

TRANSGENİK BİYOREAKTÖRLERDE REKOMBİNANT PROTEİNLERİN ÜRETİMİ

Haydar BAĞIŞ*

Production of recombinant proteins in transgenic bioreactors

Summary: Transgenic animals carry a foreign recombinant gene in their genomes. The first transgenic mice which were produced by pronuclear DNA microinjection for modelling some human diseases have been reported in 1980. However, when the target is especially to use these transgenic animals as *protein producing factories* and to obtain a recombinant product of transgene in large amounts, all transgenic studies would gain a special point of view this time. The main purpose in this area is to produce recombinant proteins having medical and commercial value in large amounts. In these studies, transgene is expressed in certain tissues such as mammary cells with assistance DNA control elements called promotor. Thus, the targeted recombinant protein can be obtained from the transgenic animal's milk or urine. Under these circumstances, it would be clear that a transgenic mouse's milk amount is not enough for this aim. Because of that, transgenic animals which will be used for producing recombinant proteins in their milk must be chosen from among the livestock. In the first step of this technique, in vitro maturation and in vitro fertilization of unmaturred oocytes obtained from the ovaries which were recovered from the slaughterhouse were performed. After that, 2 pico litres of gene construct (transgene) in 2-4 ng/ul concentration is transferred into the pronucleus of zygotes. By the sex determination of morula or blastocyst stage embryos, the females are identified to guaranty to get milk yield. The next step is to transfer the female embryos into the foster mothers. Transgenic pups are determined by some molecular techniques such as PCR and Southern Blot. About one tone of recombinant protein is obtained in a year and these proteins much more pure and hygenic than obtained in dead human tissues.

Key Words: Transgenic animal, bioreactor, recombinant protein, microinjection, milk.

Özet: Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlardır. Mikroenjeksiyon tekniği ile üretilen ve daha çok hastalık modellemesi amacıyla geliştirilen transgenik farelerin ilki 1980 yılında yayınlanmıştır. Fakat, özellikle transfer edilen genin ürününün elde edilmesi, yani, transgenik hayvanların bir çeşit "protein üreten fabrika" olarak kullanılması hedeflendiğinde bu alandaki çalışmalar da farklı bir boyut kazanmıştır. Temel amaç, elde edilecek ürünün -ki bu ürün terapötik değere sahiptir ve tıbbi açıdan son derece değerlidir- bol miktarda ve mümkün olduğunca saf olarak kazanılmasıdır. Aktarılan rekombinant genin (transgenin) ekspresyonunun, promotor gibi gen ekspresyonunu kontrol edici dizilerin yardımıyla transgenik hayvanın belirli dokularına yönlendirilmesi ve böylece hedef proteinin süt ve idrar gibi vücut sıvılarından salgılanmasının sağlanması çalışmaları, çok az süt verdiklerinden dolayı farelerin bu amaç için uygun olmadığını açıkça ortaya koymuştur. Varılan nokta, rekombinant proteinlerin üretil-

* TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, Transgen ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı, Gebze/Kocaeli (haydar@rigeb.gov.tr)

mesinde kullanılacak transgenik hayvanların, bol süt veren çiftlik hayvanlarından seçilmesi gerekliliği olmuştur. Tekniğin ilk adımında, mezbaha materyalinden veya ovaryumlardan oosit pick-up (OPU) ile elde edilen olgunlaşmamış oositlerin in vitro maturasyonu ve in vitro fertilizasyonu gerçekleştirilmektedir. Daha sonra, pronükleer dönemde bulunan zigotlara mikroenjeksiyon yöntemi ile 2-4 ng/ul konsantrasyonda gen konstruktundan (transgen) 2 piko litre verilmektedir. Süt alınması temel şart olduğundan, in vitro kültür ortamında morula ya da blastosist aşamasına gelen embriyolara sex tayini yapılarak dişi olanlar belirlenir. Sonraki adım, dişi embriyoların taşıyıcı annelere transfer edilmeleridir. Doğan yavrular arasında transgenik olanlar çeşitli moleküler biyolojik yöntemlerle (PCR, Southern Blot) saptanır. Transgenik çiftlik hayvanlarının üretimi ile yılda 1 tona yakın rekombinant protein, ölü insan dokularındakinden çok daha saf, hijyenik ve bol miktarda elde edilebilmektedir.

Anahtar Kelimeler: Transgenik hayvan, biyoreaktör, rekombinant protein, mikroenjeksiyon, süt.

Giriş

Transgenik (Tg) hayvanların üretim tekniklerindeki gelişmeler biyoloji, tıp ve veteriner hekimliği alanındaki araştırmalar için çok sayıda yeni fırsatlar sağlamaktadır. Transgen teknolojisi aynı zamanda tarım, hayvan ve insan sağlığını içeren diğer alanlarda da önemli açılımlara sahiptir. Kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlara transgenik hayvanlar denir (21). Gen transferi, bir hücreli dönemdeki fertilize oositlerin (zigotların) pronukleuslarına mikroenjeksiyon tekniği ile yapılır ve transfer edilen gen (transgen) embriyonun genomu içerisinde rastgele bir yere yerleşir. Bu rastgele gerçekleşen integrasyonun moleküler mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir (3). Mikroenjeksiyon tekniği ile üretilen ilk transgenik fare ile ilgili makale 1980 yılında yayınlanmıştır (21). O zamandan günümüze kadar yüzlerce transgenik fare hattı üretilmiştir (4, 16, 21, 26, 34, 37). Transgenik fareler, genlerin fonksiyonlarının ve gen regülasyonlarının canlı hayvanda çalışmasına olanak sağlamaları bakımından diğer sistemlere göre daha üstün avantajlar sunmaktadırlar (9).

Transgenik kemirgenler, gen regülasyonu üzerindeki temel çalışmaların yanı sıra, insanlarda görülen birçok hastalıkların hayvan modelleri olarak da kullanılmaktadırlar (alzheimer, cystic fibrosis, AIDS, atherosclerosis, obesity vs.) (10, 17, 41). Uygun yöntemlerle kanser, metabolik ya da dejeneratif hastalıkların hemen hemen tümü için transgenik fare modelleri geliştirilebilmektedir. Bunlardan başka, transgenik hayvanlar organ naklinde (28), gen terapisinde kullanılması düşünülen bazı vektörlerin araştırılmasında ve tıbbi öneme sahip bazı rekombinant proteinlerin süt, idrar ve kan gibi çeşitli dokularda üretilmesinde de kullanılmaktadır (5, 6, 11). Çeşitli rekombinant proteinlerin sözü edilen dokularda sentezlenmesi amacıyla üretilen transgenik hayvanlara "*biyoreaktörler*" adı verilmektedir (43). Bu güne kadar 50-55 rekombinant proteinin transgenik fare, rat, tavşan, keçi, koyun, domuz ve ineklerin sütünde salınımları sağlanmıştır (Tablo 1). Bu derlemede, biyofarmasötik öneme sahip olan rekombinant proteinlerin transgenik biyoreaktörlerde üretimi üzerinde durulacaktır.

Niçin transgenik hayvanları biyoreaktör olarak kullanmalıyız?

Rekombinant proteinlerin üretimi için çok farklı sistemler kullanılmıştır. Bu proteinlerin üretimi için, bakteriler, mayalar, mantarlar, transgenik bitkiler, baculoviruslar, memeli hücreleri ve transgenik hayvanlar kullanılmıştır (13, 18). Ancak, bu üretim sis-

Tablo 1. Bazı hayvanların sütünde eksprese edilen biyolojik olarak aktif proteinler

Eksprese olan proteinler	Hayvan	Promotör	Ekspresyon Düzeyi
İnsan büyüme hormonu	Keçi	Retroviral promotör	12 ng/ml
İnsan long-acting tPA	Keçi	Caprine β -casein	3.5-8.0 mg/ml
İnsan protein C	Domuz	Murine WAP	1 mg/ml
İnsan α -antitrypsin	Koyun	Ovine β -laktoglobulin	35 mg/ml
İnsan α 1-proteinaz	Keçi	Caprine β -casein	20 mg/ml
İnsan antitrombin III	Keçi	Caprine β -casein	20 mg/ml
İnsan faktör VIII	Koyun	Ovine β -laktoglobulin	Veri Yok
İnsan faktör IX	Koyun	Ovine β -laktoglobulin	5 mg/ml
İnsan fibrinogen	Koyun	Ovine β -laktoglobulin	5 mg/ml
Kolon kanser MAb	Keçi	Caprine β -casein	10 mg/ml
İnsan laktoferrin	İnek	Bovine α s1-casein	Veri Yok
Alfa-1 proteinaz inhibitör	Fare	50 g/l	
İnsan büyüme hormonu	Fare	5 g/l	
İnsan serum albumin	Fare	35 g/l	
Pro-insülin	Fare	20 g/l	
Prolaktin	Fare	3 g/l	

temlerinin bazılarında post-translasyonel (translasyon sonrası) modifikasyon sistemleri mevcut olmadığından veya yetersiz olduğundan dolayı yabancı proteinlerin üretimi ya mümkün olamaz veya miktarı az olur. Örneğin, bakterilerde bazı post-translasyonel modifikasyon sistemleri mevcut olmadığından (özellikle glikolizasyon mekanizmasının olmayışı gibi) bazı rekombinant proteinlerin üretilmesi bunlarda mümkün değildir (7, 13).

Transgenik hayvanlar ile memeli hücre sistemleri üretim açısından karşılaştırıldığında transgenik hayvanların miktar açısından dört misli daha fazla üretim kapasitesine sahip olduğu bildirilmektedir. Bu nedenlerden dolayı, transgenik hayvanlar yabancı proteinlerin üretimi için alternatif bir üretim sistemi oluşturmuşlardır.

Transgenik laboratuvar hayvanlarının sütünde rekombinant proteinlerin üretimi

Transgenik çalışmalarda, laboratuvar faresi ideal hayvandır. Kısa doğum süreleri (19-20 gün), çok yavru vermeleri (10-12 adet), yavruların hızlı bir şekilde büyümeleri, kısa emzirme dönemleri (21 gün) ve transgen yüzdelerinin yüksek olması nedeniyle kullanılırlar. Herhangi bir gen konstraktı kullanılarak transgenik çiftlik hayvanı elde etmeden önce, bu genleri taşıyan transgenik fareler üretilerek gen ile ilgili gereken kontroller yapılır. Transgenik biyoreaktörlerin elde edilmesinde uygulanan en temel yol, süt, idrar ve kan gibi vücut salgılarında rekombinant proteinlerin üretilmesidir.

Transgenik hayvanlarda bu proteinlerin salınımı meme bezi, tükürük bezi ve idrar kesesinde gerçekleştirilir (12, 30). Bu proteinlerin üretimi için, dokuya özgü güçlü promotörlere ihtiyaç vardır (9). Bunlardan bazıları, koyun β -laktoglobulin, fare, rat, tavşan

ve keçi whey asid protein (WAP), inek α -s1 kazein, rat, tavşan ve keçi b-kazein, gunea pig, koyun, keçi ve inek α -lactalbumin gibi promotorlardır. Bu güçlü promotorlar, rekombinant proteinlerin sadece hedef dokularda (süt, kan ve idrar) salınmasını sağlarlar (27). Doğal haldeki süt protein geninin ya da bu genin düzenleyici dizisiyle birleştirilmiş füzyon genin ekspresyonunu, türler arasında bile meme bezine yönlendiren ve süt protein genlerinin 5' (dokuya özgü transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgesi) (42) ve 3' ucunda yer alan translasyona katılmayan bölgelerde kısa korunmuş diziler içerildiği bilinmektedir (48). Hedef dokuya özgü bu tür düzenleyici DNA dizilerinin kullanılmasıyla herhangi bir genin ekspresyonu istenilen dokuda gerçekleştirilebilir (30).

Süt bileşenlerinin genetik modifikasyonu, meme bezine spesifik düzenleyici diziler aracılığıyla ilgili yapısal genlerin yönlendirilebildiği füzyon genlerin oluşturulması stratejisine dayanmaktadır. Transgenik domuzların meme bezinde kemirgen whey asidik protein geninin ve transgenik farelerde koyun β -laktoglobulinin yeterli düzeyde ekspresyonunun sağlandığı örneklerde olduğu gibi, hayvanların normalde sahip olmadıkları genlerin ürünü olan süt proteinleri, farklı türlerin meme bezlerinde eksprese edilebilmektedir. Örneğin, insan doku plazminojen aktivatörü (22), insan ürokinazı (31), insan büyüme hormonu (23, 38) ve insan α 1-antitripsin gibi birçok farmasötik protein biyoreaktör farelerin meme bezinde üretilmiştir (1). Günde sadece birkaç damla süt üretmelerinden dolayı farelerin biyoreaktör olarak kullanımları oldukça güçtür. Fakat, iki yüz adet süt üreten fareden ham rekombinant protein (insan büyüme hormonu gibi) üretimi, meme bezinin disseksiyonuyla ve bunların soğukta birkaç saat süreyle inkübe edilmesiyle 1 grama kadar varan miktarlara yükseltilebilir (43). Tavşanlar ise süt verimleri endüstriyel uygulama sınırları içerisinde olduğundan biyoreaktör olarak kullanılabilirler ve günlük süt üretimleri dişi başına yaklaşık 100 gramdır. Ayrıca, kısa gebelik süresi (30 gün), çok sayıda yavru (onbeşe kadar) ve sütün yüksek protein içeriği (sığırınkinin üç katı) transgenik tavşanların biyoreaktör olarak kullanımını sağlayan diğer avantajlardır.

Transfer edilen genin ekspresyon düzeyinin (tavşan β -kazein promotörünün kontrolü altında) düşük olmasına rağmen, araştırmacılar süt veren tavşanların biyoreaktör olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Bu bağlamda, insan interlökin-2 proteini ve insan doku plazminojen aktivatörü transgenik tavşanların sütlerinde eksprese edilmiştir (5, 39). Transgenik biyoreaktörlerde salgılanan rekombinant proteinler genellikle proteolitik yıkımlanmaya karşı dayanıklıdır ve çok miktarda elde edilebilirler. Bu bize şimdiye kadar insan materyalinden ya da yetersiz hücre kültürlerinden üretilen proteinleri sınırsız miktarda üretme imkânını sağlamaktadır. Transgenik hayvanların vücut sıvılarından elde edilen rekombinant proteinler insan plazmasından elde edilenlerden çok daha saftır ve insan infeksiyon ajanlarını barındırmamaktadır (hepatit B ve C, HIV ve AIDS) (52). Saflaştırma aşamasında viral inaktivasyon yapılması, transgenik hayvanların spesifik patojen-free şartlarda barındırılması ve üretim standartlarına uyulmasıyla rekombinant proteinler çok saf ve temiz olarak elde edilebilmekte ve böylece ürün kaliteleri yükseltilebilmektedir. Tablo 1'de gösterildiği gibi, insan plazmasında sadece eser miktarda bulunan proteinler, transgenik biyoreaktörlerde endojen düzeylerinin 100-500 katı oranında üretilmektedir. Alınan sonuçlar insan Factor VIII (kanın pıhtılaşmasını sağlayan mekanizmada rol oynayan proteinlerden biri) gibi üretilmesi çok zor olan proteinle-

rin bile transgenik biyoreaktörlerin meme bezinde sentezlenebileceğini göstermiştir (24).

Niçin transgenik çiftlik hayvanlarını biyoreaktör olarak kullanmalıyız?

Transgenin meme bezine spesifik ekspresyonunun fizibilitesi çok sayıda transgenik fare ve aynı zamanda bazı tavşan modellerinin üretimiyle gösterilmiştir (1, 5). Ancak, daha önce de değinildiği gibi, kemirgenler yeterli miktarda süt üretmedikleri için biyoreaktör olarak kullanılmamakta, bu hayvanlardan sadece füzyon genin fonksiyonunu ve ekspresyon verimliliğini değerlendirmek için test modelleri olarak yararlanılmaktadır (18).

Transgenik hayvanların sütünden yüksek miktarda rekombinant protein elde edilebilmesi amaçlanıyorsa hedef, bol miktarda süt veren laktasyon süreleri uzun inek ve keçi gibi transgenik çiftlik hayvanlarını üretmek olmalıdır. Transgenik çiftlik hayvanlarının meme epitel hücrelerinde farmasötik, terapötik ya da endüstriyel öneme sahip bazı rekombinant proteinlerin ekspresyonları sağlanmıştır (2, 20, 29, 49). Böylece, bu hayvanlar sütlerinde gen ürünlerini sınırsız miktarda üretebileceklerdir. Transgenik hayvanların sütlerinde rekombinant proteinlerin üretimi alanında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir (Tablo 1). Özellikle insan faktör IX proteini gibi bakteriyel biyoreaktörlerde üretilmeyen proteinler için transgenik biyoreaktörler başarıyla kullanılmaktadır. Çünkü, bakteriyel sistemlerde biyolojik aktivite için glukolizasyon ve g-karboksilasyon gibi sentez sonrası modifikasyonlar gerekmektedir (13).

Transgenik koyunlar, klasik sistemlerin herhangi birinden çok daha fazla düzeyde sütlerinde insan α -1-antitripsini üretmişlerdir ve bu hayvanlar son derece normal ve sağlıklı bulunmuştur (49). Founder (F0; homozigot hat kurucusu) en iyisi, toplam proteinlerin yaklaşık %50'si (35g/l) oranında rekombinant proteini sütünde üretmiştir (47, 49). Transgenik α -1-antitrypsinin klinik kullanımının faz I denemeleri İngiltere'de yapılmaktadır. Bu rekombinant proteinin izoelektrik nokta, peptid analizi, amino asit sırası, mass spektroskopisi ve glikan analiz metotları ile karakterize edilerek, insan plazmasından elde edilen proteine çok benzediği ve biyolojik olarak aktif olduğu gösterilmiştir. Sütten saflaştırma prosedürü ile de, bu protein %95'in üzerinde saf olarak elde edilebilmiştir (49). Antikoagülan özelliğe sahip antitrombin III proteini, diğer bir örneği teşkil etmektedir. Keçi β -casein promotörü ve antitrombin III geninden oluşan hibrid geni taşıyan ve bu proteini sütlerinde sentezleyebilen transgenik keçiler üretilmiştir. Bu keçilerin sütlerinden antitrombin III proteini biyolojik olarak aktif formda izole edilmiştir (7 gr/lt). Rekombinant antithrombin III proteini klinik uygulamaya giren ilk transgenik protein olma ayrıcalığına sahiptir. 20 gönüllüde yapılan başarılı Phase I denemelerinden sonra, koroner arter graftı yapılan hastalarda proteinin Phase II denemeleri devam etmektedir (32). Terapötik amaçlı kullanılan diğer bir protein olan longer acting tissue plazminojen aktivatörü de keçi sütünde 3 gr/lt'lik düzeyde başarıyla üretilmiştir (20). Transgenik teknoloji ile rekombinant proteinlerin üretimi klasik hücre kültürü sistemlerine göre çok daha verimli ve ekonomiktir. Ek olarak, sütte insan fibrinojeninin üretimi diğer rekombinant sistemlerle elde edilenlerden en az iki kat daha fazla olarak gerçekleşmektedir.

Diğer taraftan, transgenik üretim için önemli görülen proteinlerden olan insan serum albumini (hSA) üzerinde çalışılmaktadır (32). Bu protein kan kayıplarında kan hacmini dengelemek için kullanılmaktadır. İlk transgenik hayvanların sütlerindeki insan plazminojen aktivatör proteini düzeyi sadece 3 mg/l olarak belirlenmiştir. Ancak, daha sonraları geliştirilen transgenik keçiler, sütlerinde 1-3 g/l arasında değişen düzeylerde insan doku plazminojen aktivatörünü üreterek kendilerini ekonomik yönden oldukça önemli biyoreaktörler konumuna yükseltmişlerdir (39). Aynı grup, keçi sütünden insan doku plazminojen aktivatörünü başarılı şekilde saflaştırmıştır. Transgenik üretim sisteminin etkinliği, en yüksek düzeydeki ekspresyona (3 g/l) sahip keçinin bir günde ürettiği sütün rekombinant protein içeriğinin, 10001 transgenik farenin bir günde ürettiği süte eşdeğer miktarda olduğunun saptanmasıyla açık şekilde ortaya konmuştur (19).

Aynı şekilde, 1991 yılında Krimpenfort ve ark. tarafından, genomunda insan laktoferrin cDNA'sı taşıyan transgenik inekler üretilmiştir (27). Laktoferrin cDNA'sının ekspresyonu sığır α -S1-kazein düzenleyici dizilerinin 15 bp'lik bölümü tarafından kontrol edilmiş ve aynı zamanda, kazein geninin 3' ucundaki bazı komşu dizilerce desteklenmiştir. İlk founder hayvanın erkek olmasından dolayı ekspresyonla ilgili bilgi mevcut değildir. Bu çalışmadaki en önemli husus, başlangıç materyali olarak mezbahalardan elde edilen ovaryumlardan kazanılan oositlerin kullanılmasıyla sığır embriyolarının in vitro üretilibilmeleridir. Bu teknolojinin yardımıyla hemen hemen sınırsız sayıda sığır embriyosu üretilir.

Valender ve ark. 1992 yılında sütlerinde insan protein C genini yüksek düzeylerde eksprese eden transgenik domuzlar üretmişlerdir (46). Fare *whey asidik protein* geninin ilk eksonu içerisine eklenen insan protein C cDNA'sı gen konstraktı olarak kullanılmıştır. Bu gen konstraktı, transgenik domuzlarda dikkate değer oranda ve yüksek düzeyde (1 g/l'ye kadar) eksprese edilmiştir ve ilginç şekilde, domuzlardaki ekspresyon oranı aynı transgen konstraktına sahip farelerden 1000 kat daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, rekombinant insan protein C'nin insan plazmasından elde edilen protein C'ye eşdeğer düzeyde antikoagülant aktiviteye sahip olduğu gösterilmiştir. Çalışmayı yapan grup, domuzlarca üretilen aktif protein C miktarını her saat için 380 μ g/ml olarak hesaplamışlardır ki bu oran insan böbrek hücre hatlarınınca saatte yaklaşık 1 μ g/ml olarak gerçekleştirilen üretimden oldukça yüksektir (46).

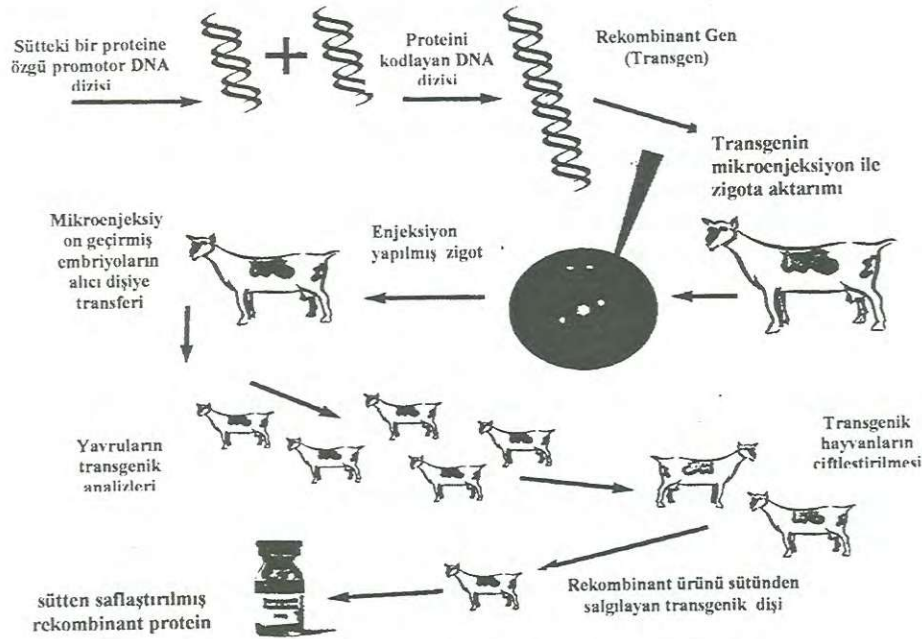
Transgenik çiftlik hayvanları nasıl üretilir?

Günümüzde, mezbaha materyalinden veya ovaryumlardan oosit pick-up (OPU) ile elde edilen olgunlaşmamış oositlerin in vitro maturasyonu ve olgunlaşmayı takiben in vitro fertilizasyonu rutin şekilde uygulanır hale gelmiştir. Sığır, keçi ve domuz oositlerinde yağ granüllerinin fazla olmasından dolayı döllenmiş oositler (zigotlar), enjeksiyondan önce pronukleuslarının görünür hale getirilmesi için ineklerde 10 dk 12000g (27); domuzlarda ise 5 dk 15000g santrifüj edilmelidir (46, 50). Daha sonra, pronukleer dönemde bulunan zigotlara mikroenjeksiyon yöntemi ile 2-4 ng/ μ l konsantrasyonda gen konstraktından (transgen) 2 piko litre verilir. Mikroenjeksiyonu takiben embriyolar 6-8 gün kadar in vitro kültür ortamında tutulurlar ve bu arada cinsiyet tayini yapılır. Bunun için, morula ya da blastosist aşamasında iken biyopsi yöntemiyle embriyolardan ba-

zı hücre örnekleri alınabilir. Biyopsi uygulanmış embriyolar kültürde tutulurken, biyopsi örneklerinde cinsiyet ve integrasyon analizleri gerçekleştirilebilir (25).

Cinsiyet analizi genellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yardımıyla yapılmakta ve sığır Y kromozomuna spesifik dizilerin amplifikasyonuna dayanmaktadır (25). Bu metodun doğruluğu %100'e yakındır. Dişi olarak tespit edilen embriyolar kültür ortamından alınarak senkronize edilmiş alıcı annelere cerrahi veya cerrahi olmayan yöntemler ile transfer edilir. Transgen analizi için ise PCR, Southern, Northern ve Western Blot ile ELISA gibi bazı immunolojik testler kullanılabilir (33, 35). Hatta cinsiyet ve integrasyon analizleri, uygun farklı primer çiftleri kullanılarak yapılacak PCR reaksiyonu ile tek bir tüp içerisinde gerçekleştirilebilir (25).

Embriyoların alıcılara transferinden önce transfer edilen genin integrasyonunun başarılı şekilde doğrulanması ile, ihtiyaç duyulan taşıyıcı hayvanların sayısı önemli ölçüde azaltılmış olacaktır. Transjeni taşıyan dişiler ilk laktasyona geldikleri dönemde sütlerinden rekombinant proteinlerin izolasyonu sağlanır (Şema 1).



Şema 1. "Genzyme Transgenics Corporation" şirketinin kitapçığından alınmıştır.

Transgenik çiftlik hayvanlarının maliyeti son derece yüksektir (inek 500.000 \$, koyun ve keçi 200.000 \$ ve domuz 300.000 \$) ve bir transgenik kurucu (founder) hayvan elde etmek için, 1000 inek oositine, 300 koyun ve 200 keçi pronükleer oositine mikroenjeksiyon ile DNA enjeksiyonu yapmak gerekir (36, 44, 51). Bu bakımdan, transgenik çiftlik hayvanı (biyoreaktör) üretmenin hem maliyeti hem de materyal ihtiyacı (oosit, alıcı anne vs.) çok yüksektir. Bu açıdan, klonlama teknolojisinin bu alandaki önemi

de açıkça anlaşılmaktadır. Bu teknolojiyle, uzun bir zaman ve emek harcanarak geliştirilen biyoreaktör çiftlik hayvanlarının sayısını klonlama teknolojisi kullanılarak çok daha kısa bir zaman içerisinde artırmak mümkündür (8, 14, 15, 40, 45).

S o n u ç

Transgenik çiftlik hayvanlarının üretimi sonucunda yılda 1 tona yakın rekombinant protein bu biyoreaktörlerin sütünden izole edilebilir. Tıbbi öneme sahip terapötik proteinlerin kullanımının sağlanması ile milyonlarca insan bunlardan çok daha kolay faydalanacak ve herhangi bir kontaminasyon riski ile karşı karşıya kalmayacaktır. Aynı zamanda, bazı rekombinant proteinlerin başka sistemler ile üretilmesi mümkün olmadığından bu biyoreaktör hayvanlar yeni bir alternatif üretim sistemi oluşturacaklardır. Teknolojinin gelişimine engel teşkil eden bazı teknik güçlükler ortadan kalktıkça bu üretim teknolojisi tüm dünyada pratik uygulama alanları bulabilecektir. Önümüzdeki yıllar içerisinde transgenik teknoloji ile üretilen bazı rekombinant proteinlerin klinik faz 2 denemelerinin bitip eczanelerde satışa sunulması (Örneğin, anti trombin III'ün satışa sunulduğu gibi) beklenmektedir.

Teşekkür: Bu derlemenin hazırlanmasında yardımcı olan TÜBİTAK, MAM, GMBAE araştırmacıları Hande Odaman (Bsc), Uludağ Üniversitesi Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama ve Dölerme ABD araştırma görevlisi Vet. Hekim. Hakan Sağırkaya'ya ve İstanbul Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Suni Tohumlama ve Dölerme ABD'dan Doç. Dr. Serhat Papuccuoğlu'na teşekkür ederim.

K a y n a k l a r

1. Archibald, A. L., McClenaghan, M., Hornsey, V., Simons, J.P. and Clark, A.J. (1990): High-level expression of biologically active human a-1-antitrypsin in the milk of transgenic mice. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 87, 5178-5182.
2. Archer, J.S., Kennan, W.S., Gould, M.N. and Bremel, R.D. (1994): Human growth hormone (hGH) secretion in milk of goats after direct transfer of the hgH gene into the mammary gland by using replication-defective retrovirus vectors. Proc. Natl. Acad. Sci., USA 91, 6840-6844.
3. Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M.E., Yagle, M.K. and Palmiter, R.D. (1985): Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Natl. Acad. Sci., 82: 4438-4442.
4. Bağış, H., Papuccuoğlu, S. (1997): Studies on the production of transgenic mice. Tr. J. of Veterinary and Animal Sciences, 21: 287-292
5. Bühler, T.A., Bruyere, T., Went, D.F., Stranzinger, G. and Bürki, K. (1991): Rabbit b-casein promoter directs secretion of human interleukin-2 into the milk of transgenic rabbits. Biotechnology, 8, 140-143.
6. Behringer, R. R., Ryan, T. M., Reilly, M. P., Asakura, T., Palmiter, R.D., Brinster, R.L. and Townes, T.M. (1989): Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. Science, N.Y. 245, 971-973.

7. Blum, P., Velligan, M., Lin, N. and Martin, A. (1992): DnaK mediated alterations in human growth hormone protein inclusion bodies. *Bio/Technology*.
8. Brink, M.F, Bishop, M.D, Pieper, F.R. (2000): Developing efficient strategies for the generation of transgenic cattle which produce biopharmaceuticals in milk. *Theriogenology*, 53 (1): 139-48.
9. Champell, S.M., Rosen, J.M., Hennighausen, L.G., Strech, Jurk, U. and Sippel, A.E. (1984): Comparison of the whey acidic protein genes of the rat and mouse. *Nucleic Acids Res.*, 12, 8685-8697.
10. Caner, M., Arat, S., Özer, A., Bağış, H., Odaman, H., Çırakoğlu B., (2000): HBV Genomunun Mikroenjeksiyon Yöntemi İle Fare Embriyolarına Aktarılarak Transgenik Fare Modelinin Oluşturulması. VI. Ulusal Tıbbi Biyoloji Kongresi, 2-5 Kasım 2000, Denizli.
11. Carver, A., Wright, G., Cottom, D., Cooper, J., Dalrymple, M., Temperly, S., Udell, M., Reeves, D., Percy J., Scott, A., Barrasa, D., Gibson, Y., Jeffrey, Y., Samuel, C., Colman, A. and Garner, I. (1992): Expression of human α -1-antitrypsin in transgenic sheep. *Cytotechnology*, 9, 77-84.
12. Clark, A.J., Bessos, H., Bishop, J.O., Brown, P., Harris, S., Lathe, R., McClenaghan, M., Prowse, C., Simons, J., Whitelaw, C.B.A. and Wilmut, I. (1989): Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 7, 487-492.
13. Clark, A.J. (1998): The mammary gland as a bioreactor: expression, processing and production of recombinant proteins. *J. Mamm. Gland. Biol. Neop.*, 3: 337-349.
14. Chan, A.W.S. (1999): Transgenic animals: Current and alternative strategies. *Cloning.*, 1: 25-46.
15. Cibelli, J.B, Stice, SL, Golueke, P.J, Kane, J.J, Jerry, J, Blackwell, C, Ponce de Leon FA, Robl J.M. (1998): Cloned transgenic calves produced from nonquiescent fetal fibroblasts. *Science*, 280 (5367): 1256-8.
16. Dincturk, B., Turkmenler, A., Arat, S., Bagis, H., Cirakoglu, B. (1996): A transgenic mouse model with human growth hormone. *Tr. J. of Biology*, 20, 303-311.
17. Davidson, D.J, Dorin J.R, McLachlan, G, Ranaldi, V, Lamb, D, Doherty, C, Govan, J, Porteous, D.J (1995): Lung disease in the cystic fibrosis mouse exposed to bacterial pathogens. *Nat. Genet.*, 9 (4): 351-357.
18. Datar, R.V., Cartwright, T, Rosen, C.G. (1993): Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology*, (NY) 11: 349-357.
19. Denman, J., Hayes, M., O'Day, C., Edmunds, T., Barlett Hirani, S., Ebert, K.M., Gordon, K. and McPherson J. (1991): Transgenic expression of a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: purification and characterization of the recombinant enzyme. *Biotechnology*, 9, 839-843.
20. Ebert, K.M., Selgrath, J.P., Di Tullio, P., Denman J., Smith, T.E., Memon, M.A., Schindler J.E., Monastersky, G.M., Vitale, J.A. and Gordon, K. (1991): Transgenic production a variant of human tissue-type plasminogen activator in goat milk: Generation of transgenic goats and analysis of expression. *Bio/Technology*, 9, 835-838.
21. Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barbosa, J.A. and Ruddle, F.H. (1980): Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 77, 7380-7384.
22. Gordon, J.W., Lee, E., Vitale, J., Smith, A.E., Westphal, H. and Hennighausen, L. (1987): Production of human tissue plasminogen activator in transgenic mice. *Biotechnology*, 5, 1183-1185.

23. Günzburg, W.H., Salmons, B., Zimmermann, B., Müller, M., Erfle, V. and Brem, G.A. (1991): A mammary-specific promoter directs expression of growth hormone not only to the mammary gland, but also to Bergman glia cells in transgenic mice. *Molec. Endocrinol.*, 5, 123-133
24. Halter, R., Carnwath, J., Espanion, G., Herrmann, D., Lemme, E., Niemann, H. and Paul, D. (1993): Strategies to express Factor VIII gene constructs in the ovine mammary gland. *Theriogenology*, 39, 137-149.
25. Horvat, S., Medrano, J.F., Behboodi, E., Anderson, G.B. and Murray, J.D. (1993): Sexing and detection of gene construct in microinjected bovine blastocysts using the polymerase chain reaction. *Transgenic Res.*, 2, 134-140.
26. Jaenisch, R. (1988): Transgenic animals. *Science*, N.Y. 240, 1468- 1474.
27. Krimpenforth, P., Rademakers, A., Eyestone, W., van der Schans, A., van den Broek, S., Kooiman, P., Kootwijk E., Platenburg, G., Pieper, F., Strijker, R. and de Boer, H. (1991): Generation of transgenic dairy cattle using "in vitro" embryo production. *Biotechnology*, 9, 844-847.
28. Langford, G.A, Yannoutsos, N, Cozzi, E, et all (1994): Production of pigs transgenic for human decay accelerating factor. *Transplant Proc.*, 26: 1400-1401.
29. Lo, D., Pursel, V., Linton, P.J., Sandgreen, E., Behringer, R., Rexroad, C., Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1991): Expression of mouse IgA by transgenic mice, pigs and sheep. *Eur. J. Immunol.*, 21, 1001-1006.
30. Meade, H. and Ziomek, C.A. (1998): Urine as a substitute for milk? *Nature Biotechnology* vol. 16: 21-22.
31. Meade, H., Gates, L., Lacy, E. and Lonberg, N. (1990): Bovine α 1-casein gene sequences direct high-level expression of active human urokinase in mouse milk. *Biotechnology*, 8, 443-446.
32. Meade, H, Echelard, Y, Ziomek, C.A, Young, M.W, Harvey, Cole, E.S, Smith, T.E, and Curling, J.M. (1999): Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals. Genzyme Transgenic Corp. and Genzyme Corp. Framingam. *Gene Expression Systems: Academic Press*, 399-427.
33. Murray, J.D., Nancarrow, C.D., Marshall, J.T., Hazelton, I.G. and Ward, K.A. (1989): Production of transgenic Merino sheep by microinjection of ovine metallothionein-ovine growth hormone fusion genes. *Reprod. Fertil. Dev.*, 1, 147-155.
34. Palmiter, R.D. and Brinster, R.L. (1986): Germ-line transformation of mice. *Ann Rev. Genet.*, 20, 465-499.
35. Palmiter, R.D., Brinster, R.L., Hammer, R.E., Trubaner, M.E., Rosenfeld, M.G., Birnberg, N.C. and Evans, M.R. (1982): Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature, Lond.*, 300, 611-615.
36. Pursel, V.G, Rexroad, C.E, Jr. (1993): Status of research with farm animal. *J. Anim. Sci.*, 71, suppl. 3: 10-19.
37. Rzcidlo, S.J., Bagis, H., McGraw, R.A. and Brackett, B.G. (1997): Production and identification of transgenic mice for cytomegalovirus-controlled expression of glutathione synthetase. Southeastern Chapter of the Society of Toxicology Annual Meeting (SESOT). October 2-3, 1997, USA.
38. Reddy, V.B., Vitale, J.A., Wei, C., Montova-Zavala, M., Stice, S.L., Balise, J. and Robl, J.M. (1991): Expression of human growth hormone in the milk of transgenic mice. *Anim. Biotechnol.*, 2, 15-29.

39. Riego, E., Limonta, J., Auguilar, A., Perez, A., de Armas, R., Solanto, R., Ramos, B., Castro, F.O. and de la Fuente, J. (1993): Production of transgenic mice and rabbits that carry and express human tissue plasminogen activator cDNA under the control of a bovine alpha S1 casein promoter. *Theriogenology*, 39, 1172-1185.
40. Rudolph, N.S. (1999): Biopharmaceutical production in transgenic livestock. *Trends Biotechnol.*, 17 (9): 367-74.
41. Sorg, T. and Methali, M. (1997): Gene therapy for AIDS. *Transfus. Sci.*, 18 (2): 277-89.
42. Schmitt-Ney, M., Doppler, W., Ball, R.K. and Groner, B. (1991): β -casein gene promoter activity is regulated by the hormone-mediated relief of transcriptional repression and a mammary gland-specific nuclear factor. *Molec. Cell Biol.*, 11, 3745-3755.
43. Stinnakre, M.G., Devinoy, E., Thepot, D., Chene, N., Bayat-Samardi, M., Grabowski, H. and Houdebain, L.-M. (1992): Quantitative collection of milk and active recombinant proteins from the mammary glands of transgenic mice. *Anim. Biotechnol.*, 3, 245-255.
44. Seidel, G.E., Jr. (1993): Resource requirements for transgenic livestock research. *J. Anim. Sci.*, 71, Suppl. 3: 26-33.
45. Stice, S.L, Robl, J.M, Ponce de, Leon F.A, Jerry, J, Golueke, PG, Cibelli, J.B, Kane, J.J. (1998): Cloning: new breakthroughs leading to commercial opportunities. *Theriogenology*, 1; 49 (1): 129-38.
46. Velandar, W.H., Johnson, J.L., Page, R.L., Russel, C.G., Subramanian, A., Wilkins, T.D., Gwazdauskas, F.C., Pittius, C. and Drohan, W. (1992): High-level expression of a heterologous protein in the milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 89, 12003-12007.
47. Wilmut, I., Archibald, A.L, McCleaghan, M., Simons, J.P., Whitelaw, C.B.A., and Clark, A.J. (1991): Production of pharmaceutical proteins in milk. *Experientia*, 47, 905-912.
48. Watson, C.J., Gordon, K.E., Robertson, M. and Clark, A.J. (1991): Interaction of DNA-binding proteins with a milk protein gene promoter in vitro: identification of a mammary gland-specific factor. *Nucleic Acids Res.*, 23, 6603-6610.
49. Wright, G., Carver, A., Cottom, D., Reeves, D., Scott, A., Simons, P., Wilmut, I., Garner, I. and Colman, A. (1991): High-level expression of active human α -1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *Biotechnology*, 9, 830-834.
50. Wall, R.J., Pursel, V.G., Shamay, A., McKnight, R.A., Pittius, C.W. and Hennighausen, L. (1991): High-level synthesis of a heterologous milk protein in the mammary glands of transgenic swine. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA* 88, 1696-1700.
51. Wall, R.J. (1996): Transgenik livestock: Progress and prospect for the future. *Theriogenology*, 45: 57-68.
52. Ziomek, C.A. (1998): Commercialization of proteins produced in the mammary gland. *Theriogenology*, 49: 139-144.