

Klonlama Teknikleri

Dr. Hasan BAĞCI

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, SAMSUN

- ✓ Nükleer transfer bir hücrenin nükleusundaki genetik materyalin tamamının döllenenmiş ve kendi nükleusu çıkarılmış bir yumurta hücresine transferini içerir. Nükleer transfer teknolojisine dayalı klonlama, Robert Briggs ve Thomas King'in tetari hücrelerinden kurbağalar oluşturdukları 1952 yılına kadar uzanır. Memelilerde nükleer transfer, hem embriyonik çalışmalarını yürütmek için önemli bir araç olarak, hem de, istenilen ('seçkin') embriyoları çoğaltmak (klonlamak) için kullanılmaya başlanmıştır. Ürün (nesil) sadece, erken embriyolar, embriyodan türetilmiş hücrelerin primer kültürleri, veya, kültürde birkaç kez pasaj yapıldıktan sonra serum açlığına maruz bırakılarak 'quiescent' hale getirilmiş embriyonik hücrelerin nükleer donör olarak kullanıldığı durumlarda elde edilebilmiştir. Dr. Ian Wilmut ve çalışma arkadaşlarının yürüttüğü araştırma yeni bir çığır açmaktadır. Bu çalışmayla ilk kez, yetişkin bir memeli hücresi nükleusundan alınan genetik materialın tamamı yeni bir bireyin gelişimi (oluşumu) için kullanılmıştır. Bu derleme yazısında, sadece klonlamadaki bu yeni yaklaşım değil, gen mühendisliği, gen tedavisi ve genom projeleri alanlarındaki yeni gelişmeler de özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Dolly, klonlama, çekirdek transferi

- ✓ **Cloning Techniques**
Nuclear transfer involves transferring the complete genetic material (of the nucleus) from one cell into an unfertilized egg cell whose own nucleus has been removed. Cloning based on the nuclear transfer technology dates as far back as 1952, when Robert Briggs and Thomas King made frogs from tadpole cells. Nuclear transfer has been used in mammals as both a valuable tool for embryonic studies and as a method for the multiplication (cloning) of desired ('elite') embryos. Offspring have only been reported when early embryos, embryo-derived cells primary culture, or embryonic cells which had been cultured for several passages and then induced to quiescence by serum starvation were used as nuclear donors. The research carried out by Dr. Ian Wilmut and his associates is pioneering. This is the first time the complete genetic material (the nucleus) from an adult mammalian cell has been used in the development of a new individual. In this review, not only this new approach in cloning, but also the recent developments in the fields of genetic engineering, gene therapy and genome projects were summarized.

Key words: Dolly, cloning, nuclear transfer

GİRİŞ

Genotip olarak birbirinin aynı olan hücre veya organizmalar topluluğuna klon denir. Aseksüel yolla klon hücre veya organizma toplulukları elde etme işlemine de klonlama denir. Bir genin tamamının, ya da bir kısmının, veya genel olarak, herhangi bir DNA parçasının virus, plazmid, kozmid ya da başka herhangi bir vektör aracılığıyla sayısal olarak çoğaltılması işlemine de klonlama denilir. Petri kutularında, agarlı besi yerlerinde çoğalan bakteri hücreleri kolonileri de teorik

olarak klonlar toplulukları olarak değerlendirilebilir. Aseksüel yolla ve kendiliklerinden bölünerek çoğalan bakteri hücrelerinin oluşturduğu klonlar ve insan müdahalesi dışında gerçekleşen klonlama olayları (örneğin, tek yumurta ikizlerinin ya da dördüzlerinin oluşması gibi) bu yazımızın kapsamı dışında kalacaktır. Genlerin klonlanması da genel ilginin hayvanların klonlanması yönünde olması nedeniyle bu yazının kapsamı dışında tutulmuştur. Ian Wilmut ve Keith Campbell grubunun yaptığı ve tüm dünyanın ilgisini

çeken koyunlarda klonlama bu yazının ana temasını oluştururken, Moleküler Biyoloji, Moleküler Genetik, Biyoteknoloji ve Rekombinant DNA (Genetik Mühendisliği) gibi alanlarda gerçekleştirilen başarılı çalışmaların bazıları ise kronolojik bir sırayla genel okuyucunun ilgisini çekeceği düşüncesiyle verilmiştir. Muhakkak ki, bu liste tam değildir ve tamamen bizim kişisel tercihlerimizi yansıtmaktadır. Bu nedenle böyle bir listede bulunması gerekirken bulunmayanlar ve bulunmaması gerekirken de bulunanlar olabilecektir. Bu nedenle listeye girmeyi hak edip te, listede yer almamış olan çalışmalar nedeniyle, bu çalışmaları yapan bilim adamlarından özür dilemeyi borç biliriz.

Klonlamanın Tarihiçesi

Hayvanlarda ilk klonlama çalışmaları yaklaşık yarım asır önce başlamış ve çekirdekleri çıkarılan veya ultraviyole ışını ile inaktifleştirilen kurbağa yumurtalarına farklılaşmış dokulardan alınan çekirdekler transfer edilmiş ve çok düşük bir yüzdeyle de olsa olgun kurbağalar elde edilebilmiştir⁽¹⁾. Uzun bir süre her nedense klonlama çalışmalarına devam edilmemiştir. 1970 yılında bitkilerde klonlama çalışmaları bitki doku kültürü yöntemlerinin gelişmesine paralel olarak başlamış ve ilk klonlanan bitki havuç olmuştur⁽²⁾. Bitki hücrelerinin totipotent olmaları, her hangi bir hücrenin kültüre alınarak ondan aynı özelliklere sahip bir tam bitki oluşturulabilmesine imkan vermektedir. Hayvanlarda klonlama çalışmaları 1980'lerden itibaren Rekombinant DNA Teknolojisinde yaşanan gelişmelerin kazandırdığı ivmeyle yeniden başlamış ve fare, tavşan, koyun, at, sığır, domuz ve en son olarak ta maymun (rhesus) gibi hayvanlar başarıyla klonlanmıştır. Bütün bu klonlama çalışmalarında embriyonik hücre çekirdekleri kullanılmıştır. Daha yaşlı hücrelerin DNA'sının

tersinmez (irreversible) olarak değiştiği (kimyasal ve yapısal modifikasyonlar sonucu olarak) ve bu nedenle totipotent karakterlerini kaybettikleri (yani bir hayvanı oluşturmak için gereken bütün vücut hücrelerinin gelişimini yönlendiremeyecek durumda oldukları) düşünülmekteydi. Örneğin, bir-, iki-, veya dört-hücreli fare embriyo çekirdekleri dışında, diğer fare hücreleri çekirdekleri ile yapılan transfer çalışmalarında klonlama başarılı olamamıştır. Nihayet, Nature dergisinin 27 Şubat 1997 tarihli sayısında rapor edildiği gibi, büyük ihtimalle somatik olan bir hücreden alınan çekirdekle hayvanlarda somatik hücre kökenli ilk başarılı klonlama koyunlarda gerçekleştirilmiştir. Bu başarılı çalışmayı gerçekleştiren Ian Wilmut'a göre, altı yaşındaki hamile bir koyunun meme bezlerinden alınan hücrelerle yapılan transfer çalışmaları sonucu klonlanan ve Amerikan halk müziğinin en renkli sanatçılarından, büyük göğüsleriyle ünlü Dolly Parton'a atfedilerek Dolly adı verilen, şimdi yaklaşık 9 aylık olan kuzunun elde edilmesinin sırrı, meme hücresi DNA'sını sperm ve döllenmemiş yumurta hücrelerinin inaktif DNA'ları gibi yapabilmektir. Somatik hücreler zigotun hücre döngüsü evrelerini geçirerek mitotik yolla bölünmesi sonucu oluşmaktadır. Bölünme mitoz olduğundan genetik bilgi kaybı söz konusu değildir. Hücre döngüsü, döllenmeden sonra zigotun mitoz bölünmeyle iki hücreli hale gelmesiyle başlar. Mitozun da dahil olduğu hücre döngüsünü oluşturan safhalar ve tüm döngünün yüzdesi olarak hücrenin bu safhalar için ayırdığı yaklaşık süreler şöyledir: Mitoz (M; %5), Ara faz 1 (G1; % 50), DNA Sentez fazı (S; % 33) ve Ara faz 2 (G2; %12). Mitoz bölünmenin tamamlanmasıyla oluşan iki yeni hücrenin her biri yeni bir hücre döngüsüne başlar. Sürekli bölünen hücrelerde bu döngü G1, S, G2 ve M şeklinde tekrarlanır. Bazı hücrelerin aktivitesi, hücre

döngüsü sırasında geçici ya da sürekli olarak durdurulur. Bu tip hücreler bir anlamda döngüden çekilerek metabolizmalarını değiştirmekte ve büyüme ve çoğalmalarını durdurmaktadır. Bu evreye G0 evresi denilmektedir. G0 evresine G1 evresi içinde girilir. Hücre döngüsü hücre tiplerine ve organizmaya göre değişiklik gösterir. Hücre döngüsü süresindeki bu farklılıklar çoğunlukla G1 evresinin uzunluğuna bağlıdır. Yüksek ökaryotlarda gözlenen hücre döngüsü süreleri 8 saat ile 100 günden daha fazla bir zaman aralığı olabilmektedir. Mitozda çekirdekte kromozomlar içinde bulunan DNA duplike olmakta ve bir birlerinin aynısı olan iki kromozom takımından her biri yeni oluşan hücrelere geçmektedir. Bu nedenle zigotun mitoz bölünmeler geçirerek oluşturduğu soma hücrelerinden her biri bir bireyin tamamını oluşturabilecek genetik bilgiye sahiptir. Bu varsayımın doğru olduğu ilk kez 1970 yılında Cornell Üniversitesi araştırmacılarından F.C. Steward'ın havuç bitkisiyle yaptığı çalışmalarla gösterilmiştir. Steward havuç depo kök hücrelerinden bitki doku kültürü yoluyla, yeni ve atasal havuç bitkisiyle aynı özelliklere sahip olan havuç bitkileri yetiştirmeyi başarmıştır. Organizmal klonlama (kopyalama) olarak tanımlanan bu metodla daha sonraları patates, tütün ve çam gibi bir çok bitki çoğaltılabilmektedir⁽²⁾. Bitkilerde somatik hücrelerle başarılan klonlama hayvanların somatik hücreleriyle de başarılı sonuç verebileceği Wilmur ve grubunun çalışmasıyla gündeme gelmiştir. Wilmur'un grubu bunu, kültüre alınan donör hücrelere verilen besin yüklü serum konsantrasyonunu normalden 20 misli daha aza çekerek başarmıştır. Aşırı derecedeki besin yetersizliği hücreleri, hücre döngüsünün G0 veya G1 evrelerine kilitlemiş, bir çok genin kapatılmasına yol açmış ve çekirdek transferinden hemen sonra DNA'nın replikasyon

geçirmesini engellemiştir. Wilmur ve arkadaşları G0 evresinde tutulmuş olan donör hücreleri, kromozomları çıkarılmış yumurta hücreleriyle elektrik akını uygulayarak füzyona sokmuşlardır. Füzyon, hem yumurtaya ihtiyacı olan tam bir kromozom takımı sağlamış, hem de onu uyararak gelişmeye teşvik etmiştir. Koyun yumurtası ilk üç bölünmesini DNA'dan transkripsiyon olmaksızın ve yeni genler aktif değilken gerçekleştirir; hali hazırda sitoplazmada var olan proteinler ve mRNA'lar hücre bölünmesi için gereken işleri yürütürler. Bu bölünmeler esnasında DNA kendisine bağlı olarak getirdiği proteinleri kaybeder ve sitoplazmadan diğer proteinleri alır. Bu esnada DNA yeniden programlanmış olur ve embriyoyu normal bir gelişim seyrine sokar. Yeni DNA'nın kontrolü ele alması böylece sekiz-hücreli evreden itibaren başlamış olur. Çekirdek transferinin koyunlarda başarılı olurken, farelerde pek başarılı olamamasının nedeni, bu ilk üç replikasyon ve replikasyonlar için gereken 5-6 günlük süre olabilir. Pennsylvania Üniversitesi öğretim üyelerinden Richard Schultz'un çalışmaları göstermiştir ki farelerde DNA'nın yeniden yapılanması ilk hücre bölünmesi sırasında olmakta ve yeni DNA iki hücreli evreden itibaren kontrolü almaktadır⁽³⁾. İnsan embriyolarında yeni DNA dört-hücreli evreden itibaren kontrolü devralmaktadır. Diğer taraftan, yukarıda bahsedilen yeniden programlama varsayımının doğru olamayabileceği de göz önüne alınmalıdır. Dolly'nin DNA'sı kültüre alınmış meme hücrelerinden gelmektedir. Meme hücrelerinin normal olarak süt veren doku haline gelişebilir olması, yani, bu hücreler arasında embriyonik kök (stem) hücrelerinin bulunuyor olması nedeniyle Dolly'nin DNA'sının yeniden programlama geçirmeden de yumurta gelişimini, embriyonik hücre transferlerinde olduğu gibi, yönlendirebileceği ihtimali bulunmaktadır.

Klonlama Yöntemleri

Memelilerde klonlama iki yolla yapılmaktadır:

1. Embriyo ayırma (splitting) yöntemi,

2. Çekirdek transferi yöntemi. Embriyo ayırma yönteminde, normal yolla döllenmiş olan zigot bir veya iki hücre bölünmesi geçirdikten sonra oluşan hücreler mikrocerrahi yöntemiyle birbirlerinden ayrılmakta ve bağımsız embriyolar olarak geliştirilerek taşıyıcı dişilere aktarılmaktadır. Çekirdek transferi yöntemi ise, her hangi bir donör organizmadan alınan embriyonik, fetal veya tamamen farklılaşmış bir doku hücresi, çekirdeği çıkarılmış yumurta hücresi ile, ya virus (Sendai virus), ya da, elektrik akımı yardımıyla füzyona sokularak yapılmaktadır.

Sığırlarda çekirdek transferi yöntemiyle yapılan klonlama embriyonik hücrelerin özelleşmeye başlamadan önceki 8 hücreli embriyo dönemine kadar başarılabilir. Her bir blastomer, çekirdeği çıkarılmış yumurta hücresine aktarılarak embriyo elde ediliyor ve bu embriyolar taşıyıcı annelerin rahimlerine implante edilerek birbirinin aynısı yeni döl elde edilebiliyor. Sığırlarda başarıyla uygulanan bu teknikle hali hazırda bir çalışmada 8 dana elde edilebilmiştir. İnsanda klonlamaya yönelik ilk çalışmalar George Washington Üniversitesi'nden Jerry Hall ve Robert J. Stillman tarafından başlatılmıştır. Tüp Bebek Programında ("In Vitro Fertilization Program") çalışan bu araştırmacıardan Jerry Hall ikiz tüp bebek tekniğini geliştirdi. Döllenmiş bir insan yumurtasını iki hücreli embriyo haline getirdikten sonra zona pellusida'yı (embriyoyu çevreleyen zar) enzimatik yolla eriterek iki hücreyi birbirinden ayırdı ve sodyum alginat (algin= sodium polymannuronate) ile hücrelerin etrafını çevirerek yapay bir zona pellusida oluşturdu. Dr.Hall iki spermle döllenmiş ve bu nedenle 3 kromozom takımı (23x3= 69 kromozom) içeren

yumurta hücresi ile çalıştığından iki ayrı 69 kromozomlu embriyo halinde büyütülen embriyoları implantasyon için kullanmadı. Çünkü bu tür embriyolar gelişmenin erken evrelerinde 6 ya da daha az günlükken ölmektedirler. Burada amaç ikiz elde etmek değil, hamile kalmakta problemleri olan kadınlara yardımcı olma tekniklerini geliştirmektir. İnfertil çiftlerin çocuk sahibi olma şansları bu metodla artırılabilir. Tüp bebek yönteminin diğer bir yönü de, doğal seleksiyonun rastgele yürüyen çalışması yerine, teknolojik olarak yardım edilmiş, planlanmış bir insan üretimi gerçekleştirme şansını vermesiydi. Bu teknoloji ile oluşturulabilecek senaryolardan ikisi şöyle olabilir:

1. Birini implante etmek ve diğerini de gelecekte kullanmak üzere dondurulan, birbirinin aynı iki embriyo oluşturmak. Örneğin; bir çift, ilk çocuklarını yetiştirdikten ve ondan memnun kaldıktan sonra, dondurulan ikinci embriyoyu çözerek onu da yetiştirebilir ve bu kanalla farklı yaşlarda iki tek yumurta ikizi çocuk sahibi olabilir.

2. İlk çocuk ölümcül bir hastalığa yakalandığında ikizinden transplantasyonla organ nakli yapılabilir.

Yukarıdaki iki senaryo ve bunlar gibi yazılabilecek daha bir çok senaryonun olabileceği ihtimaline rağmen, insanlarda klonlama yapmanın gereğine inanların sayısı oldukça azdır. Öncelikle, klonlanan ve onun klonu arasında, aynı genotipe sahip iki organizmanın farklı yer (çevre) ve zaman ortamlarında yetişmiş olmalarından kaynaklanan büyük farklar olacaktır. Klonlanan ile klonu arasında, belki de bizlerin çocuklarımızla ya da ebeveynlerimizle yaşadığımız generasyon çatışması benzeri çatışmalar yaşanacak ve klonlanan klonundan mutlu olmayacaktır. Etik ve hukuksal sorunlar gibi diğer sorunların da kaçınılmaz olarak karşımıza çıkacağını varsayabiliriz.

İnsan kişiliğinin gelişmesinde (nature or nurture; heredity or environment) kalıtım mı, çevre mi etkilidir? Bu sorunun cevabı ayrı yetiştirilen tek yumurta ikizleri ile yapılan çalışmalarla alınmaya çalışıldı. Minnesota Üniversitesi bilim adamları 350 çift, ayrı bölgelerde yetişmiş tek yumurta ikizi ile yaptıkları çalışmada, önderlik, liderlik (leadership ability); hayal, yaratma gücü (imagination); stresten etkilenme (vulnerability to stress); yabancılaşma (alienation) gibi karmaşık davranışların kalıtımla geçtiği; bir iş başarma, düzenli olma ve sosyal yakınlık gibi davranışların da yetiştirme ortamıyla ilgili olarak geliştiği sonucuna varmışlardır. Kalıtımın seksüel yönlenmeyi etkilediği de bulundu. 1991'de Northwestern ve Boston Üniversitelerindeki araştırmacılar eğer tek yumurta ikizi erkeklerden biri homoseksüel ise diğeri de homoseksüel olma şansının çift yumurta ikizlerine kıyasla 3 misli daha yüksek olduğunu buldular. Benzer bir sonuç başka araştırmacılar tarafından 1993 yılında lezbiyen kadınlar için de bulunmuştur. Özetle, kalıtımla geçen ve çevresel etmenlerin ya hiç, ya da, çok az etkili olduğu karakterler açısından klonlar birbirlerine benzer olacakken, çevresel etkenlerin etkili olduğu bir çok karakter açısından da klonlar arasında büyük farklar beklenebilecektir.

Klonlamanın Yararları

1. Bu teknoloji risk altındaki türlerin korunmasında kullanılabilir. Bilinen 4327 memeli türünün 1096'sı yok olma riski altındadır. 1096'nın 169'u yakın gelecekte yok olma riski altındadır. Bu türlerin yumurtaları, somatik hücreleri, embriyoları dondurularak saklanabilir. Çevre koşullarının etkisiyle normal hızla üreyemeyen, veya yok edilen ve sayıları çok azalan türlerin döl sayısı klonlama yoluyla artırılabilir.

2. Gen transferi yöntemiyle önemli bir

proteini ya da başka herhangi bir maddeyi sentezleyebilen transjenik bir canlıya sahip olduğunda, bu canlının klonlarını üreterek ilgili maddeyi ticari değer arzedecek miktarda üreten bir klon sürüsü elde edilebilir.

3. İnsan vücudunun reddetmesini önleyecek genetik değişikliklerin yapıldığı transjenik hayvanlar elde edilebilir, klonlamayla çoğaltılarak bunlardan organ nakli gerektiren hasta insanlara vücutlarıyla daha uyumlu olan organlar nakledilebilir.

4. Kanser, viral veya dejeneratif hastalıkların tedavisi amacıyla terapötik hücreler elde edilebilir.

5. Genlerin gelişme, farklılaşma, büyüme ve temel hücresel aktivitelerdeki rollerinin belirlenebilmesine yönelik olarak, gen aktarılması (transjenik) ve gen eksiltilmesi (knock-out) metodlarının kolayca uygulanabileceği, genotip olarak birbirleriyle aynı olan, değişik hayvan türleri veya aynı türün farklı gelişim evrelerinde olan bireylerin klonları elde edilebilir.

6. Klonların varlığı genetik çeşitliliği ve onun getirdiği problemleri bertaraf edecektir.

Örneğin, yeni geliştirilen bir ilacın etkilerini görmek ve bunu aynı amaçla kullanılan diğer ilaçlarla karşılaştırmak istiyor olabilirsiniz. Bu durumda genotipleri, yaşları ve hemen hemen bütün özellikleriyle birbirinin aynı olan bir klon organizma topluluğuyla çalışmanın büyük kolaylıklar sağlayacağı ve elde edilen sonuçların daha güvenilir ve kesin olacağı öngörülebilir. Eşeyli üreyen canlılarda klonlamanın genetik homojenite için ne kadar önemli olduğu aşağıdaki paragraftan kolayca anlaşılabilir.

Aynı anne ve babadan gelmelerine rağmen kardeşlerin birbirinden ne denli farklı olabildiklerini bilirsiniz. Eşeyli üreyen canlılar için, kromozom çiftlerinin, mayoz bölünme esnasında birbirlerinden bağımsız davranarak yavru hücrelere geçme özellikleri çeşit-

liliğin oluşumunda en önemli etmenddir. İnsan için homolog kromozomların kromatidleri arasında gerçekleşen parça değiş-tokuşu olayı olan krosingoveri saymaksızın, bir gamete (yumurta veya sperm hücresi) giden 23 kromozomun hepsinin bir atadan, anne ya da babadan, geliyor olması istatistiksel olarak 4.194.304'te 1'dir. Mayoz bölünme esnasında homolog kromozom çiftlerinin birbirinden bağımsız davranması ve anneden gelen kromozomların babadan gelen kromozomlardan ayrılarak iki farklı yavru hücreye rastgele geçmesi, 2^{23} kombinasyon ($2^{23}=8.388.608$) oluşturur. Döllenişmiş bir yumurtanın oluşumu için iki gametin iki farklı kişiden gelerek birleşmesi gerektiğinden, döllenmiş yumurta $8.388.608 \times 8.388.608 =$ yaklaşık 70×10^{12} , yani yetmiş trilyon kromozom kombinasyonundan herhangi birine sahip olabilir. Eğer, krosingover yoluyla gerçekleşen genetik rekombinasyon ve mutasyonların etkilerini de hesaba katacak olursak farklı gametlerin potansiyel sayısı yetmiş trilyondan çok daha yüksek olacaktır. Bağımsız dağılım, döllenme, krosingover ve mutasyonların etkileriyle oluşan bu muazzam varyasyonun ışığında, hayatı boyunca yaklaşık 480 yumurta oluşturacak olan bir kadının aynı genetik materyale sahip iki yumurta yapma şansı çok çok düşük olacaktır. Bu nedenle tek yumurta ikizleri hariç hemen hemen hiç bir anneden genotipleri aynı olan, yani klon, çocukların doğması beklenmemektedir. İnsanların klonlanması konusu, sığır, koyun ve maymunların klonlanmasında elde edilen başarılar nedeniyle yeni gündeme gelmiş olup olası yararları ve zararları tartışılarak toplum olarak bu konuda bir konsensusa ulaşılması gereklidir.

Yeni Çalışmanın Öncekilerden Farkı Nedir?

1) Aynı klonlama yöntemi kullanılarak

geçen yıl Megan ve Morag adında iki kuzu üretilmişti. Bu kuzuların üretiminde aynı embriyonun hücreleri donör olarak kullanılmıştı. Son çalışmada, Dolly'den başka, 26 günlükken abortusla sonlanan bir koyun fetüsünden 3 adet ve 9-günlük embriyodan da 4 adet olmak üzere toplam 7 kuzu daha elde edilmiştir. Böylece, hem embriyodan, hem fetüsten, hem de 6 yaşındaki yetişkin bir koyundan alınan meme hücreleri ile koyunun klonlanabileceği gösterilmiştir.

2) Hayvanlarda somatik hücrelerin klonlanabilmesi bu hücrelerde gerekli genetik değişikliklerin kültür aşamasında yapılmasına imkan tanımaktadır. Genlerin manipülasyonu ve sonradan çekirdeksiz yumurtalara aktarılıp embriyo olarak büyütülebilmeleri büyük imkanlar açacaktır. Genetik müdahale şimdiye kadar sadece farelerde yapılabilmekteydi. Fare embriyonik-kök hücreleri izole edilebildiği için bunlara gen aktarımı veya bunlardan gen çıkarılması yapılabiliyordu. Embriyonik kök hücreleri çiftlik hayvanlarından henüz izole edilemediği için, farelerde başarılı gen transfer ve gen yok etme (=knockout mice) çalışmaları, çiftlik hayvanlarında yapılamıyordu. Bu çalışma sayesinde bu zorluk kısmen aşılabılır hale gelmiş bulunuyor.

Yeni Çalışmanın Potansiyel Pratik Değeri Nedir?

Bu tekniğin iki yeni avantajı olacaktır. Birincisi, donör hücreler kültüre alınmışken (Dolly örneğinde 16. pasaj gerçekleştirilmiştir) bazı genetik değişiklikler yapılabilir ve arzu edilen genler donör hücrelere yerleştirilirken, o türde bulunan ve istenmeyen genler de (mutant organizmalardan) uzaklaştırılabilir. Sonra, genetik altyapısı düzeltilmiş hücreler donör olarak kullanılabilir. İkincisi, bir hücre popülasyonundan yola çıkarak genetik olarak aynı olan dölleri yetiştirilebilecektir. Bunun

çiftçiye veya sürü sahibine büyük bir kolaylık sağlayacağını düşünebiliriz. Hayvanlar birbirlerine benzer hızda olgunlaşacaklarından tümünün en uygun besinlerle beslenmesi, aynı zamanda olgunlaşmış ürün vermeleri ve üreme potansiyellerindeki benzerlikler v.b. gibi avantajları olacaktır. Bu şekilde klonlamanın, klonların bazı enfeksiyonlara yatkın olabilmeleri riskini de beraberinde getirdiği hatırlanmalıdır.

Yeni Çalışmanın Zorlukları Nelerdir?

1. Embriyo, fetal fibroblast ve erişkin meme hücrelerinin çekirdekleri toplam 834 fertilize olmamış yumurta hücresine aktarılmış ve toplam sekiz kuzu elde edilebilmiştir (Tablo 1). Yani çekirdek transferi yoluyla elde edilen verim % 0.95 olmuştur. Meme hücrelerinin kullanıldığı kısımda ise 277 yumurta hücresine yapılan transferden 29 embriyo gelişebilmiş, bunlardan da sadece bir tanesi başarıyla bir kuzu haline gelişmiştir. Verim % 0.36 gibi çok düşük bir rakkamdır. Bu verim düşüklüğünün se-

ebleri arasında yumurta hücreleri ile transfer edilen hücre çekirdeklerinin hücre döngüleri evrelerinin uyumsuzluğu, kültür şartlarından kaynaklanan olumsuzluklar, mikrocerrahi, elektriksel uyarının etkileri ve taşıyıcı dişi koyunlarda yaşanan hamilelik ve doğumla ilgili sebepler olabilir. Bu sebeplerin daha sonra yürütülecek çalışmalarla belirlenerek yok edilebilmelerine paralel olarak verimin artması ve klonlamanın ekonomik hale gelmesi söz konusu olabilecektir.

2. Leonard Hayflick kültürdeki insan fibroblastlarının bozulmadan yaklaşık 50 kez bölünebildiğini göstermiştir. Sonra bu hücreler yaşlanır, bölünme yeteneğini kaybeder ve sonunda ölür. Doku kültüründeki hücreler açıkça belirlenmiş ömre sahiptirler ve bu ömür kronolojik yaşa değil hücre bölünmesi sayısına bağlıdır. Bir hücre tarafından erişilebilen mutlak maksimum ömür uzunluğuna (hücre bölünme sayısı) Hayflick limiti denilir. İnsan fibroblastları bebek doğduktan sonra kültüre alınırsa yalnız 20-30 defa bölünür. Araştırmacılar

Tablo I.: Üç Farklı Hücre Tipiyle Oluşturulan Embriyoların Gelişimi⁽⁴⁾.

Hücre Tipi	Füzyona alınan çiftlerin sayısı (%) [*]	Oviduct'tan alınan embriyo sayısı (%)	Kültüre alınan embriyo sayısı	Morula/Blastula sayısı	Transfer edilen morula/blastosist ^d	Hamilelik sayısı/alıcı sayısı	Canlı kuzuların sayısı (%) ^{**}
Meme Epiteli	277 (63.8)	247 (89.4)	-	29 (11.7) ^a	29	1/13 (7.7)	1 (%3.4)
Fetal Fibroblast	172 (84.7)	124 (86.7)	- 24	34 (27.4) ^b 13 (54.2) ^b	34 6	4/10 (40.0) 1/6 (16.6)	2 (%5.9) 1 (%16.9) ^c
Embriyonik	385 (82.8)	231 (85.3)	- 92	90 (39.0) ^b 36 (39.0) ^b	72 15	14/27 (51.8) 1/5 (20.0)	4 (%5.6) 0

* : Füzyondan bir saat sonra diseksiyon mikroskopuyla yapılan analiz sonucuna göre.

** : Transfer edilen morula veya blastulaların oranı olarak. Tüm alıcılar tam olarak senkronize edilemediler.

a ve b : Sütunlar içinde füzyonun başarısı veya morula veya blastosist olarak gelişen embriyo sayıları itibariyle hücre tipleri arasında önemli farklılıklar olduğunu (p<0.001) göstermektedir.

c : Bu kuzu doğumu takibeden bir kaç dakika içinde öldü.

d : Tüm morula/blastulaları uygulamada transfer etme imkanımız olmadı.

türün ömrü arttıkça, kültürdeki hücrelerinin bölünme sayısının artacağını bulmuşlardır. Örneğin en uzun yaşayan hayvanlar arasında sayılan Galapagos kaplumbağasının hücreleri için Hayflick limiti 90-125 arasındadır. 2 ya da 3 yıl yaşayan fareler için bu limit 14-28 arasındadır. Hayflick limitinden yola çıkarsak insanlar için maksimum teorik yaş sınırının 110 civarında olduğunu hesaplayabiliriz. Ölümün prematüre sebeplerini yok edebilirsek, bu teoriye göre, insanların ortalama ömür uzunluğunu 110 yıla yükseltebilmemiz mümkün olacaktır. Altı yaşındaki bir koyunun meme hücrelerinin klonlanmasıyla elde edilen Dolly'nin geleceği nedir? Hayflick limiti Dolly için geçerli olabilir mi? Diğer bir deyişle Dolly ihtiyar bir delikanlı (genç dişi kuzu yerine kullanılmıştır) mı olacaktır? Erken menapoza girip erkenden ölebilir mi? Dolly verimli ve üretken olabilecek mi? Bütün bu soruların cevapları Dolly'nin yaşamasına bağlı olup önümüzdeki 4-5 yıl içinde alınabilecektir.

TEKNİKLER*

Yumurtaların (Ova) Toplanması:

Tahmini estrus başlangıcından bir kaç saat önce (0. gün) koyunlara intravenöz yolla gonadotropin-releasing hormon verilir. Bu yolla; çiftleşmemiş koyunlardan, döllenmemiş yumurtalar, hormon verildikten 28-33 saat sonra, içinde % 1 oranında fetal dana serumu (FCS) bulunan, kalsiyum ve magnezyum içermeyen fosfat tamponlu salin (PBS) içinde alınır. Daha sonra % 10 oranında FCS içeren kalsiyumsuz M2 ortamına aktarılan yumurtalar 37 derecede tutulur.

Çekirdek Donörlerinin Hazırlanması:

Embriyonik hücreler: Suffolk koç spermeleriyle suni olarak tohumlanan koyunlardan 8-hücreli embriyolar hormon verilmesinden 3 gün ve 16- hücreli embriyolar da 4 gün sonra

elde edilir. Embriyonik hücreleri kültüre almak için, mikrodiseksiyonla alınan 4-6 embriyonik disk, mitotik olarak inaktileştirilmiş olan ve Dulbecco's Modified Eagles Medium, %10 FCS, % 10 newborn serum ve rekombinant human leukemia inhibition factor içeren bir ortamda ekili olan "primary murine fibroblast feder" tabakası üzerinde 8 gün boyunca büyütülür. Daha sonra explante edilen diskler tripsin muamelesi ile hücrelere ayrıştırılır ve taze "feeder" tabakalara ekilir. 7 gün sonra geniş yassı hücreler içeren bir koloni alınarak "feeder" hücreler içermeyen yeni bir ortamda kültüre alınır. Bu hücreler 7.-9. pasajlarında çekirdek donörleri olarak kullanılır.

Fetal hücreler: Hamileliğin 26. günü otopsi yapılarak alınan fetusun başı kesilerek atılır, dokular küçük parçalara ayrılarak tripsinle hücrelerine ayrıştırılır. Fetal hücreler L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM) ve % 10 FCS içeren BHK 21 (Gibco Life Sciences) ortamında kültüre alınır. Hücreler kültür kabı yüzeyinin % 90'ını kaplayınca 1:2 seyreltmeyle pasajları yapılır. 4.-6. pasajlar arasında fetal hücreler çekirdek donörleri olarak kullanılır.

Meme hücreleri: Hamileliğin üçüncü trimesterinde olan Finn Dorset tipi bir koyundan alınan meme hücreleri kültüre alınarak⁽⁵⁾ 3.-6. pasajlarında çekirdek donörleri olarak kullanılır.

"Quescent" (metabolik aktivasyona sahip bölünmeyen hücreler), diploid donör hücreler kültür ortamlarındaki serum konsantrasyonu %10'dan %0.5'e azaltılarak ve beş gün kültüre alınarak elde edilir. Serum miktarındaki büyük düşük hücrelerin döngüden çıkarak G0 evresinde kalmalarını sağlar. Bunun için, donör hücreler Dulbecco's Modified Eagles Medium, % 10 FCS, % 10 newborn serum ve rekombinant human leukemia

*: Tekniklerle ilgili ayrıntılar (4,6,7)den alınmıştır.

inhibition factor içeren bir ortamda feeder fibroblast tabakası üzerinde 5-7 gün boyunca büyütülür. Daha sonra hücreler toplanıp yeni bir feeder tabakaya alınır ve aynı ortamda 2 gün daha büyütülürler ('exponential growth fazı'). Hücreler, daha sonra içinde %0.5 FCS bulunan ortamda 5 gün boyunca tutulurlar. Bu süre sonunda hücreler G0'da olup, transfer için hazır hale geçerler. Hücrelerin hücre döngüsünden çıktıkları antiPCNA/cyclin antikoruyla boyanmaları sonucu doğrulanır.

Kromozomların (çekirdeğin)

Yumurtadan Çıkarılması

Çok ince çekilmiş cam bir iğne yardımıyla döllenmemiş yumurtanın polar body kısmının üstüne rastlayan bölgesinde, zona pellusida' da bir kesik açılır. Yumurtalar içinde 5 µg/ml cytochalasin B bulunan PBS içine yerleştirilir. Yaklaşık 1 saat sonra polar body ve ona yakın olan ooplazm bir ince pipetle (uç çapı yaklaşık 30 µm olan) emilir. Bu şekilde yumurtaların %90'dan fazlası ooplazmanın yaklaşık yarısını içeren ve membranla kaplı iki yarıma ayrılabilir. Yarım oositler akrinin oranj ile boyanıp fluoresan mikroskopunda incelendiğinde polar body ile birlikte emilen yarımların yaklaşık % 75'inin oosit metafaz II kromozomlarını içerdiği bulunmuştur. Bunlara "çekirdekli" yumurta yarımları denilmektedir. Diğer yarımlar nükleer yapılar içermemekteydi ve bunlara da "çekirdeksiz" yumurta yarımları denildi. Embriyonik blastomerler, fetal hücreler veya meme hücreleri, Leitz mikromanipülatörü ve De Fonbrune mikroşırıngaları kullanılarak, çekirdekli veya çekirdeksiz yumurta yarımları içeren zona pellusida 'ya yerleştirilir.

Füzyon

a) Elektriksel yöntem: Yarım yumurtalar ve donör hücreler içeren zona pellusida, 0.3

M mannitol, 0.1 mM MgSO₄ ve 0.05 mM CaCl₂ içeren solüsyona bırakılıp 15-30 dakika tutulduktan sonra aynı ortam içinde elektrofüzyon aletinin kuyusuna (elektrodlar arası mesafe 200 µm) yerleştirilir. Sırasıyla; hücreleri dizmek için: 600 kHz, 6 V, 5-10 saniye; füzyon için üç kez ve 0.1 saniyelik aralıklarla ve 0.1 milisaniyelik süreyle 15 Voltluk doğru akım uygulanır; sonra voltaj 6 dan 0'a kadar bir dakika içinde azaltılır. Daha sonra embriyolar cytochalasin B içeren PBS içinde 37 derecede yaklaşık 1 saat süreyle tutulurlar.

b) Sendai virüs yöntemi: Donör hücreler inaktifleştirilmiş Sendai virüs süspanسیونuna (yaklaşık 1000 hemaglutinasyon ünitesi/ml PBS ve cytochalasin) içine konulup iki dakika tutulurlar ve hemen sonra yumurta yarımlarıyla birleştirilirler.

Füzyonu gerçekleştirilen embriyolar PBS içinde oda sıcaklığında tutulup, daha sonra agar içinde tutuklanıp diestrus durumunda bulunan koyunların bağlanmış 'oviduct'larına (yumurta kanalları) transfer edilir. 4-5 gün sonra embriyolar koyunlardan toplanıp yeni örneklenmiş gibi incelenip, normal şekilde organize olmuş blastomerler görüntüsünde olan embriyolar estrus dönemlerinin 6. veya 7. gününde olan koyunlara aktarılırlar.

Yeniden oluşturulan embriyonun gelişimi donör nükleus ile alıcı sitoplazma arasında etkileşmeye bağlıdır. Bu etkileşimde sitoplazmik kinaz aktivitesinin (maturation/mitosis/meiosis promoting factor (MPF) etkisi olup MPF yeniden oluşturulan embriyoda kromozom hasarları ve anöploidi sıklığını artırmaktadır.

Donör hücre siklusunun etkisini gidermek için MPF aktivitesinin kaybolmasını bekleyip daha sonra çekirdek transferi yapmalıyız. Bu işlem için önce alıcı, çekirdeksiz MII fazı oositlerini aktifleştirmek gerekmektedir. Bunun için oositler kal-

siyumsuz M2 mediumu, %10 FCS, 7.5 µg/ml cytochalasin B ve 5.0 µg/ml Hoechst 33342 içeren ortama konulup 37 derecede 20 dakika tutulur. Her birinden dış çapı 20 µm'lik ince bir cam pipetle 1. polar body'nin altından az miktarda sitoplazma çekilir. Nükleusun çıkarıldığı kontrolü, geriye kalan karyoplastın UV ile gözlenerek metafaz plağı içerip içermediğinin incelenmesiyle yapılır. Gonadotropin releasing hormon enjeksiyonundan 34-36 saat sonra nükleusları çıkarılmış olan oositler aktive edilirler. Aktivasyon, içinde 0.3 M mannitol, 0.1mM MgSO₄, 0.0005 mM CaCl₂ bulunan bir ortamda ve 80 mikrosaniye ile tek bir 1.25 kV/cm pulse verilerek yapılır. Oositler TC199, % 10 FCS ortamında 4-6 saat daha inkübe edildikten sonra tek tek kültüre alınmış hücrelerle füzyona sokulur. Füzyondan sonra tüm oosit/hücre çiftleri TC199, % 10 FCS, 7.5 µg/ml cytochalasin B ortamında 1 saat tutulurlar. Daha sonra cytochalasin B bulunmayan TC199, % 10 FCS'lu ortama aktarılıp geçici annelerine transfer edilinceye kadar tutulurlar.

MPF aktivitesinin verdiği hasardan kurtulmanın diğer bir alternatifi de, diploid nükleusu MPF aktivitesi yüksek olan metafaz II oositlerine aktarmaktır. Donör hücreleri (kültürde büyüyen) senkronize etmek için onları G0 fazına, yani quiescence (çoğalmayan fakat canlı hücreler) durumuna geçirmek gerekiyor. Quiescent hücre oluşturma yöntemi daha önce meme hücreleriyle ilgili olarak anlatılmıştı.

Klonlamayla ilgili çalışmaların kronolojik dizini*

1950 Boğa semeni taşınma ve daha sonra ineklerin döllenmesinde kullanılmak amacıyla -79' derecede başarıyla dondurularak kullanıldı.

- 1952 Hayvanlarda ilk klonlama kurbağalarda (*Rana pipiens*) yapıldı. Robert Briggs ve Thomas King erken embriyonik hücre çekirdeklerini çekirdeği çıkarılmış yumurtalara transfer ettiler. Çekirdek transferi yapılan yumurta hücrelerinden bazıları döllenmiş yumurtalar gibi bölündüler ve tetari (tadpole) aşamasına kadar farklılaştılar.
- 1959 Suni döllenme yoluyla ilk tavşan üretildi.
- 1962 John Gurdon kurbağa (*Xenopus laevis*) barsak hücrelerinden, çekirdeği çıkarılmış yumurta hücrelerine çekirdek transferi yaptı. Transfer yapılan hücrelerin yaklaşık %1'i gelişmesini sonuna kadar başararak olgun kurbağalar haline döndüler.
- 1970 Fare embriyoları kopyalandı.
- 1972 Bakteri ve maymun genlerinin ilk rekombinasyonu gerçekleştirildi. Dondurulmuş embriyolardan ilk fareler doğdu.
- 1973 Dondurulmuş embriyolardan ilk buzağı doğdu.
- 1974 Amerikada gen transfer çalışmalarını durdurmak için bir moratoryum imzalandı.
- 1975 Kaliforniya'da yapılan ünlü Asilomar toplantısında rekombinant DNA çalışmalarının sürdürülmesi kararları alındı.
- 1976 Clement Markert döllenmeden kısa bir süre sonra fareden yumurtaları çıkardı. Bu aşamada yumurta ve spermle gelen kromozomlar henüz karışmamış durumdaydı ve iki çekirdek te ayrı ayrı keseler içindeydi (pronükleuslar). Markert mikrocerrahi ile pronükleuslardan birini çıkardı ve kalan pronükleus replikasyon için uyarıldı. Oluşan embriyo daha sonra taşıyıcı bir dişi fareye aktarıldı ve taşıyıcı anneden yumurtanın alındığı fare ile aynı özelliklerde olan bir fare doğdu.
- 1977 Peter C. Hoppe ve Karl Illmensee benzer şekilde çalıştılar fakat döllenmiş yumurtadan erkek fareden gelen pronükleusları çıkararak donör dişinin özelliklerinde

*: Kronolojik dizin Bilim Teknik, Newsweek gibi dergilerle, Genetics⁽¹¹⁾, Recombinant DNA⁽¹²⁾, Principles of Genetics⁽¹³⁾ gibi ders kitaplarından ve çeşitli dergilerde yayımlanmış makalelerden yararlanılarak hazırlanmıştır.

yedi dişi fare oluşumunu sağladılar.

İnsan büyüme hormonu somatostatin bakteride sentezletildi.

Somatostatin hipotalamus tarafından sentezlenen, büyüme ve gelişmenin düzenlenmesinde görevi olan bir hormondur. 14 amino asitten oluşur:

Met. Ala. Gly. Cys. Lys. Asn. Phe. Phe. Trp. Lys.

Thr. Phe. Thr. Ser. Cys. **Stop. Stop** Metionin ve stop kodonları bu hormonun sentezlenmesini sağlamak için, kimyasal sentez yoluyla oluşturulan sentetik gene yerleştirilmiş olup, metionin daha sonra kimyasal yolla hormondan uzaklaştırılmaktadır. Somatostatin eğer sentetik yolla 14 amino asiti yanyana getirerek yapılmaya çalışılsa 1 miligramının maliyeti yaklaşık 50.000 dolar yani 6 milyar lira civarında olacaktır. 1977 yılında bu genin sentetik yolla yapılıp klonlanmasından sonra maliyeti çok büyük miktarlarda düşmüştür.

1978 İnsanlarda ilk in vitro fertilizasyon (tüp bebek yöntemi) yoluyla gerçekleştirilen bebek doğdu. Bebeğin adı: Louise Joy Brown. (Çalışmayı yürütenler: Fizyolog **Patrick Steptoe** ve Jinekolog **R.G. Edwards**).

1979 Koyun embriyoları klonlandı.

1980 Sığır embriyoları klonlandı.

1982 Rat büyüme hormonu geni aktarılan ilk dev fare elde edildi.

1983 James McGrath ve Davor Solter, nükleer transfer yöntemiyle, memelilerde ilk klonlama işlemi başardılar. Yetmişüç fare embriyo hücresi çekirdeğinden altmışsekizi (% 93) çekirdeği çıkarılmış fare yumurtalarına aktarıldı. Bunlardan altmışdört tanesi blastosist haline gelişti ve pseudopregnant taşıyıcı dişi farelere aktarıldılar. Taşıyıcı aneler on adet fare yavrusu doğurdu. Bunlardan yedi tanesi yetişkin hale geldi ve donor çekirdeğin alındığı annenin kürk rengi ile aynı renkte kürklere sahipti. Bunların da beş tanesi fertil (üretken) olurken

iki tanesi infertil bulundu.

G.E. Seidel⁽⁸⁾ mikrocerrahi ile at ve sığır embriyolarını iki hücreli ve dört hücreli dönemlerde bölerek, her bir hücreyi alıcı dişi hayvanlara yerleştirdi ve genetik olarak aynı olan klonlar elde etti. Seidal'ın amacı çevresel etkilere direnç yada duyarlılığı çalışabilmek için bir klonlar topluluğu elde etmekte.

İlk rekombinant tütün bitkisi yetiştirildi.

David Rorvik insanın klonlanmasıyla ilgili bilim kurgu kitabını yazdı. "**In His Image**"

Doğal anneden, sütanneye (foster mother) ilk embriyo transferi yapıldı.

Bir kadın, başka bir kadından alınıp kocasının spermeleriyle döllenmiş yumurtadan bir bebek doğurdu.

1984 Avustralya'da dondurulmuş bir embriyodan Zoe doğdu.

1985 İnsan Büyüme Hormonu üreten ilk transjenik domuz elde edildi (**Ralph Brinster** tarafından).

1986 Kendisine embriyo transferi yapılan (artificially inseminated) kiralık sütanne Mary Beth Whitehead bebek M'yi doğurur ve sahiplenmek ister; mahkeme bu isteği reddeder.

Ateş böceğinden lusiferaz geni aktarılarak ışıldayan tütün bitkisi elde edildi.

1987 **Lothar Hennighausen** ve arkadaşları insan doku plazminojen aktivatörü genini, farenin beta-laktoglobulin geni promoter'inin kontrolünde olarak farelere aktarmayı başarmış ve insan proteini fare sütünden elde edilebilmiştir.

A. John Clark benzer bir çalışma yapmış ve koyun beta-laktoglobulin gen ürünü, fare sütünden oldukça yüksek verimle (1 litre fare sütünde 23 gr koyun beta-laktoglobulin proteini) elde edilebilmiştir.

1990 **Genie**, sütünde insan proteini (Protein C) bulunduran ilk domuz üretildi. Protein C pıhtılaşmayı kontrol eden bir proteindir ve

faktör VIII ve faktör IX örneklerinde olduğu gibi bazı hastalar bu proteince fakirdir. Eklem replasman operasyonları geçiren hastalar da protein C'den yararlanabilirler. Domuz, koyun, keçi ve ineklere göre avantajları daha fazla olan bir hayvandır: a) Hamilelik süresi kısadır (4 ay), b) Generasyon süresi kısadır (12 ay), c) Yavru sayısı fazladır (10-12 yavru), d) Laktasyon durumundaki bir domuzdan yılda 300 litre civarında süt alınabilir. **William H. Velande**, **Henryk Lubon** ve **William N. Drohan** insan protein C geninin başına, farede major süt proteinlerinden biri olan "whey acidic protein"ini kodlayan genin promoter'ini getirdiler ve bu promoter-protein C hibrit molekülü fare embriyolarına enjekte ettiler. Bu şekilde oluşturulan transjenik farelerin sütünde protein C bulunmaktaydı. Bu grup daha sonra fare embriyoları yerine domuz embriyosu kullandı. İçlerine, whey acidic protein geni promoterine bağlı protein C geni enjekte edilen [DNA, erkek pronükleusun (spermle gelen nükleus) bulunduğu bölgeye mikroenjeksiyonla verilmektedir] döllenmiş yumurtalar (domuz embriyoları) taşıyıcı dişi domuza implante edildiler. 4 ay sonra hücrelerinde protein C geni bulunan dişi bir yavru domuz doğdu. Adı Genie olan bu domuz 1 yaşını doldurduğunda hamile kalıp, 4 ay sonra doğum yaptı ve süt vermeye başladı. Genie'nin 1 litre sütünde 1 gr kadar protein C bulunuyordu, ki bu miktar insan kan plazmasındaki normal değerden 200 misli daha yüksektir. Genie'den elde edilen proteinin biyolojik olarak aktif olduğu bulundu. Protein C üzerinde insan hücrelerince yapılan post-translasyonel modifikasyonların aynısı veya benzerleri domuzlarda da yapılmakta ki bu protein aktif olabilsin. Daha sonraki çalışmalarda modifikasyonla ilgili enzimlerin bazılarının domuzda daha az aktif olduğu ve bu nedenle yeter düzeyde

üretilen protein C'nin yetersiz modifikasyondan dolayı daha az aktif olduğu gösterilmiştir. Bu nedenle, bu enzimleri kodlayan genler Genie'ye aktarılmış ve Genie'nin sütünden daha aktif protein C elde edilebilmiştir.

- 1993 Dinazorlar klonlandı. Jurassic Park. [Şaka:] George Washington Üniversitesi'nden Dr. **Jerry Hall** ve Dr. **Robert Stillman** ilk insan embriyosunu klonladılar.
- 1994 İlk kez bir transjenik domates tüketilmek üzere pazara sürüldü (ABD'de) Bu gün için yirmiyeye yakın transjenik bitki aynı ülkede piyasaya sürülmüştür. Louisville Hayvanat Bahçesinde dişi bir at sütannelik yaparak tüp bebek yoluyla oluşturulan zebra embriyosunu büyütüp, doğurdu ve besledi.
- 1996 İlk tüp bebek goril, Timu, doğdu. Cincinnati Hayvanat Bahçesi.
- 1996 **Ian Wilmut** ve arkadaşları birbiriyle aynı olan Megan and Morag isimli kuzuları klonladılar
- 1997 **Dolly**'nin doğumu (**Ian Wilmut** ve **Keith Campbell** grubu). İki rhesus maymunu klonlandı (**Don Wolf** ve grubu: Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, A.B.D.)

DNA Çalışmalarında Önemli Gelişmelerden Bazıları

- 1975 DNA dizisi belirlenen ilk molekül: ΦX174 virus DNA'sı (5.386 bp)⁽⁹⁾
- 1977 DNA dizisi belirlenen ilk memeli virus DNA'sı: SV40 (5.243 bp)
- 1981 İnsan mitokondriyel DNA'sının dizisi belirlendi (16.569 bp).
- 1982 Lambda faj DNA'sının dizisi belirlendi (48.500 bp)
- 1990 Herpes simplex virus DNA'sının dizisi belirlendi (250.000 bp)
- 1995 *Haemophilus influenzae* genomunun tamamının (1.800.000 nükleotid çifti) nükleotid

dizisi belirlendi.

1996 *Saccharomyces cerevisiae* (yeast: bira mayası) genomunun tamamının nükleotid dizisi belirlendi. 96 araştırma laboratuvarının oluşturduğu bir konsorsiyumun çalışmaları sonunda 12.500.000 nükleotid çiftinin (6000 gen) dizilişi bulundu. Bu çalışma sonunda 2000 yeni gen keşfedildi. Bu proje 1989'da başlatılmıştı. Şimdi, EU-ROFAN Projesi ile (7.7 milyon ECU'lık ve 144 laboratuvar katılıyor) yeni keşfedilen genlerin fonksiyonları belirlenecek.

1997 X kromozomunun 160 milyonluk nükleotid dizisi tamamlanmış durumda.

Yukarıdaki gelişmeler dışında Ocak 1997 sonu itibariyle genomları tamamlanan organizmalar ve genom uzunlukları (parentez içinde ve milyon baz çifti olarak) şunlardır: *M. genitalium* (0.6), *Methanobacterium* (13.2), *M. jannaschii* (1.8), *Synechocystis* SPC6803 (3.57), *M. thermoautophicum* (1.7), *H. pylori* (1.7) ve *M. pneumoniae* (0.8). Bunlara ilaveten İnsan Genom Projesi çerçevesinde çalışmaları devam eden organizmalar ise şunlardır: *H. sapiens*, *A. thaliana*, *E. coli*, *B. subtilis*, *D. melanogaster*, *C. elegans*, *R. norvegicus* ve *M. musculus*⁽¹⁰⁾.

Moleküler biyoloji/genetik alanında son yıllarda yaşanan önemli gelişmeler

"Knockout" mice : Bir yada birden fazla geni inaktif hale getirilmiş fareler. Model organizma olarak genlerin etkilerini anlamak ve gen tedavisi protokollerini geliştirmek amacıyla kullanılıyorlar⁽¹⁴⁾. Örnekler :

- 1) apoE genleri yönlendirilmiş mutagenesis yoluyla çalışamaz hale getirilen farelerde kolesterol seviyesi yüksek bulunmuştur (tip III hiperlipo-proteinemi). Bu farelere öldürücü doz radyasyon verilip, apo E +/- farelerden kemik iliği transplantasyonu yapılmış ve serumlarındaki apo E düzeyi normalin %

12.5'i kadar bulunmuştur. Bu düzeydeki apoE, serum kolesterol düzeyini normale yakın bir seviyede tutabilmiştir⁽¹⁵⁾.

- 2) Kistik fibrozisli fare: Kistik fibrosis geni, Cftr, 230.000 bp uzunluğunda olup, yaklaşık 170 kDa ağırlığında bir proteini (Cistik fibrosis transmembrane conductance regulator protein) kodlar. Fare Cftr geni insan Cftr genine çok benzemektedir. İki genin kodladığı proteinler benzer olup, taşıdıkları 1480 amino asitin % 78 aynıdır⁽¹⁶⁾.

Gen tedavisi: Genetik hastalıklar veya AIDS ve kanser gibi ölümcül hastalıkların tedavisinde, ya eksik olan genler, ya da, bazı savunma sistemlerini daha etkili çalıştırabilmek için gerekli olan proteinleri kodlayan genler hastalara verilmektedir:

- 1) Balon anjioplastisinden sonra, gözlenen restenozis problemini çözmek için, ilgili bölgeye Rb (retinoblastoma) geni verilmektedir. Arteriyel yaralanmaya müteakip vasküler düz kas hücrelerinin proliferasyonunu engellemek için Rb geni veriliyor. Düz kas hücreleri (Smooth muscle cells) Rb geni taşıyan adenovirus vektörüyle enfekte edildiklerinde kas hücrelerinin proliferasyonu durmakta ve DNA sentezi % 90'dan büyük büyük bir oranda düşmektedir⁽¹⁷⁾.
- 2) Kanser tedavisinde p53 ve p16 genleriyle replasman tedavisi yapılmaktadır^(18,19).
- 3) İmmün sistemi güçlendirmek için, IL-12 (interleukin-12), IL-4 genleri transfer ediliyor⁽²⁰⁾.
- 4) Tümör hücrelerine herpes simplex timidin kinaz geni aktararak, bunları gancyclovir ile öldürme denemeleri yapılmaktadır⁽²¹⁾.
- 5) Eritropoiezis prosesini güçlendirmek (beta

thalassemili ve orak hücre anemili hastalarda) için eritropoietin hormonu geni verilmektedir⁽²²⁾.

Gen hedefleme (Gene targeting) : Homolog rekombinasyon yoluyla, başarısız genin başarılı kopyası ile değiştirilmesi yapılabilmektedir⁽²³⁾.

İnsansı monoklonal antikorlar: Rekombinant DNA teknolojisi yoluyla insanlarda kullanılacak olan değişik hayvanlardan elde edilen monoklonal antikorların insan antikorlarına benzer hale getirilebiliyor ve bu sayede vücudun daha kolay tolere edebilmesi mümkün oluyor. Örneğin, ucuna toksin takılmış bir monoklonal antikor, sadece antijen bağlama bölgesi itibarıyla alındığı hayvan antikorlarına, diğer bölgeleri itibarıyla da insan antikorlarına benzetilmiş ise, kanser tedavisinde aynı hasta üzerinde tekrar tekrar kullanılacak olan bu antikora karşı hastanın vücudunun vereceği immün yanıt, vücudun saf hayvan antikoruna vereceği immün yanıtı göre çok daha az şiddette olacaktır⁽²⁴⁾.

Genetik aşı: DNA yoluyla genetik immünizasyon. Örnek: HIV aşısı olarak fare, maymun ve şempanzelere gp160 ve gp120 genleri, doğrudan, DNA olarak "gene gun"(gen tabancası) ile veriliyor. Fare ve maymunlara sıtma hastalığına karşı plasmodium genleri veriliyor. Benzer şekilde, leishmaniasis, siştosomiazis, influenza, hepatit B (surface antigen), hepatic C (Core protein), herpes (glikoprotein veya nükleoprotein; immün yanıtın tüm spektrumu gözleniyor: humoral ve hücresel; ve %80-100 korunma sağlıyor), genital wartlar (tavşanlarda deniyor ve papilloma virüsünün L1 major kapsid proteini geni veriliyor), tuberküloz (hsp 65) ve kan-

sere (insan: HLA-B7 geni, 5 hastada faz I/II denemesi yapılıyor) karşı genetik aşı uygulamaları başlatılmış durumdadır^(25,26).

Antisens teknolojisi: Hücrelerde çalışması istenilmeyen genlerin transkriplerini (mRNA'larını) inaktif hale geçirmek için katyonik(pozitif yüklü) lipidlerle antisens oligonükleotidlerin (mRNA'lara komplementer olan) hücrelere verilmesi. Hedef genler olarak HIV genleri ile vücudumuzdaki onkogenler düşünülmektedir⁽²⁷⁾.

Bakteri DNA'sı iyi bir immün uyarıcı olarak bulundu. Bakteri DNA'sında CpG bölgeleri metillenmemiş durumda bulunurken, memeli DNA'larında yer alan CpG bölgeleri metillenmiştir. CpG bölgelerindeki Sitozinlerin metillenmiş oluşu nedeniyle memeli DNA'ları immüностimulant olarak etkisizdir. Viral DNA'lar, CpG dinükleotidleri açısından, bakteri DNA'larına göre daha fakir olduklarından immüностimulant olarak daha az etkilidirler⁽²⁸⁾.

Transjenik hayvanlar (Transgenic animals): Transplantasyon, önemli bir ürünün daha ucuz ve daha çok miktarda üretilmesi veya genlerin çalışmalarını anlamak maksadıyla kullanılabilirler. Transplantasyon için insana en yakın hayvan gorildir. Fakat gorillerin nesli tükenmekte olduğundan bu maksatla kullanılmaları uygun değildir. İkinci derecede yakın olan babunun ise, taşıyabileceği Simian Immunodeficiency Virus (SIV) ile xenozonozise yol açabileceği için transplantasyonlarda kullanılması risklidir. Babunlara alternatif olarak domuzlar kullanılabilir. Örneğin domuzun kalbi hacmi ve fizyolojisi itibarıyla insan kalbine oldukça benzemektedir^(29,30).

Geliş tarihi: 03.03.1997

Yayına kabul tarihi: 05.03.1997

Yazışma adresi:

Prof.Dr.Hasan BAĞCI
Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı
55139 Kurupelit/SAMSUN

KAYNAKLAR

1. Gurdon JB. Transplanted nuclei and cellular differentiation. *Scientific American* 1968; 219: 24-35.
3. Pennisi E and Williams N. Will Dolly Send in the Clones? *Science* 1997; 275: 1415-1416.
2. Fraley R, and Schell J. "Plant Biotechnology". *Curr. Opinion Biotechnol.* 1991; 2: 145-210.
4. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, et al. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 1997; 383: 810-813.
5. Finch LMB et al. Primary culture of ovine mammary epithelial cells. *Biochem. Soc. Trans.* 1996; 24: 3695.
6. Campbell KHS, McWhir J, Ritchie, et al. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature* 1996; 380: 64-66.
7. Willadsen SM. Nuclear transplantation in sheep embryos. *Nature* 1986; 320: 63-65.
8. Seidal GE. Production of genetically identical sets of mammals: Cloning? *J Exp Zoology* 1983; 228: 347-354.
9. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of the ϕ X174 DNA. *Nature* 1977; 265: 687-695.
10. Rodriguez-Tome P, and Merino-Caminero C. *Genome Progress-January 1997. Genes and Function* 1997; 1(1): 85.
11. Weaver RF and Hedrick PW, eds. *Genetics*, 2nd Edition, Dubuque, Wm. C. Brown, 1992.
12. Watson JD, Witkowski J, Gilman M and Zoller M, eds. *Recombinant DNA*. New York, Scientific American Books, 1992.
13. Tamarin RH. *Principles of Genetics*. 4 th ed. Dubuque, Wm. C. Brown Publishers; 1993.
14. Majzoub JA and Muglia LJ. Molecular medicine: Knockout mice. *N Engl J Med.* 1996; 334: 904-907.
15. Linton MF, Atkinson JB and Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995; 267: 1034-1037.
16. Dickinson P, Dorin JR and Porteous DJ. Modelling cystic fibrosis in the mouse. *Mol Med Today* 1995; 1: 140-148.
17. Chang MW et al. Gene therapy for restanosis: retinoblastoma to the rescue. *Science* 1995; 267: 518-522.
18. Cairns P, Mao L, Merlo A, et al. Rates of p16 (MTS1) mutations in primary tumors with 9p loss. *Science* 1994; 265: 415-416.
19. Fricker J. Hepatocellular carcinoma and p53 gene therapy. *Mol Med Today* 1996; 2: 361.
20. Rakhmilevich AL et al. IL-12 anticancer gene therapy: magic bullets from a golden gun. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 6291-6296.
21. Caruso M. Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol Med Today* 1996; 2: 212-217.
22. Naffakh N and Danos O. Gene transfer for erythropoiesis enhancement. *Mol Med Today* 1996; 2: 343-348.
23. Smith AJH, et al. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nature Genet.* 1995; 9: 376-385.
24. Brinkman U. Recombinant immunotoxins: protein engineering for cancer therapy. *Mol Med Today* 1996; 2: 439-446.
25. Maurice J. Gene vaccines. *Mol Med Today* 1995; 1: 64-71.
26. Weiner DB. New vaccine strategies. *Mol Med Today* 1995; 1: 108-109.
27. Wagner RW and Flanagan WM. Antisense technology and prospects for therapy of viral infection and cancer. *Mol Med Today* 1997; 3: 31-38.
28. Klinman DM et al. Bacterial DNA as a potent immunostimulant. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 2879-2883.
29. Otterbach B and Stoffel W. Transgenic mouse is a knockout model of Neimann-Pick disease. *Cell* 1995; 81: 1053-1061.
30. Rowe PM. Xenotransplantation: from animal facility to the clinic. *Mol Med Today* 1996; 2: 10-15.

