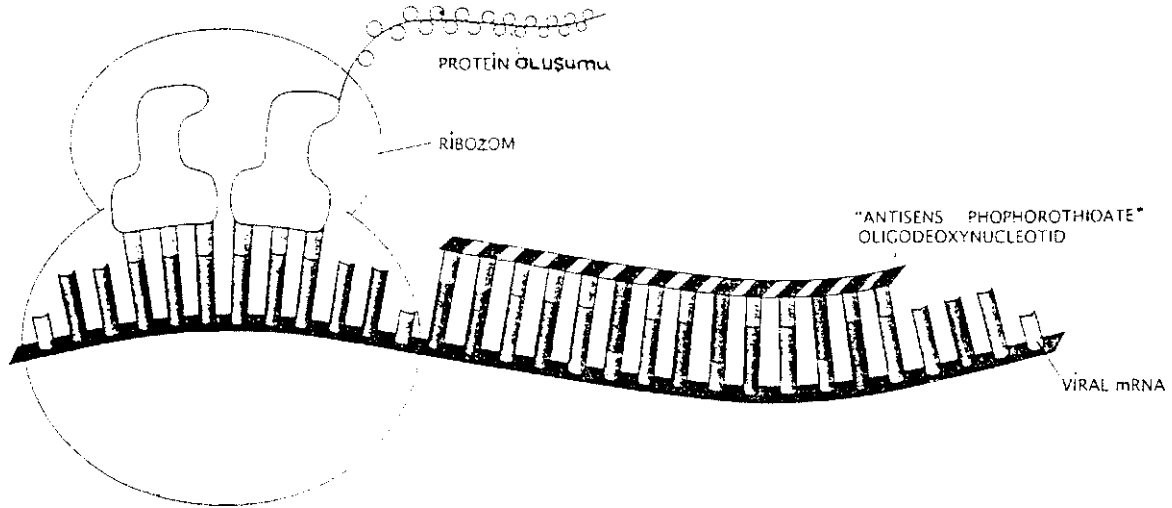
hedefleyen antisens oligonukleotidler hücre içine sokulduğunda, İnaktivasyon gözlenmiştir (4).

Protoonkogenin aktivasyonu translokasyon olmaksızın, genetik bilginin aktarılmasında hatalı bir promotordan başlaması sonucu oluşabilir. Burkitt lenfomada, c-myc'deki genetik bilginin aktarılması normal genin ilk intronunda başlamaktadır. Sonuç olarak, c-myc mRNA, normal c-myc mRNA'da bulunmayan kod içermektedir. Bu Introna karşı hedeflenen 21 mer'lik bir antisens oligonukleotidle tümör hücrelerinin çoğalması engellenmiş fakat normal hücrelerin faaliyeti etkilenmemiştir (4,32).

Son olarak orijinal mRNA'da bulunmayan baz dizilerini içeren yeni mRNA türleri oluşturan alternatif kesimler yapılabilmektedir. Protoonkogen aktivasyonunun bu mekanizması hakkında henüz bilgi bulunmamaktadır. Eğer böyle bir mekanizma oluşuyorsa, tümör hücreleri için selektif olan antisens oligonukleotidlerle potansiyel hedef bölgeleri sağlanabilecektir (4).

Bütün bu mekanizmalar kullanılarak aktif hale gelen onkogen ürünlerine karşı oluşturulan oligonukleotidlerle src, c-myc, N-myc, c-myc, N-ras protoonkogen ürünlerinin sentezi engellenmiştir (16,20,21,27,32,33).

Hücrel reseptörler, sitokinler ve büyüme faktörleri gibi moleküller hücre çoğalmasının engellenmesi amacıyla antisens oligonukleotidler için hedef olarak seçilebilmektedir. Örneğin, CSF (koloni stimüle eden faktör) ve onun reseptörleri veya HL 60 hücrelerinin



Şekil 5. Antisense oligonukleotidler, HIV mRNA bölgesine komplementer olan DNA segmentleridir. Onlar viral mRNA'ya bağlanırlar ve böylece mRNA'nın viral proteinlere çevrilmesini önlerler. Bununla beraber, oligonukleotidler hücrel enzimlerle hızla parçalanırlar. Onları bu enzimlere dayanıklı hale getirmek için, nukleotidler arasındaki fosfat bağları üzerindeki bir oksijen atomu ile bir kükürt atomu yer değiştirilmiştir. Sonuçta oluşan bileşik, phosphorothioate olarak isimlendirilmekte ve enzimle parçalanmaya dayanıklı hale getirilmektedir. Böyle bileşiklerin in vitro HIV ifadesini önlediği gösterilmiştir (Yarchoan ve ark.'dan, 1988).

farklılaşması, IL-2 IL-4'e bağımlı hücre hatları antisens oligonukleotidlerle selektif biçimde inhibe edilmiştir (28,34,35). Keza, fibroblast büyüme faktörüne karşı hedeflenmiş antisens oligonukleotidler, kanserli hücre çoğalması ve koloni oluşumunu engellemiştir (4,33).

Antisens teknoloji, vlrusa dayanıklı bitki ve hayvan üretiminde de kullanılmaktadır. Anthony Day ve ark. Londra Tıp Merkezinde domates mozolk virüsünün domates bitkisinde replikasyonunu önleyen antisens moleküller kullanmışlar, sonuçta bu bitkilerin viral enfeksiyonlara kontrol bitkilerinden çok daha dayanıklı olduklarını bulmuşlardır (2). Thomas Wagner ve ark., farelerde yaptıkları bir denemede lösemiye neden olan bir virüsün, enfeksiyonu yapan partikülünü oluşturan gene karşı bir antisens oligonukleotid kullanmışlardır. Bu fareleri genetik mühendisliği yöntemleriyle organize ettikten ve lösemi vlrusu ile de aşıladıktan sonra da, yavruların hiçbirinde lösemi belirtileri gözlemediklerini, ancak kontrol farelerinin %31'inde lösemiye rastlandığını belirtmişlerdir. Benzer çalışmalar AIDS ve diğer retro viruslar ile de yapılmış ve olumlu sonuçlar alınmıştır (2,4,16,17,24,26).

ANTİSENS TEKNOLOJİDE KARŞILAŞILAN PROBLEMLER

Antisens teknolojinin terapötik uygulamaları konusunda henüz çözülmemiş problemler mevcuttur. Teknolojinin rutin olarak kullanılabilmesi için hücre bölünmesi ve hücre büyümesi üzerindeki bütün bilgilerin açığa çıkması gerekmektedir. Antisens oligonukleotidler,

kimyasal olarak çok iyi dizayn edilmeli ve hedef genlere bağlanacak şekilde geliştirilmelidir. Minimum uzunlukları ise, özgüllüğü sağlamak için mümkün olduğu kadar kısa seçilmelidir (11-15 mer). Ayrıca, bu moleküllerin hücre içine alınımını kolaylaştıracak modifikasyonlar yapılmalıdır. mRNA'nın bazı bölgeleri antisens RNA tarafından inhibisyona diğer kısımlarından daha hassas olmalıdır. Bu moleküller hücrelerde yüksek seviyelerde korunmalı ve nukleazlarla parçalanmaya daha dayanıklı hale getirilmelidir. Antisens RNA'lar rRNA'lara henüz nukleustan çıkmadan bağlanmalı ve ortama ilavesinin zamanı çok iyi ayarlanmalıdır. Moleküllerin kararsızlığının engellenmesi için hücreye fazla miktarda verilmesi denenebilir, fakat bu durumda yüksek konsantrasyonun toksik etkisinin araştırılması gerekmektedir (1,2,4).

Son zamanlarda yapılan araştırmalar yukarıda bahsedilen problemlere çözüm getirmek üzere yoğunlaştırılmıştır. Antisens oligonukleotidler, onların hücre içine alınımını uyarmak ve nukleaz enzimlerine karşı dayanıklılıklarını artırmak için kimyasal yollarla modifiye edilmektedir (10,32,36,37). Bu modifikasyonlar, nukleik asitlerin kimyasal yapısı üzerinde değişiklikler oluşturularak başarılmaktadır. Fosfor modifikasyonları, pentafüranoz bağlayıcı modifikasyonlar ve heterosiklik modifikasyonlar yapılabilmektedir. Fosfor modifikasyonlarından olan "oligophosphorothioate" moleküller nukleotidler arasındaki fosfat bağı üzerindeki bir oksijen atomu yerine bir kükürt atomu geçirilerek oluşturulmuşlardır. Bu moleküllerin özellikle HIV (Human Im-

mune Deficiency virus) gelişimi üzerindeki araştırmalarda başarılı olduğu belirtilmektedir (Şekil 5) (4,18,24-26,61). "Oligomethylphosphonate"lar mRNA'nın genetik bilgiyi kodlamayan kısımlarını hedef almaktadır. Bu moleküllerde Herpes simplex virüsünün ekson ve intron birleşme bölgelerinde, erken gen ürünlerinin oluşumunu engellemiştir (4,40-42).

Ayrıca, oligonukleotid-mRNA kararlılığını arttırmak için, terminal moleküller olarak kimyasal yapıya giren maddeler üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır. İnfluenza virusu ve Simian 40 virüsünün hücre kültürleri üzerinde sitotoksik etkilerinin bu moleküllerle önlediği bildirilmiştir (4,42).

Keza, bu oligonukleotidler kolesterol gibi hidrofobik gruplarla birleştirilmekte ve bunlar lipoprotein tabakasına bağlanarak LDL reseptörleri yoluyla hücre içine alınımını kolaylaştırılmaktadır. Aynı şekilde bu moleküller, hedef baz dizilerinde dönüşümsüz reaksiyonları teşvikleyen maddelere de tutturularak aktiviteyi arttırmaktadır (38,40-43).

Araştırmalardan çıkan veriler, modifiye edilmiş ve edilmemiş olan bu moleküllerin sitotoksik etkiye sahip olabileceğini göstermiştir (40-43). Bu sitotoksikte, ge-

nellikle spesifik antisens etki için gerek duyulandan daha yüksek konsantrasyonlarda gözlenmiştir. Toksikiteyi etkileyen faktörler; serum, oligonukleotid uzunluğu, seçilen yöntem, çeşitli ortam bileşenleri ve hücre tipi gibi faktörlerdir. Modifiye oligonukleotidlerle yapılan farmakokinetik deneyler, hücre içine alınımının, süre, sıcaklık ve konsantrasyona bağlı olduğunu ve hücreler enerji gerektirdiğini göstermiştir (44-48).

Görüldüğü gibi, yöntemin rutin uygulanmasını sınırlandıran faktörler giderildiğinde, adı geçen teknolojiler hastalık tedavisinde çok değerli yöntemler olacaktır (46,48).

SONUÇ

Antisens ve antigen teknolojiler üzerindeki çalışmalar henüz çok yeni olup, son üç dört yılı kapsamaktadır. Yöntemin rutin kullanımını sınırlandıran problemler giderildiğinde, belki de çok yakın bir gelecekte, günümüzün korkulu rüyası AIDS ve kanser gibi hastalıkların tedavisi gerçekleştirilebilir. Bilim adamları, yeni yöntemler sayesinde önümüzdeki yılların tedavi yöntemlerinde, genlerin en üstün ilaç olabileceğini savunmaktadırlar.

KAYNAKLAR

1. Weltraub HM, Izant JG, Harland RfM. Antisense RNA as a Molecular Tool for Genetic Analysis. Trends In Genetics 1985; 1(1):23-5.
2. Moffat AS. Making Sense of Antisense. Science 1991; 253:510-2.
3. Weintraub HM. Antisense RNA and DNA. Scientific American. January 1990:40-6.
4. Helene C. Rational Design of Sequence-Specific Oncogene Inhibitors Based on Antisense and Antigenic Oligonucleotides. European Journal of Cancer. 1991; 27(11):1466-71.
5. Samara G, Sawicki MP, Hurwitz M, Passaro E. Molecular Biology and Therapy of Disease. American Journal of Surgery 1993; 165(6):720-7.
6. Coulson J, Malcolm ADB. Antisense Oligonucleotides as Antiviral Agents. Annals of the New York Academy of Sciences 1992; 660:339-41.
7. Volkmann S, Dannull J, Moelling K. The polypurine Tract, Ppt, of HIV as Target for Antisense and Triple-Helix-Forming Oligonucleotides. Biochimie 1993; 75(1-2):71-8.
8. Helene C. The Anti-gene Strategy; Control of gene expression by Triplex-forming Oligonucleotides. Anti Cancer Drug Design 1991; 6(6):569-84.
9. Moffat AS. Triplex DNA Finally Comes of Age. Science 1991;252:1374-6.
10. Khan JM, Coulson JM. A Novel Method to Stabilize Antisense Oligonucleotides Against Exonuclease Degradation, Nucleic Acids Research 1993; 21 (2):2957-8.
11. Wakita T, Wands JR. Inhibition of Hepatitis-C Virus-Antigen Expression by Antisense Oligonucleotides Directed Against 5' Noncoding Region Ribosomal-Binding Sites. Hepatology 1993; 18(4):A77.
12. Shuttleworth J, Colman A. Intensive Oligonucleotide-Directed Cleavage of Messenger-RNA in Xenopus Oocytes and Eggs. Embo Journal 1988; 7(2):427-34.
13. Matus-Letbovitch N, Mengod G, Oron Y. Kinetics of the Functional Loss of Different Muscarinic Receptor Isoforms in Xenopus Oocytes. Biochemical Journal 1992; 285(3):753-8.
14. Hanecak R, Driver V, MacDonald B, Azad R, Ford C, Anderson KP. Inhibition of Herpes simplex Virus Infection by Antisense Oligonucleotides. Journal of Cellular Biochemistry 1993; S17D:17.
15. Vlasov VV, Gorn VV, Nomokonova NYU, Fokina TN, Vurchenko LV. Suppression of the Translation of the Influenza Virus M1 Protein mRNA by Antisense Oligonucleotides in vitro. Molekül Yamaya Biologiya (Moscow) 1991; 25(3): 1332-7.
16. Brown KE, Kindy MS, Sonenshein GE. Expression of the c-myc Proto-oncogene in Bovine Vascular Smooth Muscle Cells. Journal of Biological Chemistry 1992; 267(7):4625-30.
17. Boiziau C, Thuong NT, Toultn JJ. Mechanisms of the Inhibition of Reverse Transcription by Antisense Oligonucleotides. Proc. of the Natl Acad of Sci of the USA 1992; 89(2):768-72.
18. Yarchoan R, Mitsuya H, Bider S. AIDS Therapies. Scientific American. October 1988; 259(4).

19. Barabino SML, Sproat BS, Lamond AI. Antisense Probes Targeted to an Internal Domain In U2 snRNP Specifically Inhibit the Second Step of pre-mRNA Splicing. *Nucleic Acids Research* 1992; 29(17):4457-64.
20. Monia BP, Johnston JF, Ecker DE, Zounes MA, Lima F, Freier SM. Selective Inhibition of Mutant Ha-ras mRNA Expression by Antisense Oligonucleotides. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(28): 19954-62.
21. Skorski C, Szczylik C, Ratajczak MZ, Malaguarnera L, Gewirtz AM, Calabretta B. Growth Factor Dependent Inhibition of Normal Hematopoiesis by N-ras Antisense Oligonucleotides. *J Exp med* 1992; 175(3):743-50.
22. Catlett JP, Leftwich JA, Westin EH, Grant S, Huff TF. C-kit Expression by CD34 Positive Bone Marrow Progenitors and Inhibition of Response to Recombinant Interleukin-3 Following Exposure to c-kit Antisense Oligonucleotides. *Blood* 1991; 78:3186-91.
23. Simons M, Edelman ER, Dekeyser JL, Lange R, Rosenberg RG. Antisense c-myc Oligonucleotides Inhibit Intimal Arterial Smooth Muscle Cell Accumulation in vivo. *Nature (London)*, 1992; 359(6390):67-70.
24. Mackellar C, Graham D, Will DW, Burgess S, Brown T. Synthesis and Physical Properties of Anti-HIV Antisense Oligonucleotides Bearing Terminal Lipophilic Groups. *Nucleic Acids Research* 1992; 20(13):3411-7.
25. Perlaky L, Kaijo Y, Busch RK, Bennett CF, Mirabelli CK, Crooke ST, Busch H. Growth Inhibition of Human Tumor Cell Lines by Antisense Oligonucleotides Designed to Inhibit P120 Expression. *Anti Cancer Drug Design* 1993; 8(1):3-14.
26. Svinarchuk FP, Konevets DA, Pliasanova OA, Pokrovsky AG, Vlassov VV. Inhibition of HIV Proliferation in Mt-4 Cells by Antisense Oligonucleotides Conjugated to Lipophilic Groups. *Biochimie* 1993; 75(1-2):49-54.
27. Rosolen A, Kyle E, Chavany C, Bergan R, Kaiman ET, Crouch R, Neckers L. Effect of Over Expression of Bacterial Ribonuclease-H on the Utility of Antisense myc Oligodeoxynucleotides in the Monocytic Leukemia Cell Line U937.
28. Stepkowski SM, Tian L, Kloc M. Interleukin-2 Antisense Oligonucleotides Inhibit T-Cell Function. *Transplantation Proceedings* 1993; 25(1):125.
29. Gale RP, Cannani E. The Molecular Biology of Chronic Myelogenous Leukemia. *Haematology* 1985; 60:395-408.
30. Zülfiyar B, Savaşan S. Kronik Myeloid Lösemi, Klinik, Hematolojik Bulgular ve Son Tedavi Yöntemleri. *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi* 1992; 2(1):60-70.
31. Szczylik C, Skorski T, Nicolaidis NC, Manzella L, Malaguarnera L, Venturelli D, Gewirtz AM, Calabretta B. Selective Inhibition of Leukemia Cell Proliferation by BCR-ABL Antisense Oligodeoxynucleotides. *Science* 1991; 253:562-5.
32. Wu-Pong S, Weiss TL, Hunt CA. Antisense c-myc Oligodeoxynucleotide. Cellular Uptake. *Pharmaceutical Research (New York)*, 1992; 9(8): 1010-7.
33. Arsur M, Introna M, Passerini F, Mantovani A, Golay J. B-myb Antisense Oligonucleotides Inhibit Proliferation of Human Hematopoietic Cell Lines. *Blood* 1992; 79(10):2708-16.
34. Birchenall RM, Ferrer C, Ferris D, et al. Inhibition of Murine Monocyte Proliferation by a Colony-stimulating Factor-1 Antisense Oligodeoxynucleotide. Evidence for Autocrine Regulation. *Immunology* 1990; 145:3290-6.
35. Collins JF, Herman P, Schuch C, Bagby GC Jr. C-myc Antisense Oligonucleotides Inhibit the Colony-forming Capacity of 320 Colonic Carcinoma Cells. *Clinical Investigation* 1992; 89(5):1523-7.
36. Neckers L, Rosolen A, Fahmy B, Whitesell L. Specific Inhibition of Oncogene Expression In vitro and In vivo by Antisense Oligonucleotides. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Oct 1992; 660:37-44.
37. Hatta T, Kim SG, Nakashima H, Yamamoto N, Sakamoto K, Yokoyama S, Takaku H. Mechanisms of the Inhibition of Reverse Transcription by Unmodified and Modified Antisense Oligonucleotides. *FEBS Letters* 1993; 330(161-4).
38. Akhtar S, Juliano RL. Liposome Delivery of Antisense Oligonucleotides. Absorption and Efflux Characteristics of Oligodeoxynucleoside Phosphorodithioates from Thiophosphoramidites. *Nucleic Acids Research* 1991; 19(21):5343-50.
40. Giles RV, Tidd DM. Enhanced RNase H Activity with Methylphosphorodiester/Phosphodiester Chimeric Antisense Oligonucleotides. *Anti-Cancer Drug Design* 1992; 7(1):37-48.
41. Jaroszewski JW, Cohen JS. Cellular Uptake of Antisense Oligodeoxynucleotides. *Adv Drug Delivery Rev* 1991; 6:235-50.
42. Bielinska A, Shivdasani RA, Zhang L, Nobel GJ. Regulation of Gene Expression with Double-stranded Phosphorothioate. *Science*. Nov 1990; 250:997-9.
43. Mirabelli CK, Bennett CF, Anderson K, Crooke ST. In vitro and in vivo Pharmacologic Activities of Antisense Oligonucleotides. *Anti Cancer Drug Design* 1991; 6(6):647-61.
44. Crooke RM. In vitro Toxicology and Pharmacokinetics of Antisense Oligonucleotides. *Anti Cancer Drug Design* 1991; 6(6):609-46.
45. Chavany C, Le-Doan T, Couvreur P, Puisieux, Helene C. Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles Polymeric Carriers for Antisense Oligonucleotides. *Pharmaceutical Research (New York)* 1992; 9(4):441-9.
46. Lattuada D, Mazzei M, Meazza R, Nicolini A. Therapeutic Implications of Antisense Oligonucleotides. *International Journal of Clinical Laboratory Research* 1992; 21(4):296-9.
47. Woolf TM, Melton DA, Jennings CGB. Specificity of Antisense Oligonucleotides in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 1992; 89(16):7035-309.
48. Stein CA, Cheng YC. Antisense Oligonucleotides as Therapeutic Agents is the Bullet Really Magical. *Science* 1993; 261(5124):1004-12.