

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

GEN TRANSFERİNDEN HAYVANCILIKTA
YAPARLANMA YOLLARI

Saim BOZTEPE

YÜKSEK LİSANS TEZİ
ZOOOTEKNİ ANABİLİM DALI

Bu Tez 17.10.1988 Tarihinde Aşağıdaki Jüri Tarafından
.....(Yetmiş..) Not Takdir Edilerek ~~Oybirliği~~/Oyçokluğu
ile Kabul Edilmiştir.

T. KESİCİ *H. R. EKİNGEN* *S. SEVİNÇ ASAL*

Prof.Dr.Tahsin KESİCİ Prof.Dr.H.Ruhi Yard.Doç.Dr.Sevinç
Danışman EKİNGEN ASAL

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

[Handwritten Signature]

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

GEN TRANSFERİNDEN HAYVANCILIKTA
YARARLANMA YOLLARI

Saim BOZTEPE

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Zootekni Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr.Tahsin KESİCİ

1988, Sayfa: 57

Jüri: Prof.Dr.Tahsin KESİCİ
Prof.Dr.H.Ruhi EKİNGEN
Yrd.Doç.Dr.Sevinç ASAL

Bu çalışmada, genetik mühendisliğinden hayvancılık pratiğinde faydalanma imkanlarını araştıran çalışmalar derlenmiş ve bilhassa yönlendirilmiş gen transferi ile kısmen gerçekleştirilen ve bu sahada gelecekte yapılabilecek uygulamalar, mevcut kanaatler ve muhtemel gelişme imkanları göz önüne alınarak tartışılmıştır. Gen transferi için gerekli materyal ve teknikler, bu çalışmanın ileride bu konuda uygulama yapacakların başvuracağı Türkçe bir eser olacağı düşünülerek etraflıca açıklanmaya çalışılmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Memelilerde gen transferi, hayvanlarda genetik mühendisliği, gen klonlama, gen izolasyon, mikroinjeksiyonla gen transferi, retroviruslar, kimyasal gen transferi, rekombinant DNA.

ABSTRACT
Masters Thesis

THE WAYS OF USING THE GENE TRANSFER
IN ANIMAL BREEDING

Saim BOZTEPE

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Animal Science

Supervisor: Prof.Dr.Tahsin KESİCİ
1988, Page: 57

Jury: Prof.Dr.Tahsin KESİCİ
Prof.Dr.H.Ruhi EKİNGEN
Asst.Prof.Dr.Sevinç ASAL

In this study, the papers that search for possibilities to use the genetic engineering in animal husbandry practices are reviewed and some speculations on the present applications that are partially realized by using directed gene transfer and their future are made on the light of present concepts and probable developments. The material and the techniques which are required for a successful gen transfer are tried to be explained in detail, since this thesis is considered that it may be a Turkish reference for those who want to apply the gene transfer.

KEY WORDS: gene transfer in mammals, genetic engineering in animals, gene cloning, gene purification, microinjected gene transfer, retroviruses, chemical gene transfer, rekombinant DNA.

TEŞEKKÜR

Bana bu sahada çalışma imkanı veren sayın hocam Prof.Dr.Tahsin KESİCİ'ye, mesaisinin önemli bir kısmını bana ayıran ve konuyu kavramada kıymetli bilgilerini benden esirgemeyen sayın hocam Yrd.Doç.Dr.Sevinç ASAL'a, meşguliyetimin fazlalığına rağmen birçok konuda yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç.Dr.Orhan KAVUNCU'ya, hoşgörüsünün sınırsızlığı yanında makalelerin temininde ve tercüme çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Doç.Dr.Oktay YAZGAN'a ve S.Ü.Ziraat Fakültesi Zootekni Bölüm elemanlarına teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. GİRİŞ	1
2. MATERYAL VE METOD	4
2.1. Materyal	4
2.1.1. Gen transferinde kullanılan biyolojik ve kimyasal mater- yal	4
2.1.1.1. Biyolojik materyal.....	4
2.1.1.2. Kimyasal materyal.....	5
2.2. Metod	9
3. GEN TRANSFER YOLLARI.....	10
3.1. Doğal Gen Transferleri.....	10
3.1.1. Transformasyonlar.....	10
3.1.2. Konjugasyon	11
3.1.3. Transdüksiyon.....	11
3.2. Kısmi Olarak Yönlendirilmiş Gen Transferleri.....	12
3.2.1. Androgenez ve Ginogenez.....	12
3.2.2. Homozigot diploidler.....	14
3.2.3. Somatik hücre hibridizasyonu....	15
3.2.4. Kromozom transferi.....	18
3.2.4.1. Mikrohücreler ve lipozom taşıyıcılar.....	18
3.2.4.2. Kromozom ve DNA aracı- lığı ile gen transferi.	21
3.2.5. Embriyo transferi.....	23
3.2.6. Sun'i tohumlama.....	23
3.3. Yönlendirilmiş Gen Transferi.....	24
3.3.1. Genlerin izolasyonu ve çoğaltılması.....	24
3.3.1.1. mRNA'nın izolasyonu....	25

3.3.1.2. mRNA'dan DNA kopyesinin çıkarılması.....	25
3.3.1.3. cDNA'ların klonlanması.....	27
3.3.1.4. DNA kütüphanesinin oluşturulması.....	28
3.3.2. çoğaltılan genlerin naklindeki teknikler.....	29
3.3.2.1. Viral teknikler.....	29
3.3.2.2. Retrovirus vektörler.....	30
3.3.2.3. Kimyasal teknikler.....	34
3.3.2.4. Fiziksel teknikler.....	35
4. YÖNLENDİRİLMİŞ GEN TRANSFERLERİNİN HAYVANLARDAKİ UYGULAMALARI.....	39
4.1. Laboratuvar Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar.....	39
4.2. Çiftlik Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar..	42
5. YAPILABİLECEKLER.....	44
6. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	49
KAYNAKLAR.....	53

1. GİRİŞ

Tarımsal faaliyetlerden biri olan hayvancılıkta maksimum verimi sağlayabilmek her zaman arzu edilmektedir. Bunun için bir çok araştırmalar yapılmıştır.

Doğrudan gen transferi yolu ile üretimin artırılması metodları günümüzde kullanılmamakla birlikte olumlu sonuçlar verdiği tespit edilmiştir(Palmiter vd. 1982; Lockett 1985; Minhas vd. 1985; Hammer vd. 1986; Church vd. 1986; Brem vd. 1986; Shuman ve Shoffner 1986).

Bu sahadaki uygulamaların çoğu özellikle biyoteknolojik metodlarla yapılmış olup, mevcut genlerin germinal hücrelerle dışıye nakledilebilmesi şeklinde olmuştur ve bu sun'i tohumlamanın temelini teşkil etmiştir(Fitzhugh 1984; Özkoca 1984; Sevinç 1984). Kalıtımda esas fonksiyonu olan DNA'nın diğer bir organizmaya verilmesi ile replikasyonun kolaylıkla elde edilebileceği açıklanmıştır. Ayrıca kristal DNA canlı somatik ya da germinal hücrelerdekine oranla daha uzun süre dayanıklı olduğundan gen transferi tekniklerindeki bazı zorluklar ortadan kalkmıştır. Günümüzde kristal DNA muhtelif hücrelerden veya bakterilerden elde edilmekte ve endüstride bazı hammaddelerin üretiminde kullanılmaktadır(Kaplan ve Konowrek 1963; Akman 1983). Özellikle interferon ve insülin gibi hormonların ve çoğu antibiyotiklerin gen transferi yolu ile programlanmış belirli tür bakterilerden elde edildiği ve bunun diğer metodlara oranla çok daha ucuz olduğu tespit edilmiştir(Öner 1986). Aynı zamanda kalıtsal hastalıkların tezahürünü önlemek için gen transferi ile ilgili araştırmalar hızlandırılmış, bazı olumlu sonuçların alındığı vurgulanmıştır. Bu yolla elde edilebilecek gen haritala-

rının yeni gelişmeler sağlayabileceği (Morlon 1988) ve bazı kanser türlerinin de bu teknoloji ile önlenileceği bildirilmiştir(Ferrara 1987,.Öner 1987).

Gen transferi, bir organizmanın genetik materyalinin bir kısmının veya tamamının başka bir organizmaya doğrudan naklidir(Kavuncu 1986). Gen transferi tekniklerinin ve sonuçlarının öneminin anlaşılmasından sonra, araştırmalar özellikle hayvancılık alanına da yönelmiştir(Church vd. 1986, Hammer vd. 1986).

Yönlendirilmiş gen transferi teknikleri ile yapılacak ıslah çalışmaları klasik ıslah metodlarına oranla, hem ucuz hem de pratik olabilecektir(Evans 1986). Klasik ıslah metodlarından biri olan embriyo transferi çalışmalarında embriyoların cerrahi olmayan yollarla toplanması, azot içerisinde dondurulması, parçalanması ve nakil işlemlerinin oldukça zor olması ve fazla personel istemesi, maliyeti, yönlendirilmiş gen transferine oranla artırmaktadır (Church vd. 1986). Bu sebeple maliyeti fazla olmayan etkin gen transfer tekniklerinin daha kullanışlı olabileceği ortaya çıkmaktadır. Bu metodlar gelişerek genetik mühendisliğinin uygulanabilir tekniklerini teşkil etmiştir.

Bütün bu sebeplerden dolayı hayvancılıkta gen transferlerinden yararlanabilme yollarına ait mevcut bütün tekniklerin ülkemizde de kullanılabilmesinin önemli gelişmeler sağlayabileceği ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmanın amacı hayvanlarda verimi yükselttiği tesbit edilmiş olan gen transferi tekniklerinin ıslah amacı ile kullanılabilmesinin mevcut literatür ile ortaya konulması olmuştur. Bu amaca ulaşmak üzere araştırmacıların materyal, metod, sonuç ve tartışmaları der-

lenmiştir. Açıklanan bu tekniklerin özellikle hayvancılık-
ta fevkalade verimli, yeni ırkların elde edilebilmesine
imkan sağlayabileceği ortaya çıkmaktadır.



2. MATERİYAL VE METOD

2.1. Materyal

Bu çalışmada hayvancılıkta gen transferinden yararlanma yollarının tespiti amacı ile TÜBİTAK, YÖK Bilgi Erişim Merkezi, Üniversite Kütüphaneleri ve yurt dışındaki muhtelif araştırma kurumlarından elde edilen literatürden yararlanılmıştır.

Gen transferi çalışmalarında kullanılan materyal, araştırmacılar tarafından biyolojik ve kimyasal materyal olmak üzere aşağıda verildiği şekilde iki grup altında toplanmaktadır.

2.1.1. Gen transferinde kullanılan biyolojik ve kimyasal materyal

2.1.1.1. Biyolojik materyal

Biyolojik materyal kapsamı içerisinde bazı mikroorganizmalar ve genetik mühendisliğinde ayrı bir öneme sahip olan viruslar ile evcil çiftlik hayvanları ve laboratuvar deney hayvanları bulunmaktadır.

Hızlı üremeleri ve üretilmelerindeki kolaylık nedeniyle bakteriler ve mantarlar önemli avantajlar sağlarlar. Başak (1987)'nin belirttiğine göre genetik mühendisliğinde kullanılan mikroorganizmalar; bakteriler, aktinomisetler, küf mantarları ve mayalar olmak üzere dört grupta toplanmaktadır. Mayalar ve küf mantarları gerçek bir çekirdeğe sahip olup ökaryot canlılar grubuna girer-

ler. Bakteriler ile aktinomisetler gerçek bir hücre çekirdeğine sahip olmadıklarından prokaryot sınıfa dahil edilirler.

2.1.1.2. Kimyasal materyal

Kimyasal materyalin büyük bir kısmını DNA ve RNA meydana getirmektedir(Şekil 2.1)

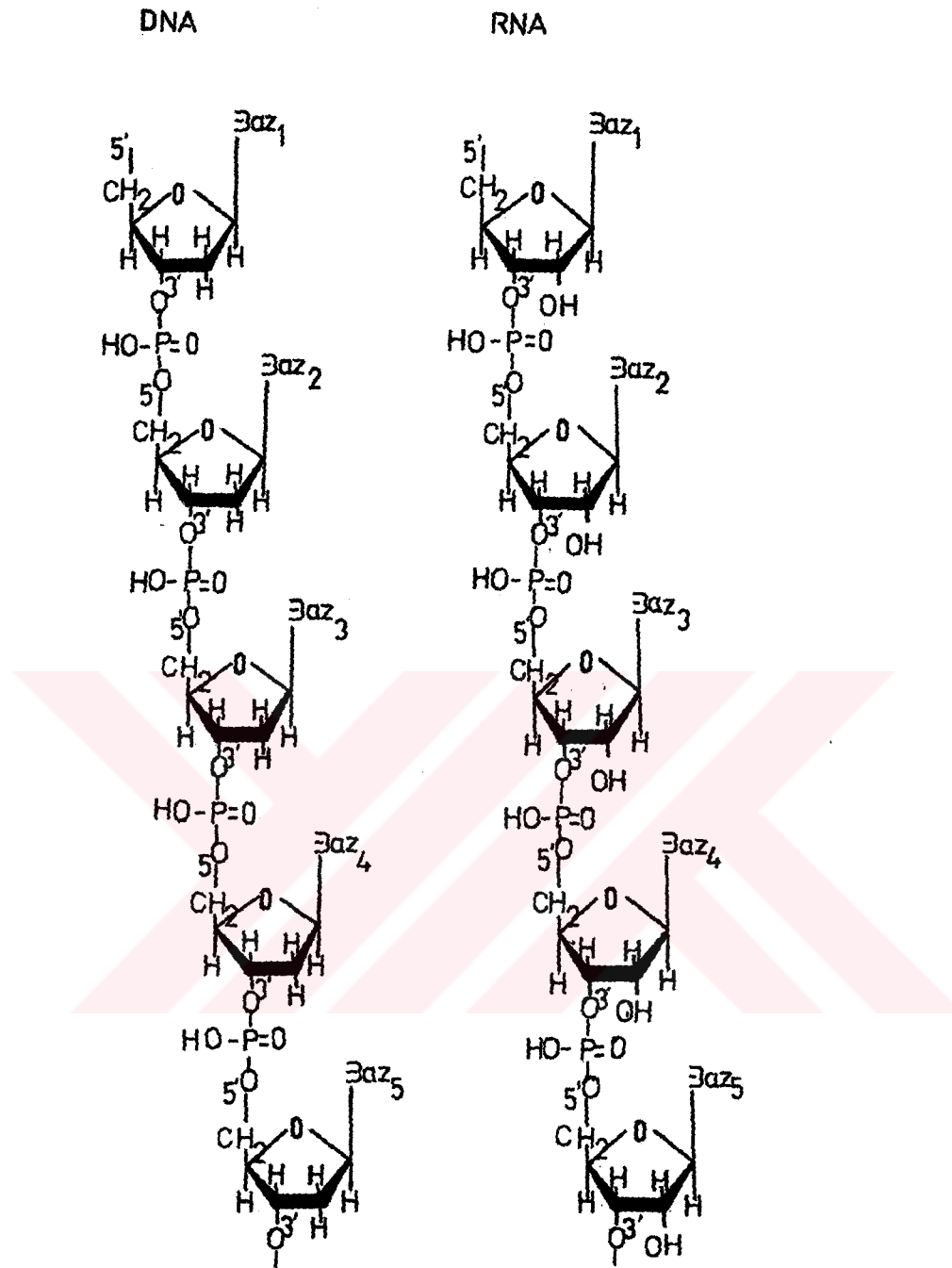
DNA ve RNA'nın kimyasal ve biyolojik özellikleri tespit edildikten sonra araştırmaların büyük çoğunluğu bu materyalin, bir genomdan başka bir genome nakledilebilmesine yönelmiştir. Gen transferinin genetik mühendisliğinde uygulanabilmesi için önce bu moleküllerin kristal formlarda elde edilmeleri gerekmektedir.

Kristal DNA materyalinin hazırlanması Kaplan ve Konowick (1963) tarafından ayrıntılı bir biçimde verilmiştir. Sığırtimus bezinden bu yolla elde edilen kristal DNA - 15°C de bir yıl süre ile bozulmadan saklanabilmektedir.

Aynı araştırmacılar sığırdalağında ve tavuk eritrositlerinden de aynı metodla DNA elde edilebileceğini bildirmişlerdir. Bu şekilde elde edilen DNA fonksiyonel olup genetik mühendisliğinde kullanılabilir. Biyolojik aktif DNA, sodyumdeoksiribonükleik asit şeklinde bakterilerden de izole edilebilmektedir.

Sığır karaciğer RNA'sı için, kristal RNA materyalinin hazırlanma yöntemi de yine Kaplan ve Konowick(1963) tarafından verilmiştir. Bu şekilde elde edilen RNA, genetik mühendisliğinde kullanılabilir ve diğer organizmalardan da aynı metodla elde edilebilmektedir.

Kimyasal materyalin diğer bir bölümünü ise nükleik asitleri modifiye eden enzimlerle plazmidler meydana ge-



Şekil 2.1. DNA ve RNA moleküllerinin kimyasal formülleri(Legniner 1981).

tirmektedir. Bunlardan nükleik asitleri modifiye eden enzimler, DNA ve RNA'da değişmelere neden olduklarından, yeni gen modellerini meydana getirebilmektedirler. Bu sebeple de genetik mühendisliğinde ayrı bir öneme sahiptirler. Bu enzim materyali Frankham ve Gillings (1984) tarafından aşağıdaki gibi verilmiştir:

Alkalin fosfataz: Bu enzim DNA ya da RNA'nın 5' karbonundan fosfat grubunu ayırmaktadır. Bu nedenle ^{32}P ile etiketleme imkanı elde edilmiş olur.

Polinükleotid kinaz: Fosfat grubu koparılan nükleik asitlere ATP ve NADP gibi nükleotidlerden bir fosfat grubunu transfer eden enzimler olup, DNA ya da RNA'nın etiketlenmelerinde kullanılmaktadır.

Terminal transferaz: Bunlar bir DNA molekülünün 3' karbonuna bir nükleotid ekleyebilen enzimler olup, etiketlemede kullanılmaktadır. 5' ucuna nükleotid ekleyen transferazlar da bulunmaktadır.

Ligazlar: DNA ya da RNA'nın şeker fosfat ekseninde 3'-OH ve 5'-PO₄ bağlantısını sağlayan enzimlerdir. Ligazlar ATP veya bir nükleotidin pirofosfat bağını kopararak iki molekülün birleştirilmesi şeklinde görev yapmaktadır.

DNA polimeraz I: Bu enzim üç katalitik aktiviteye sahiptir. Bunlardan ilki onarım fonksiyonu, diğerleri ise DNA'nın 3' karbonuna nükleotid ekleyebilmesi ve 3' veya 5' karbonlarından nükleotidleri koparabilmesi şeklindedir.

Revers transkriptaz: Genetik mühendisliğinde önemli bir materyal olup, RNA'ya komplementer tek eksenli DNA kopyesini sentezlemekte ve RNA/DNA hibrid molekülünü meydana getirmektedir. RNA, bu hibrid molekülden alkali ile

hidroliz edilebilmekte ve elde edilen DNA tek ekseni, DNA polimeraz I enzimi ile inkübe edilerek RNA'nın çift eksenli bir DNA kopyesi meydana getirilebilmektedir.

S1 nükleaz: Tek eksenli DNA'da kesimler yapabilmektedir.

DNase I: Çift sıralı DNA'da kırıklar(nik) meydana getirir(kısa inkübasyon sürelerinde) ve böylece de (nik) translasyon sisteminde Kornberg polimerazları tarafından tanınacak açıklıkların meydana getirilmesinde kullanılmaktadır.

Restriksiyon endonükleazlar: Esas görevleri hücreye giren yabancı DNA'yı yok etmektir. Bu materyal özellikle rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaktadır. Yaklaşık olarak 230 kadar bakteri suşundan izole edilmiş olan çeşitli restriksiyon enzimleri DNA'yı özgün bölgelerde asimetrik olarak keserler ve bu sayede DNA yapışkan uçlar kazanmış olur. Yine aynı restriksiyon enzimi ile bir başka canlının DNA'sı aynı özgün bölgeden kesilir ve yapışkan uçlar kazanır. Yapışkan uçlara sahip farklı canlılardan elde edilen DNA'lar aynı ortamda inkübe edildiklerinde hibridlenirler. Bu şekilde elde edilen DNA'ya rekombinant DNA denmektedir.

Bundan başka simetrik kesme yapan restriksiyon enzimleri de vardır. Simetrik kesme sonucunda DNA'lar küt uçlar kazanırlar. Küt uçlara sahip olan DNA'lara yapay olarak nükleotidler eklenerek yapışkan uçlar kazandırılır. Bu tip kesme yapan enzimler de rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaktadır.

Diğer nükleazlar: Bunlar tek ya da çift sıralı DNA ve RNA'lar ya da bunların kombinasyonları için spesifikler. Bunlar DNA ya da RNA'da mevcut unsurların de-

giştirilmesi veya solusyonlarda istenmeyen komponentlerin yapıdan uzaklaştırılması için kullanılmaktadır.

Bir başka önemli kimyasal materyal grubu plazmidlerdir. Plazmidler genelde bakteri hücrelerinde kendi kendilerine replike olma yeteneğine sahip, küçük ve çember şeklindeki çift eksenli DNA molekülleri olarak tanımlanmaktadır. Plazmidler DNA moleküllerinin transferi ve maniplasyonları için fevkalade önemli faktörlerdir. Restriksiyon enzimlerle kesilmiş plazmide yabancı DNA kolaylıkla bağlanabilmekte ve elde edilen plazmide rekombinant plazmid denmektedir. Bu, istenen genleri canlı hücrelere aktarabilecek ideal bir vektör sistemi olmaktadır.

Üretimleri plazmidler ile mümkün olan değişik antibiyotiklere ait genetik bilgilerin rekombinant DNA teknolojisi ile bir hücrede toplanabilmesi ve böylelikle birden fazla antibiyotiğin aynı canlıda üretilebilmesi imkanlarına ilişkin çalışmalar bulunmaktadır (Alaaddinoğlu 1983, Akman 1983).

2.2. Metod

Sağlanabilen literatür, önce araştırma konularının adları, kullandıkları materyal ve metod, elde ettikleri sonuçlar ve tartışma bölümleri ayrı ayrı olmak üzere incelenmiş ve sonra tez dispozisyonuna uygun olarak yeniden birleştirilerek düzenlenmiştir.

3. GEN TRANSFER YOLLARI

Gen transfer yolları; doğal gen transferleri, kısmi olarak yönlendirilmiş gen transferleri ve yönlendirilmiş gen transferleri olmak üzere üç grupta aşağıdaki gibi verilmiştir:

3.1. Doğal Gen Transferleri

Bilindiği gibi bakterilerde genetik rekombinasyonları sağlayan paraseksüel sistemler mevcuttur. Bunlarla bir bakterinin genetik materyalinin bir başka bakteriyeye aktarılması sağlanmaktadır. Bu genetik materyal aktarımı doğada bakteriler arasında kendiliğinden olmakta ve yapay bir teknik gerektirmemektedir. Bu transfer yolları; transformasyon, konjugasyon ve transdüksiyon olmak üzere üç ana grupta toplanmaktadır.

3.1.1. Transformasyonlar

Transformasyon olayı ilk defa 1928 yılında Griffith tarafından fareler üzerinde gözlenmiştir.

Griffith yaptığı araştırmada pnömokok bakterilerinden ısı muamelesi ile öldürdüğü virulent-S ırkının, virulent olmayan canlı-R ırklarını virulent hale transforme ettiğini tespit etmiştir. Daha sonra transforme edici faktörün DNA olduğu Avery vd. (1944) tarafından ortaya konmuştur. Sonra ki yıllarda yapılan çalışmalarla transformasyonun konakçının dışında yani in-vitro da olabileceği tespit edilmiştir (Düzgüneş ve Ekingen 1983; Bilgehan 1983).

Transformasyonun, genetik yapının aydınlatılmasında ve DNA'nın yapısında meydana gelen fiziksel ya da kimyasal değişikliklerle biyolojik aktivite arasındaki ilişkilerin incelenmesinde kullanılabilecek metod olduğu belirtilmektedir (Akman 1983).

3.1.2. Konjugasyon

Verici bir bakteriden alıcı bir hücreye genetik materyal aktarımında ikinci yol konjugasyondur. Bu, iki hücrenin temasını gerektiren bir olaydır. Çünkü genetik materyal iki hücre arasında oluşan bir konjugasyon köprüsü yoluyla aktarılmaktadır. Burada verici bakterinin genetik materyalinin alıcı bakteriye aktarılmasında F-plazmidi rol oynamaktadır. F-plazmidi verici bakteride bulunmakta ve transforme edici faktör olarak kabul edilmektedir.

3.1.3. Transdüksiyon

Transdüksiyon, verici bir bakteriye ait kromozom segmentlerinin bir bakteriofaj tarafından alıcı bir bakteriye taşınması olayıdır. Transdüksiyonda kısıtlı ve kısıtlı olmayan transdüksiyon olmak üzere iki farklı mekanizma bulunmaktadır. Kısıtlı transdüksiyon yapan fajların en önemlisi E.coli'nin ılımlı lambda fajlarıdır. Lambda fajları ile bakteriye sadece "lac" geni aktarılabilir. Buna karşılık kısıtlanmamış transdüksiyonda ise bir bakteri hücrelerinin bütün genleri fajlar aracılığı ile eşit şansa alıcı bakterilere taşınabilmektedir.

Transdüksiyonla transformasyon olaylarının bir

karişımı gibi görünen transfeksiyon ise, verici bir organizmanın genetik materyalinin alıcı bir organizmaya geçişini ihtiva etmektedir.

3.2. Kısmi Olarak Yönlendirilmiş Gen Transferleri

Doğal gen transferlerinde meydana gelen transformasyonlar tamamen kontrolsüz ve kendiliğinden olmaktadır. Burada ise üzerinde durulan karaktere veya karakterlere ait değişiklikler isteğe bağlı olarak meydana getirilmektedir. Ancak bu metodlarla yapılan transferler de kontrol edilememekte ve başarı şansa bağlı olmaktadır. Örneğin sun'i tohumlamadan her zaman beklenen fayda sağlanamamaktadır. Bunun sebebi olarak; bu tip melezlemelerde damızlık hayvanın döle her defasında genotipinin başka bir yarısını geçiriyor olması gösterilebilir.

Bu kısımda klasik sayılabilecek bazı gen transfer teknikleri verilmiştir. Bu tekniklerle yapılacak ıslah çalışmaları uzun süreli programları gerektirmektedir. Ayrıca bu tekniklerden hayvancılıkta henüz kullanılabilenler embriyo transferi ve sun'i tohumlamadır. Diğer teknikler hayvancılıkta kullanılamamakla birlikte laboratuvar hayvanlarında yapılan çalışmalar ümit verici olmaktadır.

3.2.1. Androgenez ve ginogenez

Ginogenez yumurta içine genetik olarak inaktif spermatozoanın girmesiyle tahrik edilen özel bir partogenetik gelişme tipidir. Balıklar, bazı anfibian türleri ve solucanlarda rastlanan tabii ginogenezde aktivasyon ya fertilizasyonu etkilemesi söz konusu olmayan kendi

spermatozoaları tarafından veya kromozomları embriyo gelişmesinde rol alması imkansız olan heterolog spermatozoa tarafından gerçekleştirilir. Heterolog spermatozoa ve genetik olarak inaktive edilmiş spermatozoa sun'i ginogenezde dölleme için de kullanılır. Spermatozoanın genetik olarak inaktivasyonu iyonize ederek veya ultraviyole ışınlarıyla veya özel nükleer inhibitörlerle yapılır. Bu şekilde muamele edilen spermatozoa yumurta içine zerkedilir ve onu gelişmeye tahrik eder fakat kendisi çekirdek bölünmesine bir katkıda bulunmaz. Yumurtanın gelişmesi için gerekli olan diploidlik meiotik bölünmenin yüksek sıcaklıkta engellenmesiyle sağlanır. Diploid ginogenezin bu tipi bazı balık ve kurbağa türleri ile ipekböceklerinde oldukça başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir (Strunnikov 1983). Ancak memelilerde ginogenez, sitokalasin B ile erkek pronükleusun döllenmiş yumurtanın dışına atılması ve ilk bölünmenin engellenmesi yoluyla gerçekleştirilir. In-vitroda geliştirilen ginogenetik embriyolar yabancı bir ananın uterusuna transplante edildiklerinde 0.08 oranında başarılı bir implantasyon meydana gelmiştir. Bu şekilde ginogenetik döl elde etme usulleri çok karmaşık teknikler gerektirir. Bu teknikleri sığır ve koyun için bugüne kadar kullanmak mümkün olmamıştır. Çünkü bunların pronükleusu yumurta membranında görülemez. İpekböceği için de sun'i ginogenezis elde etmek için gerçekten iyi bir metod bugüne kadar geliştirilememiştir.

Androgenez yumurta plazması ve erkek çekirdek materyalinin görev aldığı bir partogenetik gelişme formudur. Deneysel androgenez elde etme çalışmaları, ancak ipekböceği ile çalışılmaya başlanılan 1930'larda gerçek bir gelişme göstermiştir. Daha sonra kurbağalarda ve farelerde de deneysel androgenez elde etme çalışmaları başarılı olmuştur. İpek-

böceğinde androgenez elde etme, döllenmiş yumurtanın sıcaklıkla, yüksek dozlarda X yada ultraviyole ışınlarıyla veya sıcak su ile muamele edilmesi yoluyla yapılabilmektedir (Strunnikov 1983).

Bu yolla gen transferine ait tipik bir misal; 1934 te Hasimoto tarafından elde edilen androjenetik erkek ipek-biceği larvaları olmuştur. Denemede +/+ genotipli dişilerin yumurtaları ch/ch(ch: çikolota renkli larvaya sebep olan ressesif bir otozomal mutant) genotipli bir erkek tarafından döllenmiş, netice olarak bazı erkekler çikolota renkli olmuşlardır(Strunnikov 1983).

Ginogenezde gen transferi bitkilerde geniş bir şekilde araştırılmış olmakla beraber hayvanlarda benzer çalışmalar henüz yapılmaya başlanmıştır. Albino renkli alabalıkları kullanan Thorgaard (1986) ginogenetik döllerde erkek kromozomların genetik olarak aktif olduğunu fakat bu kromozomların mitotik hücre bölünmesi esnasında mozaik balıklara yol açacak şekilde kaybolabildiklerini göstermiştir.

3.2.2. Homozigot diploidler

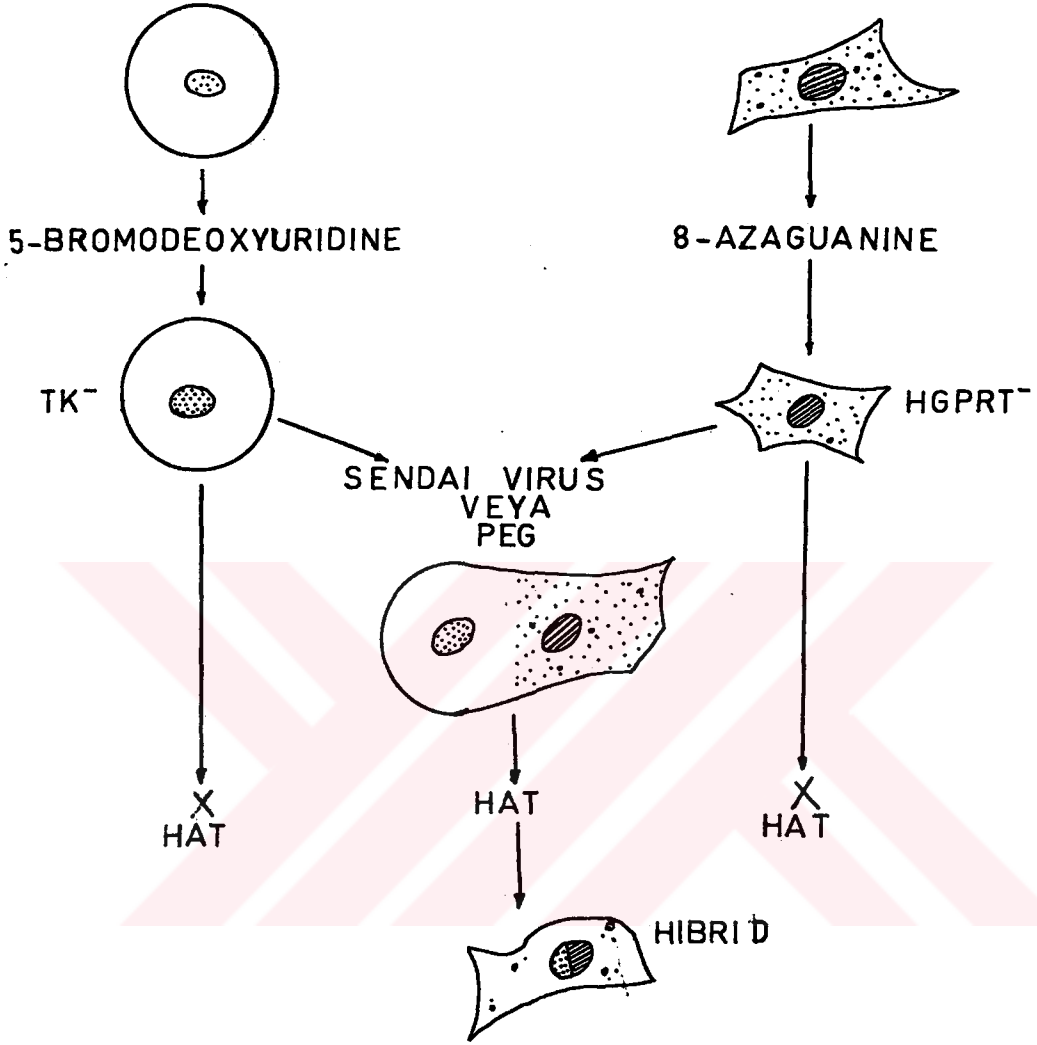
Fitzhugh (1984)'e göre, homozigot diploidlerin meydana getirilmesi, Market ve Seidel (1981) ve Seidel (1982) nin derlemelerinde tarif edilmiştir. Başlangıç noktası, tek-hücre safhasındaki döllenmiş yumurtada erkek veya dişi pronükleusunun çıkarılmasıdır. Birinci hücre bölünmesi sitokalasin B ile durdurulur. Daha sonra geride kalan pronükleus bölünerek homozigot diploid bir hücre meydana getirir. Bu uygulama ile meydana gelen bireyler dişidir, çünkü YY cinsiyet kromozomu letaldir. Bu teknikle farelerin üretildiği bildirilmiştir.

Market ve Seidel (1981), homozigot diploid dişilerden erkekleri üretmek için embriyodaki X kromozomlarından birinin Y kromozomu ile değiştirilmesinin mümkün olduğunu bildirmişlerdir.

3.2.3. Somatik hücre hibridizasyonu

Somatik hücre hibridizasyonu genellikle iki farklı hücrenin birleştirilmesini ihtiva eder. Birleşmenin ilk sonucu heterokaryandur, bu hücre; ebeveyne ait her iki nükleusu da ihtiva eder fakat ebeveyn hücrelere ait diğer hücre komponentlerinin de tesadüfi bir karışımıdır. Heterokaryonun gelişiminde ebeveyne ait nüklear materyaller kaynaşır ve bunun sonucunda oluşan hücreler somatik hücre hibridi adını alırlar. Bu hibridler her iki ebeveyn-den alınan, şansa bağlı olarak seçilmiş kromozomlardan meydana gelen tek-bir çekirdeğe sahiptirler. Somatik hücre hibridi; stabil olmayan bir genotipe sahiptir ve bölünme sırasında kromozom materyalinin bir kısmını kaybedebilir. Zaman ile kromozom kayıpları ihmal edilebilecek derecede azalır ve hibridler stabil yapıya sahip hücre hatları şeklinde gelişirler. Bu hücre hatlarındaki bütün hücreler birbirinin aynıdır ve her iki ebeveyn hücrelerindeki kromozomlardan orijin alan kendine has kromozom setlerine sahiptirler.

Günümüzde kullanılan temel teknik Şekil 3.1.1'de somatik olarak gösterilmiştir. İlk somatik hücre hibridleri spontan füzyonların bir sonucu olmuş ve hibridlerin ebeveynlerden daha hızlı gelişmeleri ile gözlenebilmiştir. Spontan füzyonlar çok nadir olarak meydana gelirler ve genellikle hibridler daha yavaş büyürler. Bu sebeple hibrid seleksiyon metodunun geliştirilmesi, füzyon etkinliği-



TK^- : timidin kinazca defektli hücre

$HGPRT^-$: hipoksantin guanin fosforibosiltransferazca defektli hücre

PEG : Polietilen glikol

HAT : Hipoksantin aminopterin ve timidin ihtiva eden seçici ortam

Şekil 3.1. Hücre füzyonlarının ve hibridlerin seçiminin şematik olarak gösterilmesi

nin ve sıklığının artırılması gerekmektedir. Seleksiyon metodlarından ilki; belirli maddelerin varlığında gelişebilen hücrelerle özel enzimler bakımından mutant hücrelerin seçimine dayanmaktadır (Solter 1981). Bromodeoksiuridin varlığında büyüyen hücreler ölürler. Çünkü timidinkinaz (TK) enzimi varlığında bu ilaç DNA'nın bünyesine girer. TK⁻ olan hücreler ise yaşamlarını devam ettirirler. Benzer olarak azaguanin varlığında büyüyen hücreler de ölürler. Çünkü hipoksantin guanin fosforibosiltransferaz (HGPRT) enzimi bu maddeyi bir kısım metabolitlere dönüştürür ki bu metabolitler nükleik asit sentezini engellerler. Aynı şekilde HGPRT⁻ hücreler yaşamaya devam ederler. Bu enzimlerin bulunmaması normal ortamlarda hücre büyümesini engellemez. Çünkü bu enzimler sadece nükleotid sentezinde koruyucu reaksiyonlarda (yapıyı koruyucu) görev alırlar. Bununla beraber TK⁻ ve HGPRT⁻ hücreleri hipoksantin, aminopterin ve timidin (HAT) içeren ortamlarda ölmektedirler. Esas sentetik reaksiyonlar zinciri aminopterin tarafından bloke edilir ve bu blokaj sonucu hücreler hipoksantin ve timini nükleotid sentezinde ön madde olarak kullanamazlar. Böylece TK⁻ hücreler HGPRT⁻ hücreler birleştirilip HAT ortamına ekildiklerinde bu ortamda sadece TK⁻ ve HGPRT⁻ hücre hibridleri yaşarlar. Solter (1981) 'in Littlefield (1964)'e atfen bildirdiğine göre ortaya atılan bu teknikte çok sayıda ebeveyn hücre arasında hibrid hücreler kolay ve güvenilir bir yolla seçilmiş olacaktır.

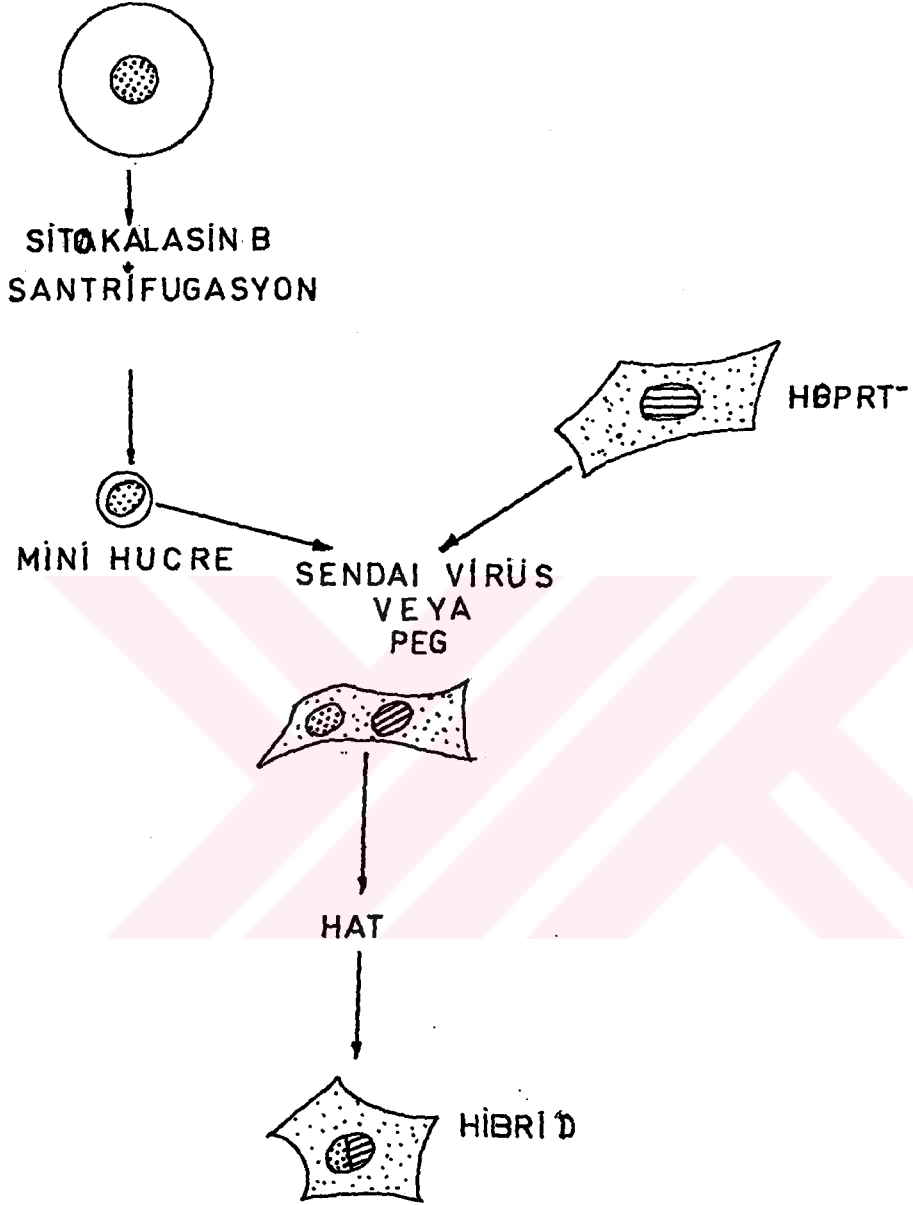
3.2.4. Kromozom transferi

Kromozom transferi teknolojisi geliştirilip, çiftlik hayvanlarının kromozomları ayrıntılı olarak incelenirse; teker teker kromozomların veya kromozom çiftlerinin transferi mümkün olabilecektir. Bu sayede de büyük çapta ve uzun süreli ıslah programlarına gerek kalmaksızın üzerinde durulan karakterin ıslahı gerçekleştirilebilecektir. Kromozom transferi Solter (1981) tarafından iki başlık altında ele alınmıştır. Bunları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür.

3.2.4.1. Mikrohücreler ve lipozom taşıyıcılar

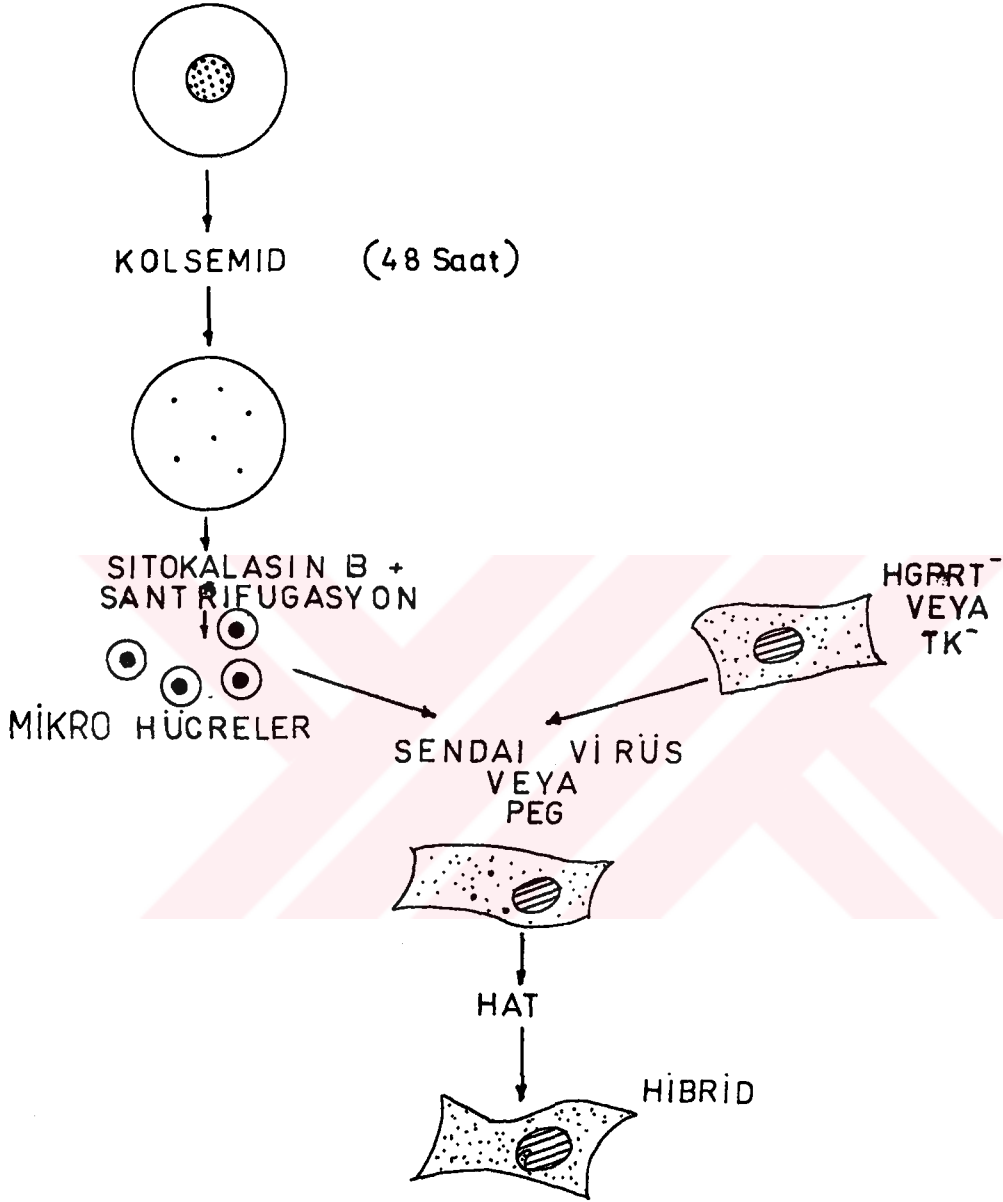
Diğer bir hücreye bir veya birkaç kromozomun aktarılması ile ilgili ilk metod nükleoplastların füzyonunda kullanılan metodun geliştirilmiş şeklidir. Nükleoplastların füzyonu ile ilgili şema Şekil 3.2. 'de gösterilmiştir. Hücrelerin kolsemide maruz bırakılmaları ile mitoz bölünme durdurulur ve kromozomlar yoğunlaştırılır. Daha sonra hücrelerin sitokalasin ile muamelesi ve santrüfüj edilmeleri sonucu çok az sayıda kromozom, az miktarda sitoplazma ve plazma zarı ihtiva eden mikrohücreler meydana getirilir. Meydana getirilen mikrohücreler diğer hücrelerle füzyona tabi tutulabilirler(Lugo ve Fournier 1986, Solter 1981). Bu olaydaki seleksiyon somatik hücrelerdeki seleksiyonun aynıdır.

Kromozomlar Şekil 3.3. 'de gösterilen mikrohücreler yerine lipozom taşıyıcıları kullanarak da transfer edilebilirler. Lipozom taşıyıcıları kullanılarak yapılan transfer Şekil 3.4.'de gösterilmiştir. Burada



Mini hücre: Nükleusun plazma membranı ve sitoplazmanın az bir kısmı ile çevrelenmesinden oluşan yapıdır.

Şekil 3.2., Minihücre veya nükleoplast ve bütün bir hücrenin füzyonunun şematik gösterimi



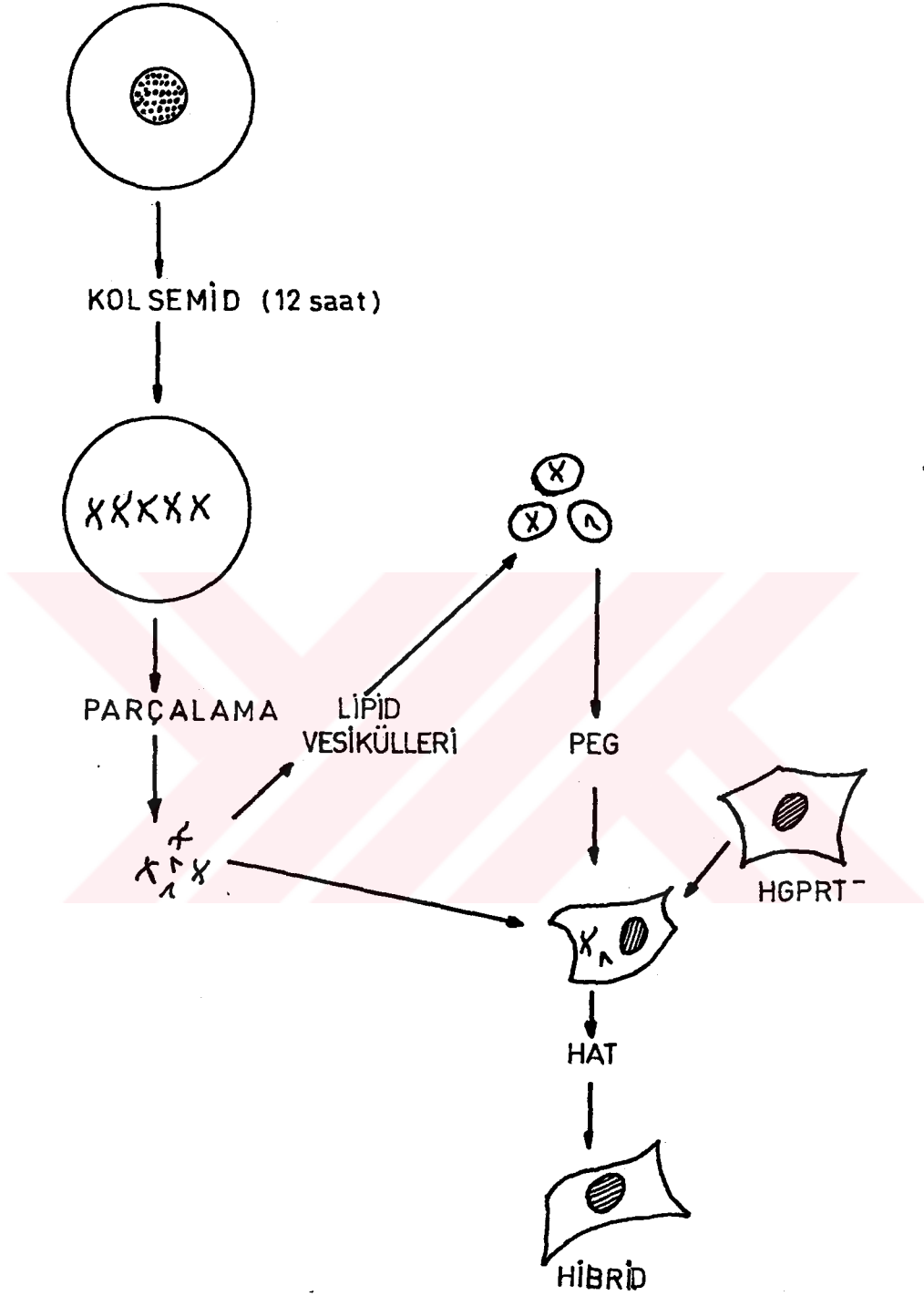
Mikrohücre: Sadece bir veya birkaç kromozom ihtiva eder.

Şekil 3.3. Mikrohücreler ve bütün hücrenin füzyonunun şematik olarak gösterimi

Solter(1981)'in Shows(1976) ve Mukherjee vd. (1978)'e atfen bildirdiğine göre kolsemidde muamele edilerek patlatılan hücrelerden metafaz kromozomları izole edilir. Daha sonra kromozomlar lipid vesikülleri içerisinde tutulurlar ve lipokromozomlar elde edilirler. Bu lipokromozomlar ise polietilen glikol (PEG) kullanılarak normal hücrelerle birleştirilirler. Elde edilen hibrid hücreler daha önce belirtilen şekilde seçilirler. Yabancı moleküllerin hücre içerisine girişinde lipozomlar ve benzer vesikül tipleri son zamanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır (Garapin ve Garapin 1984).

3.2.4.2. Kromozom ve DNA- aracılığı ile gen transferi

Bu bölümde bütün bir hücre, hücrenin bir kısmı veya yapay bir vesikül kullanılarak yapılan genetik materyal transferinden bahsedilecektir. Hücrelerle izole edilmiş kromozom veya çıplak DNA'nın doğrudan temasının sağlanması yolu ile gen transferi uzun zaman önce yapılmıştır. Solter (1981)'e göre 1971 yılında Merril vd. lambda fajı DNA'sının, 1973 yılında da McBride ve Özer belirli genetik bilgilerin, izole edilmiş memeli metafaz kromozomları vasıtasıyla diğer memeli hücrelerine transferi üzerinde çalışmışlardır. Bu metodla hücreler kolsemidde muamele edilir ve mitotik bölünme safhasında durdurulmuş bu hücreler parçalanmak suretiyle kromozomlar elde edilirler. Alıcı hücreler, izole edilmiş kromozomlarla birlikte seçici ortamlarda geliştirilirler(Şekil 3.4.). Aynı araştırmacı daha sonra farklı türler arasında gen transferlerine ilişkin çok sayıda çalışmayı da bildirmiştir.



Şekil 3.4. Yabancı genetik maddelerin lipid vesiküller içinde veya çıplak metafaz kromozomları olarak hücreye aktarımının gösterimi (Solter 1981).

Sonuç olarak hücreye giren metafaz kromozomları parçalanırlar ve küçük parçalar alıcının kromozomlarına entegre olurlar. Böylece az sayıda genin hücre içerisine girmesi mümkün olabilmektedir. Bu sırada arzu edilmeyen genlerin transferi, bunların seçici markerlere çok yakın olmaları ile açıklanmaktadır(Solter 1981).

3.2.5. Embriyo transferi

Döllenenmiş yumurta hücresi ya da zigotun gelişmesi devam ederken verici ananın yani donör hayvanın oviduct veya uterusundan alınarak aynı türden diğer bir hayvana nakledilebilmesi ve bu alıcı hayvanda gebelik doğum sürecini tamamlaması embriyo transfer yöntemi olarak bilinegelmektedir. Burada amaç üstün dişilerden bir batında alınan yavru sayısını artırmaktır(Alaçam 1987, İleri 1987).

Embriyo transferi teknik bir takım işlemleri ihtiva etmektedir ki bunlar, kızgınlığın senkronizasyonu, süper ovulasyon, embriyo hasadı, embriyoların değerlendirilmesi, embriyoların saklanması ve taşıyıcılara nakli gibi işlemlerdir. Embriyo transferinin hayvancılıkta yaygın olarak kullanıldığı bildirilmektedir(Fitzhugh 1984; Church vd. 1986; Alaçam 1987).

3.2.6. Sun'i tohumlama

Damızlıkta kullanılan erkekten bir defada elde edilen sperma ile, çok sayıda dişinin sun'i olarak tohumlanması ve dolayısıyla üstün bir erkekten bir defada birden çok yavru elde edilebilmesi mümkün olabilmektedir

(Özkoca 1984; Sevinç 1984; Fitzhugh 1984).

3.3. Yönlendirilmiş Gen Transferi

Bundan önce verilen gen transferi teknikleri ya kendiliğinden ya da kısmen yönlendirilmek sureti ile gerçekleşmekteydi. Bu bölümde ise tamamen kontrol altında tutulabilen gen transfer teknikleri verilecektir. Yönlendirilmiş gen transferinde, önce üzerinde durulan karakteri determine eden gen izole edilip, çoğaltılmakta ve sonra uygun alıcılara nakledilmektedir. Burada sonucun ne olacağı hemen hemen bellidir.

3.3.1. Genlerin izolasyonu ve çoğaltılması

Yönlendirilmiş gen transferinin ilk aşamasında transfer edilecek olan genin izole edilmesi ve çoğaltılması gerekmektedir. Bunu sağlamak için değişik yollar takip edilebilir. Üzerinde durulan gene ait mRNA saf olarak elde edilebiliyorsa bu mRNA nitroselüloz filtreye bağlanır. Daha önce oluşturulan DNA kütüphanesindeki genomik DNA parçaları bu filtreye aktarılır; hibridlenen genomik DNA'lar, üzerinde durulan karakteri determine eden fonksiyonel genleri taşımaktadırlar. Daha sonra bu hibridler denatüre edilerek istenen gen izole edilebilmektedir.

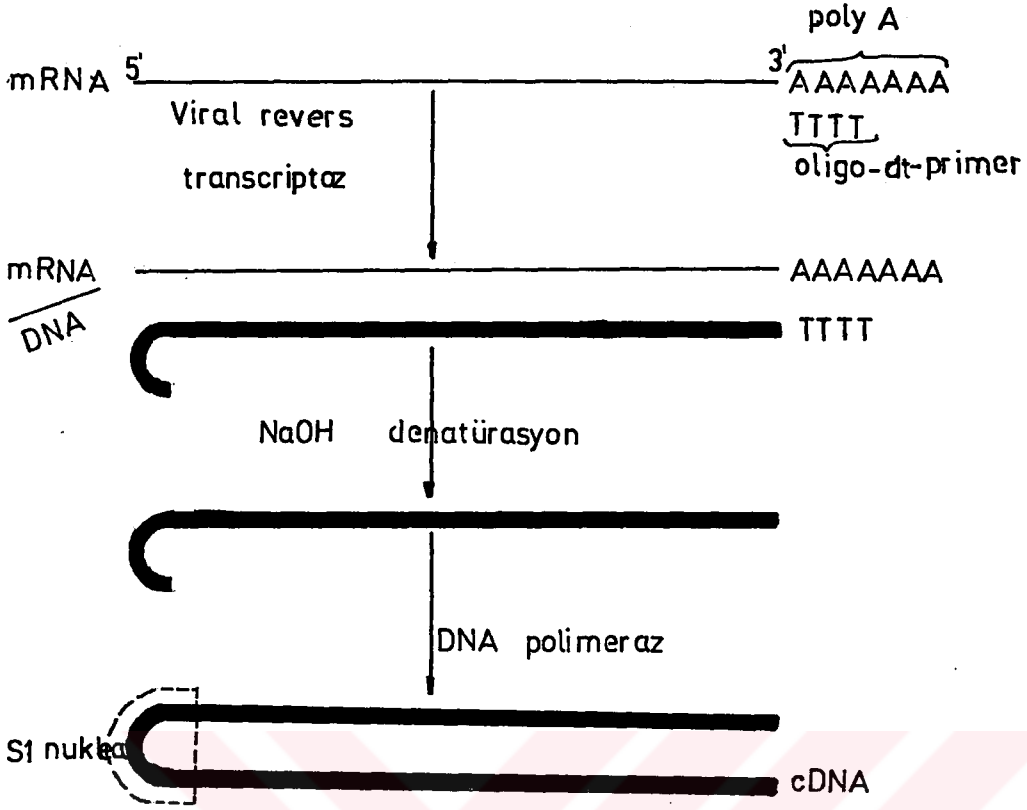
Genellikle saf mRNA elde edilememektedir. Bu takdirde bir dizi işlemler gerekmektedir. Bu işlemler aşağıdaki gibi sıralanmaktadır.

3.3.1.1. mRNA'nın izolasyonu

Genlerin izole edilebilmesi için, özellikle bir protein üretimine özelleşmiş olan hücrelerden mRNA elde edilmektedir. Elde edilen bu mRNA uygun enzimlerle muamele edilerek DNA kopyesi elde edilmektedir. Buna ait bir çalışmada sıçan büyüme hormonu mRNA'sı, glukokortikoidleri kullanmak sureti ile sıçan pituitari tümör hücrelerinden izole edilmiştir. Fare methallothionein mRNA'sı, kadmium ve çinko injekte edilerek (bu metaller methallothionein salgılanmasını artırır) fare karaciğerlerinden izole edilmiştir. İzole edilen mRNA santrifüjle veya gel üzerine akıtılarak saflaştırılabilmektedir. Bu şekilde elde edilen mRNA'lar; % 1.4 methallothionein mRNA'sı ve % 50 sıçan büyüme hormonu mRNA'sı gibi yüksek oranda istenen mRNA'ları ihtiva etmektedirler. Elde edilen mRNA'lardan genomik DNA yı tanıyacak DNA kopyelerinin elde edilmesi gerekmektedir (Frankham ve Gillings 1984).

3.3.1.2. mRNA'dan DNA kopyesinin çıkartılması

İzolasyonu yapılacak genin genomdaki yerini tanıyacak komplementer DNA parçasının sentezlenmesi amacıyla mRNA'nın DNA kopyesinden yararlanılmaktadır. mRNA'dan komplementer DNA (cDNA) 'nın elde edilebilmesi, revers transkriptaz ve DNA polimeraz I enzimi ile sağlanmaktadır. Bu amaçla mRNA'nın 3' ucundaki poli-A kuyruğu ile hibridlenecek kısa oligonükleotid zincirleri kullanılmaktadır (Şekil 3.5.). Hibridlenen bu kısım revers transkriptaz enzimi ile mRNA'ya komplementer DNA'nın sentezini sağlayarak DNA/RNA hibridini oluşturmaktadır. Bu hibrid molekül bir alkali (NaOH) ile denatüre edilmek-



Şekil 3.5. mRNA'dan komplementer DNA'nın (cDNA) elde edilmesi(Solter 1981).

te ve DNA ayrılmaktadır. Elde edilen bu DNA, DNA polimeraz I ile inkübe edilerek iki eksenli DNA oluşturulmaktadır. Buradaki problem DNA/RNA hibridinde komplementer DNA'da bir kıvrılmanın olması ve bu kıvrılmanın replikasyonla her iki eksenini birbirine bağlamasıdır. Bu bağlantı S1-nükleaz enzimi ile kesilmekte ve iki eksenli komplementer DNA (cDNA) elde edilmektedir (Solter 1981; Watson vd. 1983; Frankham ve Gillings 1984).

3.3.1.3. cDNA'nın klonlanması

Elde edilen cDNA'ya terminal transferaz enzimi ile yapay enzim bölgeleri takılmaktadır. Bu bölgeler Eco RI ve Hin dIII gibi restriksiyon enzimleri için restriksiyon yerleri bulunduran sentetik oligonükleotidlerdir. Bunlar DNA-ligaz enzimi ile cDNA'ya bağlanabilmekte ve sonra restriksiyon enzimlerle kesilerek yapışkan uçlar kazanmaktadır. Daha sonra bunlar yine aynı enzim ile yapışkan uçlar kazandırılmış plazmide bağlanır. Elde edilen rekombinant plazmidler, E.coli içine sokulmakta ve her bakterinin tek tip plazmid taşıması sağlanarak çoğaltılmaktadırlar. Bu sayede tek tip cDNA taşıyan koloniler elde edilmektedir. İstenen cDNA'nın bu kolonilerden hangisinde bulunduğu tespit edilmesi için, bakterideki rekombinant plazmid denatüre edilmekte ve filtreye bağlanmaktadır. Daha sonra da mRNA karışımı bu filtreye aktarılmaktadır. Hibrid oluşturan mRNA'lar denatüre edilmekte ve izole edilen bu mRNA'lar herhangi bir in-vitro transkripsiyon sisteminde kontrol edilmektedir. İstenen proteinin elde edilebilmesi halinde; izolasyonu yapılacak genin

genomdaki yerini tanıyacak komplementer bir DNA, başka bir deyişle bir gen sondası elde edilebilmektedir. Bundan sonra genin genomdaki yerinin tespiti amacıyla DNA kütüphanesi bu sonda yardımıyla taranabilmektedir (Frankham ve Gillings 1984).

3.3.1.4. DNA kütüphanesinin oluşturulması

Transfer edilecek geni taşıyan canlının genomu uygun restriksiyon enzimleri ile parçalara ayrılmaktadır. Bu parçalarda fonksiyonel bir gen bulunabileceği gibi birden fazla gen veya fazladan DNA dizileri de bulunabilmektedir. Bu genomik DNA parçalarının tamamı DNA kütüphanesini oluşturmaktadır. Daha önce elde edilen cDNA'lar bu segmentlerle inkübe edilmektedir. cDNA ile hibrid oluşturan genomik DNA'lar üzerinde durulan geni taşımaktadır. Bu şekilde de istenen genomik DNA tespit edilebilmektedir. Gen transferinde cDNA'lar, fonksiyonel bir geni temsil etmediklerinden kullanılamamaktadır. Yani cDNA'lar kontrol dizileri ve intronlardan yoksundurlar. Bu sebeple yukardaki gibi bir yol takip edilerek fonksiyonel bir gen için genomik DNA'dan yararlanılmaktadır.

İzole edilen fonksiyonel genin tekrar çoğaltılması gerekmektedir. Fonksiyonel gen, kontrol dizileri ve intronları da ihtiva ettiğinden molekül büyüklüğü plazmidlerle taşınamiyacak kadar artmaktadır. Bu durumda plazmid yerine vektör olarak bir virus sistemi örneğin lambda fajı kullanılmaktadır (Watson vd. 1983).

Bakteriofaj DNA'sı Eco RI ile kesilmekte ve uç parçalar saflaştırılmaktadır. Sonra da izole edilen genomik DNA parçasının iki ucuna sağ ve sol lambda fajı parçaları bağlanmaktadır. Bazı genler lambda fajında çoğaltılmamaktadır. Bunun için her iki ucunda "cos" bölgeleri olarak adlandırılan tek eksenli komplementer DNA sıralarını bulunduran lambda fajları kullanılmaktadır. Lambda fajlarının normal yaşam çemberlerinde cos bölgeleri ile birbirine bağlı yüzlerce lambda kopyesi oluşmaktadır. Sonra lambda paketleme enzimleri belli uzaklıktaki iki cos bölgesini tanıyarak, bunu lambda büyüklüğünde parçalara ayırmaktadır. Ayrılan üniteler lambda kafaları içinde paketlenmektedirler. Bu fajlar bir plazmide bağlanarak E.coli hücrelerine verilirler. Bakteriler uygun ortamlarda çoğaltıldıktan sonra genomik DNA-cos hibrid plazmidleri taşıyan hücreler marker bir gen bakımından selekte edilmekte ve genomik DNA denatüre edilerek ayrılmaktadır (Watson vd. 1983).

3.3.2. Çoğaltılan genlerin naklindeki teknikler

Yönlendirilmiş gen transferinin ilk aşamasını istenen genin elde edilmesi ve çoğaltılması oluşturmaktaydı. Bu aşamadan sonra, çoğaltılan genlerin alıcı organizmalara nakli gelmektedir. Nakil işlemini gerçekleştirmede kullanılan başlıca dört teknik aşağıda verilmiştir.

3.3.2.1. Viral teknikler

İstlenen bir genin alıcı bir organizmaya naklinde

son zamanlarda genetik materyali DNA olan viruslar kullanılmaktadır. Bu amaçla yeni geliştirilen bir adenovirus sistemi, hem insan hem de hayvan hücrelerini infekte edebilmekte ve rekombinant virusun bir ya da birkaç kopyası konakçı kromozomuna entegre olabilmektedir(Karlson vd. 1985).

DNA viruslarının bir alt kategorisini oluşturan sığır papilloma virusu, ekstrakromozomal olarak replike olduğundan genlerin hücre içinde kromozoma entegre olmaksızın muhafazalarında yararlı vektörlerdir.

DNA viruslarının avantajları; etkili oluşları ve bitki, hayvan ve bakterilerde gen transferi çalışmalarında iyi incelenmiş vektörler olmalarıdır. Dezavantajları ise, iyi incelenmiş virusların çoğunun hücre içinde replike olmaları ve bazılarının konakçı hücreleri öldürmeleridir. Ayrıca bunlar retroviruslara oranla çok daha az transformasyon etkinliğine sahiptirler. Potansiyel tehlikeleri ve düşük etkinlikleri nedeniyle hayvanlarda yaygın kullanımları halen mümkün görülmemektedir(Anderson 1986).

3.3.2.2. Retrovirus vektörler

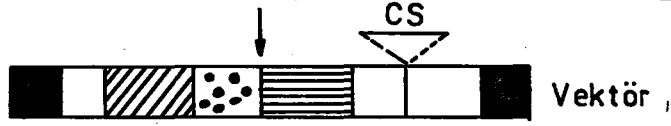
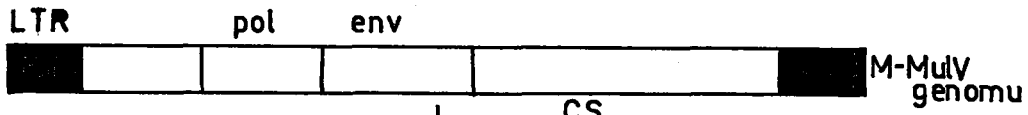
Yabancı genlerin alıcı organizmalara aktarımında bir başka teknik de retrovirus vektörleri kullanmaktır (Miller vd. 1984; Fremann ve Messer 1985; Lockett 1985; Anderson 1986; Wagner ve Jöchle 1986; Rexroad 1986). Retrovirusların tabiatta kendiliklerinden yabancı genleri taşıdıkları ve bazı genlerin etkilerinin konakçı hücrelerde görünmesini sağladıkları bilinmektedir.

Retroviruslar, RNA viruslarıdır ve büyük çoğunluğu hayvanlardaki tümörlerle yakından alakalıdır. Homojen bir

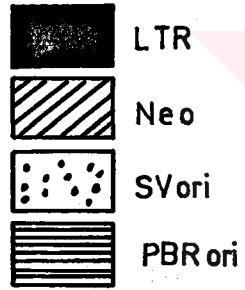
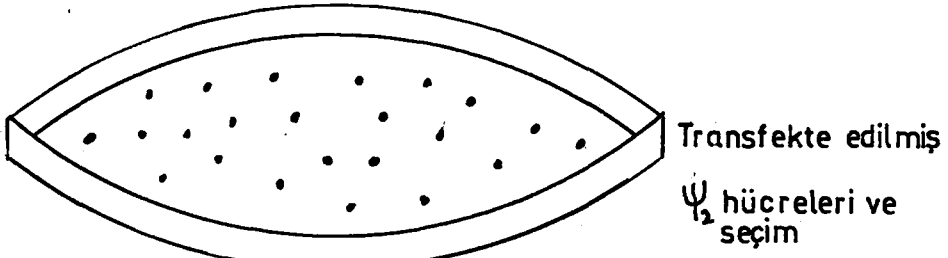
yapıya sahip olmaları ve çoğalma şekilleri sebebiyle retroviruslar gen transferinde kullanılabilecek en uygun modellerdir(Lockett 1985; Anderson 1986; Freeman ve Messer 1985). Retrovirusların diğer bazı dikkat çekici özellikleri vardır ki bunları şu şekilde özetlemek mümkündür.

Retroviruslar geniş bir konakçı spektrumuna sahiptirler, birçok hücre tipini infekte edebilirler ve RNA genomlarını alıcı hücrelere taşırlar. Buradaki entegrasyon viral genoma özeldir. Uzun-viral-terminal sıralar (LTR) transkripsiyonun başlaması ve bitişi için sinyaller oluşturur. Şekil 3. 6.'da tanımlanan retrovirus vektör sistemi Anderson (1986)'nın bildirdiğine göre Cepko vd. (1984) tarafından geliştirilmiştir. Burada vektör; Moloney murin lösemi provirusundan kaynaklanan bir transkripsiyon ünitesi ihtiva etmektedir(ki burada konakçı hücrenin DNA'sı içine entegre olmuş viral RNA genomunun DNA kopyesi provirus olarak tanımlanmaktadır).

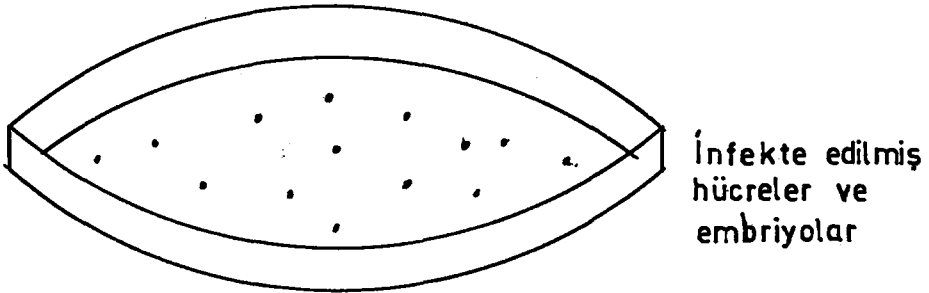
Retroviruslar, revers transkriptaz(pol) ve kılıf proteinlerinin(env) sentezini sağlayan genlere sahiptirler. Rekombinant bir virusun elde edilebilmesi için bu genlerin viral genomdan çıkartılması gerekmektedir. Çıkartılan bu genlerin yerine Neo geni(G418 antibiyotigine direnç kazandırır), ökaryotlarda replikasyonu sağlayan SVori geni ile prokaryotlarda replikasyonu sağlayan PBRori geni ve istenen DNA'nın entegre olacağı bir CS bölgesi bağlanır. Bu şekilde elde edilen rekombinant molekül bakteriler içerisinde fazla miktarlarda çoğaltılabilir. Oluşan kolonilerde bakterilerin bu rekombinant virusu taşıyıp taşımadıkları, bu bakterilerin G418 antibiyotikli ortama ekilmesi ile anlaşılabilir. Rekombinant virusa bağlanan Neo geni varlığında bakteriler G418 antibiyotigine dirençlidirler. Bu



CaPO₄
G418



Virüs ihtiva eden ortam



Şekil 3.6. Rekombinant virusların oluşturulması (Lockett 1985).

şekilde çoğaltılan rekombinant viruslar hayvan hücrelerinin transfeksiyonunda materyal olarak kullanılabilir.

Bir kalsiyum fosfat presipitasyonu formunda, hayvan hücrelerine çıplak DNA ilave edilmesi halinde hücrelerin küçük bir kısmı (0.001- 0.0001) bu DNA'yı içine alacak ve genomuna entegre edecektir. Oysa hücrelerin viral infeksiyonu oldukça etkilidir ve bir kültür içerisindeki hücrelerin % 100'ünde infeksiyona yol açabilir. Fazla miktarlarda alıcı hücreyi infekte etmede kullanılacak bir virus stoku üretebilmek için; istenen genleri taşıyan rekombinant virus DNA'sı, önce kalsiyum fosfat çözeltisi ile muamele edilerek fare hücrelerinin Ψ_2 hattına verilir. Rekombinant vektör taşıyan bu hücreler 6418 antibiyotigine dirençli olacaklar ve bu şekilde de seçilebileceklerdir. Ancak vektör, etkili bir transkripsiyon için gerekli bütün fonksiyonları (SVori ve PBRori) taşımakla birlikte, rekombinant viral RNA moleküllerinin paketlenmesi için gerekli fonksiyonları (pol ve env genleri) taşımamaktadır. Denemede kullanılan Ψ_2 hattı hücreleri ise bu fonksiyonları yerine getirmekte ve konakçı genomuna bağlanacak olan ve istenen genin tek bir kopyesini taşıyan çok sayıda infeksiyöz viral partiküllerin ortama salınmasını sağlamaktadır. Konakçı hücrelerin infeksiyonu ise bu ortamla temas yolu ile gerçekleştirilebilir (Lockett 1985, Anderson 1986).

Retrovirusları kullanarak yapılan gen transferinin, diğer tekniklere özellikle de mikroinjeksiyon yöntemine göre bazı avantajlarının bulunduğu ifade edilmektedir. Bu avantajları aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür.

Vektör sistemi; (1) Alıcı hücrelerin genomlarına entegrasyonu garanti etmektedir (2) Kültürde rekombinant viruslarla karşılaşan tüm hücreleri veya genç embriyoları infekte ve transforme etmek mümkün olabilecektir (3) İnfek-

siyonla hücrelerde veya embriyolarda ortaya çıkan fiziksel zarar en aza indirilecektir (4) LTR sıraları aktarılan genlerin etkin bir biçimde ekspresyonunu sağlayacaktır(Lockett 1985;Andersen 1986; Temin 1986).

Retrovirus vektörlerin bu avantajlarının yanı sıra bazı dezavantajları da söz konusu olabilmektedir.Bu dezavantajları aşağıdaki gibi özetlemek mümkündür.

Bazen vektör bir protooncogen'in hemen yanına birleşebilmekte ve söz konusu genin anormal ekspresyonuna sebep olarak bir tümör oluşturabilmektedir.Bu güne kadar bu sistem hayvanların eşey hatlarına gen transferinde kullanılmamıştır.Ancak son zamanlarda retroviral vektörler somatik doku modellerinde gen tedavi çalışmalarında başarılı bir şekilde kullanılmışlardır.Örnek bir çalışmada kültüre alınmış kemik iliği hücrelerine yabancı DNA'ların etkin bir şekilde transferi söz konusudur (Lockett 1985).

3.2.2.3. Kimyasal teknikler

DNA virusları kültürdeki hücrelerin hemen tamamını infekte edebilmektedirler.Ancak çıplak DNA'ların infeksiyonları bahsedilen sıklıkta olmamaktadır.Bu durumda çıplak DNA'nın CaPO_4 ile muamele edilerek çöktürülmesi halinde söz konusu sıklık optimal şartlarda 1/100 ile 1/1000 arasında bulunmaktadır(Garapin ve Garapin 1984).

Transfeksiyonda büyümekte olan tek katlı hücre kültürlerine kalsiyum fosfatla çöktürülerek elde edilen DNA süspansiyonu pipetle aktarılır.Transfeksiyonun etkisi hücre tiplerine göre farklılıklar göstermektedir.Ayrıca CaPO_4 'ün yerine dietilaminoetil dekstran kullanılabil-

diği gibi hücreler inkübasyondan iki saat sonra gliserol ile şoka uğratılabilmektedir.

Kimyasal tekniklerin bazı avantajları olduğu tespit edilmiştir.Bu tekniğin hem kolay, hem ucuz, hem de özel ekipmana ihtiyaç göstermemesi ve bir infeksiyon ajanına sahip bulunmaması avantajlı yönleridir.Dezavantajları ise eksojen DNA'nın içeri alınması ve ekspresyonunun düşük oluşu veya bir başka deyişle transfeksiyon etkinliğinin düşük oluşu ve birden fazla gen kopyasının entegrasyonun söz konusu olmasıdır.Bu dezavantajlarından dolayı, kuvvetli selektif bir avantaja bağlanmadıkça bu yöntemin hayvancılıkta kullanılabilmesi muhtemel gözükmemektedir(Anderson 1986).

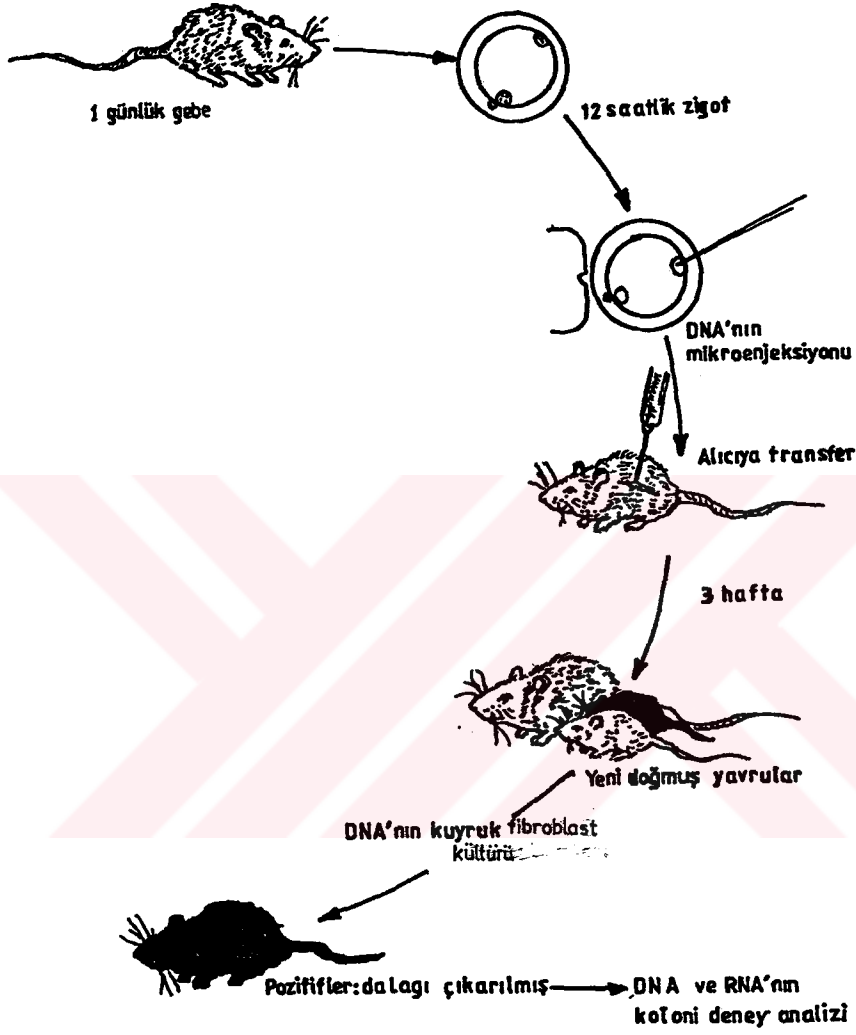
3.3.2.4. Fiziksel teknikler

Fiziksel tekniklerin başlıcaları elektroporasyon ve mikroinjeksiyon olmak üzere iki ana sınıfta toplanmaktadır.Bunlardan elektroporasyon yeni bir teknik olup, Neumann vd.(1982)'nin belirttiklerine göre, DNA'nın bir elektrik akımı vasıtası ile hücre zarından direkt transferi olarak tanımlanmaktadır.Bu teknik B-hücrelerine, immunoglobulin K geninin transferi dahil, bir çok farklı hücre tipine çeşitli genlerin naklinde kullanılmıştır.Bu yöntem hayvanlarda gen transferi açısından herhangi bir potansiyele sahip görülmemektedir(Anderson 1986).

Mikroinjeksiyon metodu ise uzun yıllardır kullanılmaktadır.Bu teknikte, istenen DNA fragmentlerinin ortamdaki alıcı hücrelere girmesini beklemek yerine, bunlar direkt olarak hücre içine verilebilmektedir(Ward vd.1984a; Ward vd. 1984b; Westphal 1984; Kraemer vd.1985 ; Rottmann vd.

1985; Church vd. 1986; Hammer vd. 1986; Brem vd. 1986; Anderson 1986). Bu yolla farelere yapılan transferler; koyun, domuz, tavşan ve diğer bazı hayvanlarda da yapılabilmektedir. Yabancı DNA, gelişmenin erken döneminde blastosel kanalına injekte edilebildiği gibi, embriyo daha tek-hücre dönemindeyken pronükleuslara da verilebilmektedir. Mikroinjeksiyon metodunun bazı dezavantajları da söz konusudur. Bunlar; yumurtaya fiziki zarar verebilmesi, alıcı genomuna yerleşen gen kopye sayılarını kontrol edememe, yeni döllenmiş yumurtadaki pronükleusları görme zorluğu ve sadece bir tek hücreye injeksiyonun uygulanabilmesi güçlükleri olmuştur. Örneğin çok sayıdaki hemotopoietik stem hücrelerinin transfeksiyonunun yapılması mümkün değildir(Anderson 1986).

Mikroinjeksiyonla ilgili örnek bir uygulamada döllenmiş fare yumurtaları içine transfer edilmiş genlerin ekspresyonu fevkalade verimli olmuştur(Şekil 3.7.). Anderson (1986)'nın bildirdiğine göre Gordon vd. (1980), bu metodu uygulamışlar ve döllenmiş fare yumurtasının iki pronükleusundan birinin içine plazmid DNA'sını injekte ederek bu uygulamayı başarmışlardır. Bu şekilde pronükleusunda plazmid DNA'sını taşıyan yumurta, yalancı gebe bir dişinin oviductuna yerleştirilebilmiştir. Sonuçta bu yumurtadan gelişen fare, bütün hücrelerinde plazmid taşıyıcı ve normal gelişmesini sürdürmüştür. Bundan başka; injekte edilen DNA, Mendel kurallarına uygun olarak açılma göstermiş ve ilgili özellikler yavrulara geçmiştir. Genomlarında eksogen DNA'yı taşıyan fareler "transgenik" olarak adlandırılmaktadır.



Şekil 3.7. Sıçan zigotlarına yapılan mikroinjeksiyon (Anderson 1986).

Diğer taraftan Hammer vd. (1986)'nın bildirdiğine göre bu tekniği büyüme hormonu bakımından defektli bir farede, sözkonusu defektin giderilmesinde kullanmışlardır. Araştırmacılar bir sıçan büyüme hormon genini, farelerde normal olarak methallothionein mRNA'sının sentezini yöneten promotor olan aktif bir regülatör(düzenleyici) sıraya bağlayarak, genetik açıdan defektli farede aktif olarak büyüme hormonu üretimini sağlayan rekombinant bir DNA elde etmişlerdir. Normal olarak methallothionein sentezini regüle eden sinyal nedeni ile büyüme hormonunun üretim düzeyinin iyi kontrol edilememesine rağmen, bu denemeler mikroinjeksiyonun bir hayvan vücudundaki tüm hücreler içine bir genin transferine imkan veren bir sistem olarak kullanılabileceğini göstermiştir.

4. YÖNLENDİRİLMİŞ GEN TRANSFERLERİNİN HAYVANLARDAKİ UYGULAMALARI

Buraya kadar gen transferinde kullanılan araçların mekanik olmaktan çok, kimyasal ve biyolojik nitelikte olduğu üzerinde durulmuş ve gen transferi teknikleri sunulmuştur. Burada ise yönlendirilmiş gen transferleriyle yapılan çeşitli uygulamalar üzerinde durulacaktır.

Değişik türlerden elde edilen genlerin sadece bakteri ve virüslara değil, yüksek organizmaların hücrelerine de sokulabilmeleri ve bu genlerin içlerine sokuldukları hücrelerin genleri ile birleşebildiklerinin gösterilmesi bitki ve hayvanların kalıtımını değiştirmede büyük ümitler doğurmuştur. Bu çalışmanın asıl hedefi gen transferinden hayvancılıkta yararlanma yolları olduğundan bu bölümde hayvanlardaki bazı araştırmalara yer verilmiştir.

4.1. Labaratuar Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar

Oxford Üniversitesinde bir grup araştırmacı bir tavşandan elde ettikleri beta-globin yapımından sorumlu olan geni, sıçanlarda yeni döllenmiş yumurta hücrelerinin çekirdeklerine injekte etmişler ve bu hücreleri sıçanların uteruslarına yerleştirerek gelişmelerini beklemişlerdir. Doğan yavru sıçanların karaciğerleri incelendiğinde, yavruların bazılarının injekte edilen tavşan beta-globin genini taşıdığını ve aynı yavruların alyuvarlarında da tavşan kökenli beta-hemoglobin bulunduğunu tespit etmişlerdir(Akman 1983).

Sıçan büyüme hormonu geninin farelerdeki etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise fare methallothionein-I (MT-I) geninin promotörü ile sıçan büyüme hormonu geni birleştirilmiş ve bu birleşik genin (MGH) 600 kopyesi fare yumurtalarının erkek pronükleusuna mikroinjekte edilmiştir. İnjektion yapılan bu yumurtalardan 170 tanesinden 21 yavru fare elde edilmiştir. Bu yavrulardan Tablo 4.1.1.'de verilen 7 tanesi (MGH) birleşik genini taşımaktaydı. Tablodaki 10 nolu yavru fareden daha sonra elde edilen 19 yavrunun 10 tanesinin de transgenik olduğu gözlenmiştir. Araştırma sonuçları farelerde sıçan büyüme hormonunun pozitif bir etkisinin söz konusu olduğunu göstermiştir (Palmiter vd. 1982).

Transgenik fare elde etme çalışmasında; klonlanmış DNA dizileri döllenmiş fare yumurtalarının pronükleus veya ooplazmasına injekte edilmiştir. İnjektion yapılan yumurtaların yaklaşık % 25'i transgenik yavrular olarak gelişmiştir (Church vd. 1986).

İnsan büyüme hormonu geninin transfer edildiği farelerde somatik gelişmedeki artış aynı batındaki kontrol kardeşlere göre % 25-30 arasında değişmiştir (Hammer vd. 1986).

Fare kemik iliği hücrelerini infekte etmek için insanlarda hipoksantin fosforibozil transferaz enzimini (HPRT) taşıyan retroviruslar kullanılmıştır. Aktif HPRT proteini hematopoietik dokularda tespit edilmiştir. Bu sonuç somatik hücre tedavisi için retrovirusların kullanılabileceğini göstermektedir (Miller vd. 1984).

Tablo 4.1.1. Farelerin büyümesi üzerine sıçan büyüme hormonu geninin etkisi (Palmiter vd.1982).

Bireyler	Transfer edilen büyüme hormonu genleri/hücre	Büyüme hormonu (kg/ml)	74 Günlük canlı ağırlık	ORAN ^x
Dişiler				
2	20	57.0	41.2	1.87
3	1	0.9	22.5	1.02
21	35	112.0	39.3	1.78
Transgenik dişilerin ort.	19	56.6	34.3	1.56
Transgenik olmayanların ort.	0	0.16	22.0	1.00
Erkekler				
10	8	0.3	34.4	1.32
14	2	0.3	30.6	1.17
16	2	17.9	36.4	1.4
19	10	32.0	44.0	1.69
Transgenik erkeklerin ort.	5	12.6	36.3	1.39
Transgenik olmayanların ort.	0	0.15	26.0	1.00

x) 74 Günlük transgenik farelerin ağırlığının, aynı batın ve cinsiyetteki farelere ait ağırlık ortalamasına oranı

4.2. Çiftlik Hayvanlarında Yapılan Çalışmalar

Herpes simpleks virus timidin kinaz (HSV-TK) genleri 85 sığır zigotunun erkek pronükleuslarına mikroinjeksiyonla sokulmuş ve böylesi zigotlardan 41 tanesi senkronize edilmiş dişi sığırların oviductlarına yerleştirilmiştir. Sığır genomuna HSV-TK genlerinin bağlanmasına ilişkin veriler henüz kullanılabılır değildir (Minhas vd. 1985).

MT-hGH (methallothionein-insan büyüme hormonu geni) birleşik geni 1032 koyun ve 2035 domuz yumurtasına injekte edilmiştir. İnjektasyon yapılan koyun yumurtalarının % 10'u, domuz yumurtalarının ise % 23'ü blastosist dönemine kadar gelişmiştir (Hammer vd. 1986).

MT-hGH birleşik geni ile yapılan başka bir araştırmada ise; 5000 embriyoya söz konusu birleşik gen injekte edilmiş ve transgenik koyun, tavşan ve domuzlar elde edilmiştir. İncelenen 18 transgenik domuzdan 11 tanesinde tespit edilebilecek kadar insan gelişme hormonu (hGH) bulunmuş, ancak gelişme üzerine bir etki görülmemiştir. Ayrıca transgenik yavru randımanı çok düşük olmuştur. Örneğin, domuzlarda mikroinjeksiyon yapılan embriyolardan elde edilen yavruların (erken doğum, ölü doğum ve fötüs dahil) % 1'i transgenik bulunmuştur (Hammer vd. 1986). Bu çalışmanın devamında İnsan büyüme hormonuna ait mRNA transgenik tavşanların karaciğerinde, domuzların kuyruk ve kulak örneklerinde tespit edilmiştir (Hammer vd. 1986).

Tavşan ve domuzlarda yapılan bir diğer çalışmada DNA solusyonu pronükleusa injekte edilmiştir. Transfer işlemi sonucu 15 (% 3.4) domuz ve 37 (% 9.6) tavşan yavrusu elde edilmiştir. Bu yavrulardan 5 tavşan ve 1 domuz transgenik olarak bulunmuştur (Brem vd. 1986).

Chourrout vd. 1986 yılında alabalıklarda (*Salmo gairdneri rich*) yumurta sitoplazmasına mikroinjeksiyon yoluyla insan büyüme hormonu cDNA'sını ihtiva eden plazmid injekte etmişlerdir. Yabancı DNA alabalık genomuna entegre olmuş ve transgenik alabalıkların devamlı olarak elde edilebileceği sonucu ortaya çıkmıştır.

Shuman ve Shoffner 1986 retikaloendotheliosis virusunu tavuk genomuna genetik materyalin integrasyonu için kullanmışlar ve böyle bir vektör yoluyla Herpes simpleks timidin kinaze (HSV-TK) genini nakledebilmişlerdir. Benzer bir çalışmada, avian lökosis viruslarının genlerinin de tavuk genomuna deneysel olarak sokulabildiğinden bahsedilmektedir (Sälter vd. 1986).

Petters vd. (1986) avian retrovirusları kullanarak domuz embriyolarına gen transferi çalışmasında başarılı olduklarını bildirmişlerdir.

5. YAPILABİLECEKLER

Gen transferi tekniğinin hayvancılığı önemli ölçüde olumlu yönde etkileyeceği bilimsel bir gerçektir. Bu etkilerin kısa vadede gerçekleşecek olanları (40-50 yıl) ve uzun vadede gerçekleşecek olanları vardır. Ayrıca gen transferinin doğrudan etkili alanları (bizzat canlının kendisine gen transferi) ve dolaylı etkili alanları vardır.

Dolaylı etkiler, bitkiler ve mikroorganizmalarda yapılan gen transferlerinin hayvancılığa olan etkileridir. Bitkisel ürünler çiftlik hayvanlarının başlıca besin kaynağını oluşturduğuna göre, bu sahada yapılacak ıslah çalışmaları hayvan beslemede etkili olacaktır. Hayvanların ihtiyaç duyduğu amino asitlerin çoğunu veya hepsini yeterli miktarda bünyesinde bulunduran bitkilerin geliştirilmesi hayvancılıkta hedeflenmektedir. Bu yöndeki çalışmalar hızla ilerlemektedir (Messing 1983; Gemming ve Gazaryan 1984).

Gen transferi ile genetik yapının değiştirilmesi uygulaması geniş çapta mikroorganizmalarda yapılmaktadır. Bu sahada elde edilecek bir sonuç da hayvancılığı çok etkileyecektir. Bunların en önde geleni de hastalıkla mücadelede olacaktır. Öncelikle klasik yöntemlerle elde edilen aşuların sakıncalı yanları ortadan kaldırılacaktır. Daha etkili, daha güvenilir aşular elde etmeye yönelik çalışmalar hızla yapılmakta ve bu yolda birçok da olumlu sonuçlar alınmaktadır (Pekin 1983; Arda 1985; Quax ve van den Broek 1985; Petters 1986). Henüz aşısı geliştirilmemiş birçok hastalığın da aşularının bulunması önümüzdeki yıllarda mümkün olacaktır. Gerek aşuların gerek antikörlerin üretim tekniği de değişmekte, bunlar etkili olduğu kadar

yeni teknikler sayesinde ucuz da olmaktadır(Petters 1986).

Biyoteknolojinin hayvan sağlığı alanında önemli bir etkiye sahip olacağı beklenmektedir. Mesela yeni doğan buzağıların, K99 pilus antijeninden monoklonal antikörlerle öldürücü kolibasiline karşı korunduğu Petters (1986) tarafından Sherman vd. (1983)'e atfen bildirilmiştir. Ağızdan bu antikörlerin verilmesi ile ishal şiddeti önemli ölçüde azalabilmekte ve böylece ölüm oranı düşmektedir. Bu tedavinin uygulanması yeni doğan buzağı ishalinin sporadik olması sebebiyle tercih edilmektedir. Aynı şekilde dünya yüzeyinde sığır, koyun, keçi ve domuzda enfeksiyonu müteakip, verimlilikte % 25'lere varan kayıplara sebep olan şap hastalığına karşı, kullanılmak üzere viral proteinlerin analizi ile tespit edilen sadece bir proteinin (VPL) immunogenik olduğu ve bununda genetik mühendisliği teknikleri ile E.coli'de ürettirilerek kullanıldığı bildirilmiştir. Bu protein sığır ve domuzda bu hastalığa karşı bağışıklık sağlamaktadır. Bu, rekombinant DNA teknolojisi ile elde edilen etkili bir protein aşısı hakkında Kleid vd.(1981) tarafından verilen ilk rapor olmuştur(Petters 1986).

Hastalık ve zararlılarla mücadelede sağlanacak bu gelişmeler sonucu, bugün çok gelişmiş ülkelerde bile hastalık ve zararlılardan bir yılda meydana gelen milyarlarca dolarlık kayıpların en aza indirilmesi yakın gelecekte beklenen sonuçlardır.

Geviş getiren hayvanların işkembelerinde, diğer mikroorganizmalar aleyhine daha hızlı gelişen ve hayvan tarafından doğrudan hazmedilemeyen yemleri daha hızlı parçalayarak daha çok mikrobiyal protein üreten mikroorganizmaların genetik mühendisliği metodları ile geliştirilmesi çalışmalarının başarıyla sonuçlanması da hayvancılığı etkileyecektir(Teather 1984, Mortloch 1986).

Henüz bazı anfibialarda sınırlı olarak gerçekleştirilmiş olan çekirdek nakli, evcil hayvanlarda da gerçekleştirildiğinde, çok değerli damızlıkların soma hücre çekirdeklerinin yumurta hücresine nakledilmesi yoluyla birçok kopyesinin elde edilmesi mümkün olacaktır. Bu ise hayvan ıslahçılarına yeni ufuklar açacak ve imkanlar sağlayacaktır. Son zamanlarda yapılan araştırmalara göre, klonlanmış genlerin embriyolara direkt nakli ile çiftlik hayvan türlerinin ıslahının mümkün olduğu ortaya çıkmaktadır (Garapin ve Garapin 1984; Gorodetskiy 1984; Bindon ve Piper 1986; Kopchick vd. 1986; Wagner 1986). Farelere başarılı gen transferi hususunda ilk rapordan bu yana önemli gelişmeler elde edilmiştir. Transgenik tavşan, domuz, koyun, sığır ve tavukların üretimi hakkında yeni raporlar yayınlanmıştır (Minhas vd. 1985; Hammer vd. 1986; Church vd. 1986; Brem vd. 1986).

Hayvan türlerinin ıslahında üzerinde durulan verim eğer bir proteince, bu proteinin sentezinden sorumlu olan genleri değiştirerek söz konusu verim kontrol altına alınabilir. Meselâ; kazein genini değiştirerek süt verimini kontrol altına almak veya yapağı üretimini artırmak üzere keratin genlerinden bir veya birkaçının regülasyonunu değiştirmek mümkün olabilir. Ancak etkileri dokuya özel tezahür eden bu gibi genlerin transgenik hayvanlarda etkilerini, olması gereken dokularda gösterip gösteremeyecekleri konusunda hemen hiçbir şey bilinmemektedir (Kavuncu 1986; Kang vd. 1986). Zira, genlerin dokuya özel etkileri regülatör DNA dizileri tarafından kontrol edilmekte olup, fareye transfer edilmiş yabancı DNA'lar için gerekli regülatör dizilerin kesin olarak belirlenmesi çalışmaları henüz başlamıştır (Kang vd. 1986). Döl veriminin

arttırılması yönünde de bazı teklifler vardır. Örneğin Boorola merinoslarında döl veriminde etkili olan major etkili münferit bir gen (F geni) bulunmakta ve söz konusu bu gen ovule edilen yumurta sayısı üzerine etkili olmaktadır. Bu genin diğer ırklara ve hatta diğer türlere transferi başarılırsa döl verimi yönünde etkili bir ıslah yapılabilecektir (Bindon ve Piper 1986).

İnsanların hayvansal protein ihtiyacının karşılanmasında hayvansal üretimin artırılması yanında bir diğer ihtimal de, hayvansal ürünlere talebin azaltılmasıdır. Bu, gıda kimyasındaki gelişmelerle, şimdiye kadar hayvanlar aracılığı ile değerlendirilebilen bir çok besinin doğrudan insanlar tarafından tüketilebilir hale getirilmesi ve bitki ıslahındaki gelişmelerle bitkisel kaynaklı proteinlerin besleme kalitelerinin yükseltilmesi ile insanların beslenme alışkanlıklarındaki değişimin birleşmesiyle mümkündür. Diğer taraftan ihtiyaç duyulan besinlerin daha az sayıda, ancak verim kabiliyeti yükseltilmiş olan hayvanlarla karşılanması sonucu, hayvan sayısının azalması da beklenen bir durumdur. İnsan nüfusunun hızla artması ve hayat seviyesinin giderek yükselmesinin de ek talep yaratacağı bu arada unutulmamalıdır. Burada dikkate alınması gereken bir diğer nokta da, hayvan sayısının azalması ve birçok yerli ırkın genetik açıdan manipüle edilmiş yüksek verimli ırklarla değiştirilmesinin, mevcut yerli ırkların kaybolması sürecini de hızlandırmasıdır. Bu durumda mevcut kaynakları günümüzde tüketerek, kazanılması bir daha mümkün olmayan bu değerleri, gelecek kuşaklara miras bırakmayan bir nesil olmak tehlikesi de vardır. Bu günkü insanlık böyle bir nesil olmamak için de çalışmaktadır. Ama bir taraftan da birçok değerli gen kaynağı nes-

li tükenen yerli ırklarla kaybolmaktadır.

Sperma ve embriyo dondurulması tekniği ile gen kaynakları yüzlerce hatta binlerce yıl saklanabilmektedir. Önümüzdeki yıllarda hayvansal gen kaynaklarının bu şekilde dondurulmuş olarak saklandığı gen bankalarının dünyanın birçok yerinde kurulması da beklenen bir gelişmedir.

Sonuç olarak, gen nakli ıslah işlemini hızlandıran ve ıslahçıya yeni ufuklar ve imkanlar hazırlayan bir tekniktir. Islah edilen bir hayvan türünün sonuçta yine kendisinden bekleneni ancak ona sağlanacak uygun bir ortamda, vermek durumunda olduğunu hatırdan çıkarmamak gerekir. Gen nakli konusu gündeme geldiğinde, tekniğin getireceği imkanların verdiği heyecandan olsa gerek, bu durum genellikle gözardı edilmektedir. Gen transferi yoluyla hayvancılığın bütün problemlerinin bir anda halledilebileceği hesabı, çok önemli çevre problemlerinin çözümü çalışmalarını yavaşlatmakta ve ileri tarihlere ertelemektedir.

6. SONUÇ VE TARTIŞMA

DNA'nın yapısının ve fonksiyonunun ne olduğu anlaşıldıktan sonra, bu sahadaki çalışmalar yeni bir boyut kazanmış ve ilkel organizmalarda başlayan genetik çalışmalar laboratuvar hayvanlarında ve nihayet evcil çiftlik hayvanlarının ıslahında kullanılabilecek bir duruma gelmiştir. Son zamanlarda DNA teknolojisinden yararlanılarak hayvancılıkta nelerin yapılabileceği hususunda araştırmalar yapılmaktadır. Buraya kadar bu konuda değişik makalelere, araştırmalara ve görüşlere yer verilmiş ve teknolojinin hayvancılıkta hangi safhada olduğu ifade edilmeye çalışılmıştır.

Araştırma sonuçlarından anlaşıldığına göre laboratuvar hayvanlarında bazı olumlu neticeler alınmış, evcil çiftlik hayvanlarında ise bu sonuçların henüz faydalanılabilir durumda olmadığı ifade edilmiştir. Yapılan bu araştırmalardan yeni yapılacak olan araştırmalar yön bulacaklardır.

Hayvancılıkta transgenik hayvanların fazla miktarlarda elde edilememesinin sebeplerinin başında genetik yapıların, bakteriler, mayalar, viruslar ve hatta fareler gibi daha basit organizmalardan kompleks oluşları gösterilebilir. Bu sebeplerden dolayı yapılması gereken işler araştırmacılarca şu şekilde özetlenmiştir: Evvela aktarılmak istenen genin iyi incelenmiş ve doğru tespit edilmiş olması, sonra da bu genin aktarıldığı canlıda fonksiyonunu yerine getirebilmesi, Mendel kanunlarına uygun açılmalar göstermesi ve nihayet sentezlenecek ürünün organizmanın ihtiyacına uygun miktarlarda üretilebilmesi yani kontrolünün sağlanabilmesi gerekmektedir.

Gen transfer işleminde fiziksel tekniklerden biri olan mikroinjeksiyon tekniği kullanıldığında transfer edilen genin her zaman istenen yere entegre olmadığı, dolayısıyla fonksiyonunu yerine getiremediği ortaya çıkmıştır. Mikroinjeksiyon tekniği kullanılarak transgenik farelerin elde edilebildiği rapor edilmiştir (Palmiter vd. 1982; Church vd. 1986; Hammer vd. 1986). Mikroinjeksiyon tekniğinin uygulamada bazı güçlükleri olduğu ve bunların; yumurtaya fiziki zarar verebilmesi, alıcı genomuna yerleşen gen kopyelerinin sayısının kontrol edilememesi ve yeni döllenmiş yumurtada pronükleusları görme zorlukları olarak ifade edilmektedir. Bazı araştırmacılar bu zorlukları yenmek için teknikler geliştirmişlerdir. Mesela, pronükleusları görme zorluğu DAPI gibi bazı boyaları kullanarak telafi edilmiştir. Mikroinjeksiyon tekniği geliştirilerek gen transferinde daha etkili sonuçların alınmasını sağlanabilir. Netice olarak şunu söyleyebiliriz; mikroinjeksiyonla fonksiyonel bir genetik materyal alıcı hücreye kalıcı bir şekilde aktarılabilir. Bunun delili olarak tavşan beta globin geninin sıçanlara aktarılması ve bu genin sıçanlarda fonksiyonunu yerine getirebilmesini gösterebiliriz.

Fiziksel tekniklerden bir diğerinin elektroporasyon olduğu bildirilmişse de bu tekniğin hayvancılıkta kullanılmasına ilişkin herhangi bir görüş ortaya atılmamıştır (Anderson 1986).

Gen transferinin gerçekleştirilmesinde bir başka tekniğin retrovirus vektörler olduğu bildirilmiştir. Diğer tekniklere göre daha fazla avantaja sahip olan retroviruslar; alıcı hücrelerin içerisine yapılan gen transferinde entegrasyonu garanti etmektedir. Hücreleri veya embriyoları infekte etmek ve transforme etmek mümkün olabilmektedir. İnfeksiyonla embriyolarda ortaya çıkabilecek

fiziksel zarar en az olmaktadır (Anderson 1986, Lockett 1985). Embriyoların transformasyonunda en güvenilir yol olan retrovirus vektörler bazı dezavantajlarının bulunması sebebiyle uygulamada birtakım tehlikeleri de beraberinde getirmektedir. Bazı durumlarda retrovirus vektör tümör oluşturabilmektedir (Lockett 1985). Bu sistem kullanılarak hayvancılıkta henüz bir fayda sağlanmamış olmakla birlikte, farelerde tümör oluşumunu teşvik eden retrovirusların kullanıldığı rapor edilmiştir. Shuman ve Shoffner (1986). tavuklarda avian retrovirusları aracılığı ile aktarılan genlerin yeni nesle geçtiğini ifade etmiştir. Buna göre retrovirusların; replikasyonları ve fonksiyonları kontrol altında tutulabilirse, gen transferi için en uygun sistemdir denilebilir. Son zamanlarda retrovirus vektörlerle hayvan ıslahı amacı ile çalışan araştırmacılar, bu sistemin hayvancılıkta henüz faydalanılabiliyor bir durumda olmadığını bildirmişlerdir.

Kimyasal işlemlerin uygulandığı bir başka tekniğin de bazı avantajlarının olduğu Anderson (1986) tarafından bildirilmiştir. Bu avantaj tekniğinin ucuz, kolay oluşu, özel ekipmana ihtiyaç göstermemesi ve bir infeksiyon ajanına gerek duymamasıdır. Buna karşılık, kimyasal tekniklerin dezavantajları ise eksojen DNA'nın elde edilmesinin zor oluşu ve transferde bazı güçlüklerin ortaya çıkışıdır. Bu sebeple söz konusu metodun hayvancılıkta üretken bir şekilde kullanılması şimdilik mümkün görülmemektedir.

Hayvanlarda üzerinde durulan karaktere ait gen transferini gerçekleştirmede en emin yolun yönlendirilmiş gen transferi olduğunu ifade edebiliriz. Zira bu sistemler, üzerinde durulan karakterin, çok kısa sürede ıslahı mümkün kılacaktır. Diğer yollarda ıslah başarılı olsa bile hem

garanti olmamakta ve hem de çok fazla süre gerektirmektedir. Burada unutulmaması gereken kantitatif karakterlerin zannedildiği kadar kolay ıslah edilemeyeceğidir. Çünkü kantitatif karakterler, etkileri toplanabilir olan çok sayıdaki genlerin(poligen) kontrolu altındadır. Hayvancılıkta genellikle üzerinde durulan özellikler kantitatif karakterde olduğu için, bu tür karakterlerin ıslahında önemli zorluklar ortaya çıkmaktadır. Bu tip engellerin aşılması bir zaman meselesi olarak görülmektedir.

Çağın harikası olarak ifade edilen bu teknolojinin ülkemizde geliştirilmesi, faydalanma yollarınının aranması, bu sahada uzmanların yetiştirilmesi için fazla zaman geçirilmemesi gerektiği unutulmamalıdır. Hayvancılığımızda da tatminkar verimler elde edilebilmesi için, pratiğe geçtiği anda gen transferinden yararlanma kaçınılmazdır.

KAYNAKLAR

- AKMAN, M., 1983. Bakteriler arasında Genetik Madde Aktarımı ve Faj çaprazlaşmalar. Bakteri Genetiği Ders Kitabı. Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fak. Yayını, No:8 (260-336) Sivas.
- ALAADDİNOĞLU, G., 1983. Endüstriyel Mikrobiyoloji. Enver T. Çetin. İstanbul Üniv. Tıp. Fak. Yayınevi.
- ALAÇAM, E., 1987. Embriyo nakli. Veteriner Hekimlikte Biyoteknoloji ve Embriyo transferi paneli. İzmir Bölgesi Vt. Hek. Odası, 4-13, İzmir.
- ANDERSON, W.F., 1986. Genetic engineering of animals. Plenum Press, 7-13, New York, USA.
- ARDA, M., 1985. Monoklonal antikolar ve bunların kullanım alanları. A.Ü. Veteriner Fak. Yayınları: 404. Ders Kitabı 136-147. Ankara.
- BAŞAK, N., 1987. Gen Mühendisliği. Hızlı Teknolojik Gelişmeler. Konferans No:1 Boğaziçi Üniv. İstanbul.
- BİLGEHAN, H., 1983. Genel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. (133-152). Ege Üniv. Tıp. Fak. Bilgehan Bakımevi Bornova, İzmir.
- BINDON, B.M., PİPER, L.R., 1986. Booroola(F) gene: major gene affecting ovine ovarian function. Plenum Press (67-93). New York, USA.
- BREM, G., BRENIG, B., GOODMAN, H.M., SELDEN, R.C., GRAF, F., KRUFF, B., SPRINGMANN, K., HONDELE, J., MEYER, J., WINNACKER, E.L., KRAUSSLICH, H., 1986. Gene transfer in rabbits and pigs. 3 rd world Congress on Genetics applied to Livestock Production (45-50), Lincoln, Nebraska, USA.
- CHOURROUT, D., GUYOMARD, R., HOUEBINE, L., M., 1986. High efficiency gene transfer in rainbow trout by microinjection into egg cytoplasm. Aquaculture (51(2): 143-150. France.
- CHURCH, R.B., McRAE, A., McWHIR, J., 1986. Embryo manipulation and gene transfer in Livestock production 3 rd World Congress on Genetics applied to Livestock Production, (133-138), Lincoln, Nebraska, USA.
- DÜZCÜNEŞ, O. ve EKİNGEN, H.R., 1983. Genetik A.Ü. Zir. Fak. Yayın No:55, Ders Kitabı: 187 2. Baskı. S:1-343. Ankara.
- EVANS, J.W., 1986. Introduction, Genetic Engineering in Animals. Plenum Press:1-3.
- FERRARA, J., 1987. Kanser Önleyici Gen. İnsan ve Kainat Dergisi Sayı 20; 12-22. İstanbul.

- FITZHUGH, H.A., 1984. Genetic aspects of germplasm storage and genetic engineering. FAO Animal Prod. and Health Paper 44(1): 21-42. USA.
- FRANKHAM, R. ve GILLINGS, M.R., 1984. Molecular Biology and its application to Domestic Animals. FAO. Animal Production and Health Paper 44/2: 89-105.
- FREEMANN, B.M. ve MESSER, L.I., 1985. Genetic manipulation of the domestic fowl—a review. World's Poultry Science Journal 41; 124-132 England.
- GARAPIN, F.C. ve GARAPIN, A.C., 1984. Genetransfer into mammalian cells. Genetics Abstracts Vol. 18, No:9, S.5.
- GENING, L.V. ve GAZARYAN, K.G., 1984. Genetic engineering in animal husbandry: Induction of essential amino acid syntesis in mamalian cells. Genetics Abstracts Vol. 17, No:7, S.16.
- GORODETSKIY, S.I., 1984. Genetic Engineering of higher animals. Genetics Abstracts Vol:17 No:5 S: 6.
- HAMMER, R.E., PURSEL, V.G., REXROAD, C.E. Jr., WALL, R. J., BOLT, D.J., PALMITER, R.D. ve BRINSTER, R. L., 1986. Genetic engineering of mammalian embryos. Journal of Animal Science 63: 269-278.
- İLERİ, İ.K., 1987. İneklerde embriyo transfer çalışması ve elde edilen sonuçlar. Vet.Hek.Biyoteknoloji ve embriyo transferi paneli. İzmir Bölgesi Vet. Hek.Odası, 30-45. İzmir.
- TEMİN, H.M., 1986. Retrovirus vektörs for genetransfer Efficient Integration intoand Expression of Exogenous DNA in Vertebrate Cell Genomes. Gene Transfer. Plenum Press S: 149-181. New York and London.
- KANG, Y., JIMENEZ-FLOREZ, R., ve RICHANDSON, T., 1986. Casein Genes and Genetic engineering of the Caseins. Genetic Engineering in Animals. Plenum Press. S: 95-102. New York and London.
- KAPLAN, L.O., M.KONOWICK, L.S.T., 1963. Method in enzimology volume 3 S:671-723.

- KARLSSON, S., HUMPHRIES, R.K., GLUZMAN, Y., NIENHUIS, A.W., 1985. Transfer of genes into hematopoietic cells using recombinant DNA viruses. Genetics Abstracts Vol:17, No:8, S:14.
- KAVUNCU, O., 1986. Hayvanlarda Gen Transferi. A.Ü.Zir. Fak.Zootekni Anabilim Dalı Semineri. Basılmamış Ankara.
- KOPCHICK, J.J., PASLEAU, F., LEUNG, F.C., 1986. Expression of the bovine growth hormone gene in cultured rodent cells. Genetic engineering of Animals: An agricultural perspective. S:19-37.
- KRAEMER, D., MINHAS, B., CAPEHART, J., 1985. Gene transfer into pronuclei of cattle and sheep zygotes. Cold Spring Harbor Laboratory, 221-227, USA.
- LEHNINGER, A.L., 1981. Biochemistry Worth Publishers. Inc. S: 319-320. Second edition, New York.
- LOCKETT, T.J., 1985. Genetic and developmental constraints on genetic engineering in Animals. Armidale, Australia; University of New England of 28-38 (34 ref., Reviews in Rural Science 6).
- LUGO, G.T. ve FOURNIER, R.E.K., 1986. Microcell Fusion and Mammalian Gene Transfer. Gene Transfer, Plenum Press, S: 79-91. New York and London.
- MARKET, C.L. ve SEIDEL, G.E., Jr., 1981. Parthenogenesis Identical Twins, and Cloning in Mammals. New Technologies in Animal Breeding. 181-199.
- MESSING, J., 1983. The manipulation of zein genes to improve the nutritional value of corn. Trends Biotekhnol. 1(2): 54.
- MILLER, A.D., ECKNER, R.J., JOLLY, D.J., FRIENDMANN, T., VERMA, I.M., 1984. Expression of a retrovirus encoding human HPRT in mice. Genetics Abstracts vo.
- MINHAS, B.S., 1985. Gene transfer to mammalian zygotes. Dissertation Abstracts International, B(Sciences and Engineering), 45, (12), 3733. USA.
- MORLON, C., 1988. Gen Haritası. İnsan ve Kainat Dergisi Sayı:31 24-37. İstanbul.
- MORTLOCH, R.P., 1986. Evolution of new metabolic pathways. Genetic Abstracts Vol:20, No:5, S:55.
- ÖNER, M., 1986. Gen Teknolojisi Dünü, Bugünü Yarını. İnsan ve Kainat Dergisi (Sayı:7) 6-16, İstanbul
- ÖNER, M., 1987. Gen Teknolojisi ve Kansere Tedavisi. İnsan ve Kainat Dergisi, Sayı:18, 23-39 İstanbul.

- ÖZKOCA, A., 1984. Reprodüksiyon. Çiftlik Hayvanlarında Reprodüksiyon ve Sun'i Tohumlama. İst.Üniv. Vet.Fak.Reprodüksiyon ve Sun'i Toh.Bilim Dalı S: 17-28. İstanbul
- PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBAZIER, M.E.ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C. ve EVANS, R.M.,1982. Dramatic growth of nice that develop from eggs mikroinjected with methallothionein-growth hormone fusion genes. Nature 300:611-615.
- PEKİN, B., 1983. Mikropların üretimi ve kullanılışı. Biyokimya Mühendisliği. Ege Üniversitesi Kimya Fak.Yayınları No:3, 76-81, İzmir.
- PETTERS, R.M., 1986. Recombinant DNA, gene transfer and the future of animal agriculture. Journal of Animal Science, 62(6), 1579-1768, USA.
- PETTERS, R.M., CHZIMAN, R.M., JOHNSON, B.H., METTUS, R.V., 1986. Gen transfer in swine embryos by infection of cells infected with retrovirus vektör.Genetic Abstracts Vol: 20. No:3. S:3.
- QUAX, W., Van den BROEK, L., 1985. Characterization of the Hamster Desmin Gene; Ekspresyon and Formation of Desmin Filaments in Nonmuscle Cells after Gene transfer. Cell, Vol:43, 327-338.
- REXROAD, C.E., Jr., 1986. History of genetic engineering of Laboratory and farm animals. Plenum Press, (127-138), New York, USA.
- ROTMANN, O.J., STRATOWA, C., HORNSTEIN, M. ve HUGHES, J., 1985. Tissue Specific Expression of Hepatitis B Surface Antigen in Nice following Liposome-Mediated Gene Transfer into Blastocysts.Zbl.Vet.Med. A, 32: 676-682.
- SALTER, D.W., E.J.SMITH, SH.HUGHES, SE.WRIGHT, L.B.,1986. Crittenden, Retroviruses as Vectors for Germ line Insertion in the Chicken, 3 rd.WCGALP, V.XII.p.51-56.
- SEVİNÇ, A., 1984. Dölleme ve Sun'i Tohumlama. A.Ü.Vet. Fak.Yayınları: 397. Ders Kitabı. 3.baskı,S:141-255. Ankara.
- SOLTER, D., 1981. Gene transfer in mammalian cells. New Technologies in Animal Breeding.201-218.
- SHOWS, B.T., 1986. Cell hybridization and the 24 Human Gene Maps. Gene Transfer Plenum Press.S:5-75, New York and London.
- SHUMAN, R.M., SHOFFNER, R.N., 1986. Gene transfer by avian retroviruses.Poultry Science 65(8):1437-1444, USA.

- STRUNNIKOV, V.A., 1983. Control of Silkworm reproduction Development ad.Sex.(280).MIR Publishers Moskova.
- TEATHER, R.M., 1984. Application of gene manipulation to rumen mikroflora. Genetics Abstracts Vol:17, No:10 S: 11-12.
- THORGAARD, G., 1986. Genetic engineering in fish. 3 rd. World Congress on Genetics applied to livestock production, (411-413), Lincoln, Nebraska.
- WAGNER, T.E., 1986. Introduction and regulation cloned genes for agricultural livestock improvement. Genetic Engineering of animals. An Agricultural perspective.S:151-161.
- WAGNER, T.E. ve JÖCHLE, W., 1986. Recombinant Gene Transfer in Animals: The potential for improving growth in livestock. Graduate Program in Molecular and Cellular Biology.
- WARD, K.A., MURRAY, J.D., NANCARROU, C.D., BOLAND, M.P., SUTTON, R.,1984a.Recombinant DNA and ruminants: the appilcation of genetic engineering to the Australian livestock. industry. CSIRO Division of Animal Production, New South Wales Veterinary Proceedings, 20, 8-15.
- WARD, K.A., MURRAY, J.D., NANCARROW, C.D., BOLAND, M.P. ve SUTTON, R.,1984b. The role of embriyo gene transfer in sheep breeding programmes. CSIRO Division of Animal Production, Cambridge University Press, 1984, 279-285. Cambridge, UK.
- WATSON, D.J., TOOZE, J.KURTZ,, 1983. The isolation of cloned genes. Rekombinant DNA.S: 72-88.
- WESTPHALL, H., 1984. Gene transfer into mamalian cells and embryos.Journal of the National Cancer Institute, 72(4): 777-781, USA.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Bekümantasyon Merkezi