

# BACASIZ İLAÇ FABRİKALARI PROTEİN ÜRETEN TRANSGENİK BİYOREAKTÖR HAYVANLAR

Transgenik (Tg) hayvan, kendi genomunda (gen havuzu, tüm genlerin toplamı) "transgen" olarak adlandırılan yabancı DNA parçası taşıyan hayvan olarak isimlendirilir. Tg hayvanların üretim tekniklerinin gelişimi biyoloji, tıp ve veteriner hekimlik alanındaki araştırmalar için çok sayıda yeni fırsatlar sağlamakta. Bu teknoloji aynı zamanda tarım, hayvan ve insan sağlığını içeren diğer alanlarda da yaygın olarak kullanılıyor. Bu hayvanlar, geleneksel üretim yöntemlerinin yerine laboratuvarla rekombinant DNA teknolojisini kullanılmasıyla üretilir. Bunun için bir transgen (aktarılan gen), bir genin kontrol elementlerini (enhancer element ve promotör) ve buna ek olarak diğer bir genin protein kodlayan DNA baz dizisini (cDNA veya genomik DNA) içerebilir. Tg hayvanların üretiminde en yaygın olarak kullanılan yöntem, pronükleer DNA mikroenjeksiyon. Gen transferi, bir hücreli dönemdeki döllenmiş yumurtaların (zigotların) pronükleuslarına (döllenme sürecinde, birbiriyle henüz birleşmemiş sperm ve yumurta çekirdeği) DNA mikroenjeksiyonu tekniğiyle yapılır ve transfer edilen gen (transgen) embriyonun genomu içerisinde rasgele (random integration) bir yere yerleşir. Bu rasgele gerçekleşen integrasyonun moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmiyor. Bu teknoloji sayesinde, doğal yetiştirme yöntemlerinden farklı olarak, pronükleer DNA mikroenjeksiyon yöntemiyle türler arasında da (türden türe) gen transferi gerçekleştirilebilmekte. Örneğin; insan genleri, "ifade" davranışlarının çalışabilmesi amacıyla hayvan modellerinin üretilmesi için fare genomu içine entegre edilebilmekte. Tg çalışmaların çoğu laboratuvar fareleriyle yapılmakta. Farelerin Tg çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmalarının nedeni, diğer türlerle karşılaştırıldığında maliyetlerinin az olması, biyolojilerinin yoğun biçimde bilinmesi, yavru sayısının çok ol-



ması (10-15 ad.), doğum sürelerinin kısa olması (19-21 gün), çiftleşmeye gelme sıklığının kısa olması (4 gün) ve fare embriyonal yapısının (pronükleuslarının belirgin ve büyük olması) mikroenjeksiyona uygun olması. Ayrıca, Tg fareler, genlerin fonksiyonlarının ve gen regülasyonlarının canlı hayvanda çalışmasına olanak sağlamaları bakımından diğer sistemlere göre daha üstün avantajlar sunuyorlar. Mikroenjeksiyon tekniğiyle üretilen ilk transgenik fare 1980 yılında elde edildi. O zamandan günümüze kadar yüzlerce transgenik fare hattı geliştirilmiş bulunuyor. Tg fareler, gen üzerindeki temel çalışmaların yanı sıra, insan hastalıkları üzerinde araştırma yapılabilmesi için deneysel modeller olarak da biyomedikal araştırmalarda yoğun şekilde kullanılıyorlar. (Alzheimer, kistik fibroz, hipertansiyon modeli, insan HBV Genomu taşıyan ve atherosklerotik modeller vb.). Uygun yöntemlerle kanser, metabolik ya da dejeneratif hastalıkların hemen hemen tümü için transgenik fare modelleri geliştirilebilmektedir. Bunlardan başka, transgenik hayvanlar organ naklinde (ksenotransplantasyon, transgenik domuzların karaciğerinin insana nakli gibi), gen terapisinde kullanılması düşünülen bazı vektörlerin

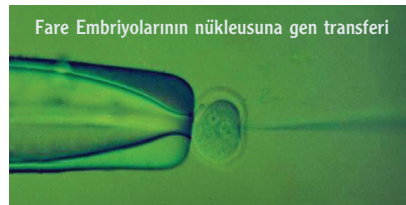
(ilaç ya da gen taşıyıcıların) araştırılmasında ve tıbbi öneme sahip bazı rekombinant proteinlerin (canlının genomuna eklenen DNA parçasıyla üretilen protein) süt, idrar ve kan gibi çeşitli dokularda üretilmesinde de kullanılmakta. Ayrıca, çeşitli rekombinant proteinlerin meme bezlerinde sentezlenmesi amacıyla üretilen transgenik hayvanlara "biyoreaktörler" adı veriliyor. Bu güne kadar 50-55 adet rekombinant proteinin transgenik fare, sıçan, tavşan, keçi, koyun, domuz ve ineklerin sütünde salınımları sağlanmış bulunuyor.

## Transgenik Hayvanların Sütünde Rekombinant Proteinlerin Üretimi

Transgenik hayvanların süt, idrar ve kan gibi vücut salgılarında rekombinant proteinler üretilir. Bu proteinlerin üretimi için, dokuya özgü güçlü promotörlere ihtiyaç vardır. Bunlardan bazıları, koyun, (lactoglobulin), fare, sıçan, tavşan ve keçi (whey asit protein [WAP]), inek (s1 kazein), keçi, (kazein), koyun, keçi ve inek (lactalbumin) gibi promotörler (tetikleyici). Bu güçlü promotörler, rekombinant prote-

inlerin sadece hedef dokularda (süt, kan ve idrar) salınmasını sağlarlar. Hedef dokuya özgü bu tür düzenleyici DNA dizilerinin kullanılmasıyla, herhangi bir genin ifadesi istenilen dokuda gerçekleştirilebilir. Örneğin, insan doku plazminojen aktivatörü, insan ürokinazı, insan büyüme hormonu ve insan  $\cdot$  1-antitripsin gibi ilaç yapımında kullanılan birçok protein, biyoreaktör farelerin meme bezinde üretilmiş bulunuyor. Transgenik biyoreaktörlerde salgılanan rekombinant proteinler genellikle yıkımlanmaya karşı dayanıklılar ve çok miktarda elde edilebilirler. Bu bize şimdiye kadar insan materyalinden ya da yetersiz hücre kültürlerinden üretilen proteinleri sınırsız miktarda üretme olanağının sağlıyor. Transgenik hayvanların vücut sıvılarından elde edilen rekombinant proteinler insan plazmasından elde edilenlerden çok daha saf ve insan infeksiyon ajanlarını barındırmıyorlar (hepatit B ve C, HIV ve AIDS). Safılaştırma aşamasında viral inaktivasyon (virüsler aracılığıyla etkisizleştirme) yapılması, transgenik hayvanların özel, hastalık yapıcı etkenlerde arındırılmış şartlarda barındırılması ve üretim standartlarına uyulmasıyla rekombinant proteinler çok saf ve temiz olarak elde edilebilmekte ve böylece ürün kaliteleri yükseltilebilmekte. İnsan plazmasında sadece eser miktarda bulunan proteinler, transgenik biyoreaktörlerde normal düzeylerinin 100-500 katı oranında üretilebiliyor. Alınan sonuçlar, insan Faktör VIII (kanın pıhtılaşmasını sağlayan mekanizmada rol oynayan proteinlerden biri) gibi üretilmesi çok zor olan proteinlerin bile transgenik biyoreaktörlerin meme bezinde sentezlenebileceğini göstermiş durumda.

Transgenik hastalık modeli farelerin kullanımı gün geçtikçe yaygınlaşıyor. Transgenik biyoreaktörlerde salgılanan farmasötik proteinler genellikle enzim etkinliğiyle yıkıma uğramaya karşı dayanıklıdır ve çok miktarda elde edilebilirler. Transgenik çiftlik hayvanlarının üretimi sonucunda yılda 500 kg ile 1 tona yakın rekombinant protein (alpha-antitripsin-III, faktör VIII ve IX vs) bu biyoreaktörlerin sütünden yalıtılabilir. Tıbbi öneme sahip tedavi edici proteinlerin kullanımının sağlanmasıyla milyonlarca insan bunlardan çok daha kolay yararlanacak ve



herhangi bir kontaminasyon riskiyle karşı karşıya kalmayacak. Özellikle de, çiftlik hayvanlarında klonlama ve transgenik teknolojinin gelişimine engel durumdaki bazı teknik güçlükler ortadan kalktıkça, bu üretim teknolojisi tüm dünyada pratik uygulama alanları bulabilecek. TÜBİTAK MAM-Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü bünyesinde bulunan Transgen ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı'nda 1990 yılından bu yana transgenik fareler üretiliyor: Türkiye'de ilk transgenik fare 1993 yılında, İnsan Total Hepatit Virüs Genomunu taşıyan transgenik fareler 2000 yılında, Balık Antifreeze Protein Genini (AFP) taşıyan ve bu geni dokularında ifade eden transgenik fareler dünyada ilk kez laboratuvarımızda 2003 yılında üretildi. 2002 yılından bu yana inek klonlama çalışmaları gerçekleştiriliyor. Ayrıca, 01.11.2005 tarihinde, Bulgaristan Bilimler Akademisi ile laboratuvarımız arasında "Transgenik Farelerin Meme Bezlerinde İnsan Gamma İnterferon Üretimi" başlıklı proje de yürütülmeye başlandı. 2004 yılında laboratuvarımızda başlayan "Yeşil Flourensans Protein Geni (GFP) Taşıyan Transgenik Zebra Balık Üretimi" başlıklı projeye, ülkemizde bir ilk. Laboratuvarımız 1998 yılından bu yana, bu bilgi birikimini her yıl düzenlemiş olduğu kurslarla ülkemizdeki tüm araştırmacılara aktarmakta. Çok yakın za-

manda transgen ve klonlama teknolojileri, yaşamın içinde kendilerine bir yer olarak uygulamaya dönüşebilirler. Bu teknolojiler sonunda transgen-klon domuzlar üretilip bunların bazı organları (karaciğer gibi) insanlara transfer edilebilir (ksenotransplantasyon). Ayrıca, insanlarda kullanılan bazı tedavi edici proteinler (biofarming) transgenik hayvanların sütünden yalıtılabilir. Ayrıca, tedavi için klonlama teknolojinin ilerlemesiyle kişilere özgü blastosistler (embriyo oluşumunun ilk aşamalarındaki hücre kümesi) vücut dışında üretilen blastositlerden elde edilecek ICM hücreleri (pluripotent hücreler) çeşitli ortamlarda her dokuya dönüşebilme özelliğine sahip olabilecektir. Özellikle de son yıllarda biyomühendislik bilim dalının gelişmesi ile de bu teknolojiler hız kazanacaktır. Böylelikle kişilere spesifik olarak organlar üretilen olacaktır. Böylece bu teknolojiler sayesinde her yıl organ yetersizliği nedeniyle yaşamını kaybeden milyonlarca insan hayata döndürülebilecektir.

Doç. Dr. Haydar Bağış  
TÜBİTAK MAM-Gen Mühendisliği ve  
Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE) Transgen ve  
Deneysel Hayvanları Laboratuvarı Sorumlusu  
Haydar.bagis@mam.gov.tr

#### Kaynaklar:

1. H. Bağış, D. Aktopraklıgil, H. Odaman Mercan, N. Yurdusev, G. Turgut, S. Sekmen, S. Arat, S. Cetin (2006), Stable transmission and transcription of Newfoundland ocean pout type III fish antifreeze protein (AFP) gene in transgenic mice and hypothermic storage of mouse gametes with AFP. Mol.Rep.Dev. 73: 1404-1411.
2. H. Bağış, Arat S., Mercan Odaman H., Aktopraklıgil D., Caner M., Turanlı Tahir E., Baysal K., Turgut G., Sekmen S., Çırakoğlu B (2006): Stable transmission and expression of the hepatitis B virus genome in hybrid transgenic mouse until F10 generation. Journal of Experimental Zoology 305A. 420-427
3. Bağış H., Odaman H., Sağırkaya H., Dinyés A., (2002): Production of Transgenic Mice from Vitrified Pronuclear-Stage Embryos. Mol.Reprod.Dev. 61(1):173-179.