

# TÜRK MALI “BUZUL AYILARI”

**TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü’nde öncü bir çalışmayla Güneş Kutup bölgesinde yaşayan bir balıktan alınan genlerle dünyanın donmaya dirençli ilk fare türü geliştirildi.**

Kuzeyde yaşayan bazı balık, bitki ve sinek türleri yaşadıkları soğuk ortamlarda (suda, havada ve toprakta) dokularında herhangi bir doku harabiyeti meydana gelmeden yaşamlarını devam ettirebiliyorlar. Bu canlıların soğuk ortamlarda yaşamlarını devam ettirebilmeleri için vücutlarında zaman zaman bazı proteinleri salgıladıkları ortaya kondu. Antarktik Okyanusu soğuyup buzullarla kaplandığında balık türlerinin çoğu

yok oldu. Fakat bir alttakıma, Notothenioidei’ye ait balıklar güçlüklerin üstesinden geldiler ve günümüze kadar bu balıklar biyolojik antifriz proteinleri yaparak yaşamlarını sürdürüyorlar. 90-100 arasında türden oluşan bu alttakım, yalnızca Güney Kutup bölgesinde bulunur. Bu bölgedeki balık türlerinin üçte ikisi Notothenioidei’dir; bu balıkların çoğu dip balıklarıdır ve hemen hepsi güçlü antifriz özellikleri olan bileşikler üretirler.

Bu bileşikler vücut sıvılarının donma noktasını düşürerek balıkları donmaktan korur. Antarktika, Avustralya’dan ve Güney Amerika’nın ucundan tümüyle ayrılınca, kıyıları koca, soğuk ve derin okyanusla çevrelendi. Soğuk su, ılıman iklim balıklarının yok olmasına yol açtı, ancak notothenioideiler yaşamaya devam ettiler. Soğuğun etkisiyle evrimleşmeye başladılar. Notothenioideilerin evrimleşmesine ve diğer balıkların başarısız ol-

duğu bir yerden yaşamlarını sürdürebilmelerine olanak sağlayan uyum biçimleri, araştırmacıların çalışmalarını odakladıkları bir konu. ilişkin bölgede araştırmacılar araştırmaya başlamışlardır. DeVries, Antarktik balıklarının donmayı hangi mekanizmayla engellediklerini açığa çıkarmak için yıllar önce adaya gitmeye başladı. Aslında Güney Kutbu balıklarını karanlık ve soğuktan daha korkunç bir tehlike buzdur. Buz, balıklar için ciddi bir tehlikedir, çünkü yapılan araştırmaların gösterdiği gibi, balığın solungaçlarından ve derisinden kolaylıkla sızar. Sıcaklığı dengedeki donma noktasının 0,1 °C altına düşmüş bir balığın çevresindeki buz, balığın derisinden içeri sızarak vücut sıvılarını dondurur. Çoğu tropik ve ılıman iklim balıkları, çevrelerindeki suda buz olduğu takdirde vücut sıcaklıkları -0,8 °C dolaylarına düştüğünde donar. Antarktik balıklarının donma noktası düşüşünü dengelemeleri ve sonuç olarak yaşamlarını sürdürebilmeleri, vücut sıvılarında bulunan çeşitli antifriz moleküllerine bağlı. Bugüne kadar incelenen notothenioid türlerinin çoğunun antifriz moleküllerini yaptığı belirlendi. Bu antifriz molekülleri, peptid ve glikopeptid yapılarıdır. Antifrizler, buz parçacıklarına bağlanarak onların büyümelerini engelleyerek vücuda zarar vermelerini engeller. Bu çerçevede, soğuk su balık türlerinden elde edilen protein (antifriz protein, AFP) ve glikoproteinlerin (antifriz glikoprotein, AFGP) içinde buldukları dondurma solüsyonlarının donma noktalarını daha aşağı ısıya indirdikleri, laboratuvar çalışmalarında gösterilmiş bulunuyor. Ayrıca, farklı özellikler ve moleküler ağırlıklara sahip olan AFP moleküllerin donma esnasında oluşan buz kristalciklerine bağlanarak bunların büyük kristallere dönüşmesini engelledikleri ve böylece doku ve hücrelerin düşük ısıya dayanıklılıklarının arttığı saptanmış durumda. In vivo (canlı içi) koşullarda, düşük ısıli ortamlarda soğuk



Anaç "buzul faresi" ve yavruları

su balıklarının serum ve dokularındaki AFP III protein derişiminin çok önemli ölçüde artışı ve saflaştırılan proteinin buz kristallerinin oluşmasına engel oluşunun in vitro (laboratuvar koşullarında) olarak kanıtlanması, AFP III proteininin işlevinin dondurma çalışmalarındaki önemini artırmış bulunuyor.

İn vitro çalışmalara paralel olarak yapılan in vivo çalışmalarda, *Macrozoarces americanus* isimli soğuk su okyanus balıklarında çeşitli doku ve serumlarında yüksek konsantrasyonda AFP II-I proteini bulunduğu belirlendi. Bu proteinin kış aylarında balık serumlarında çok yüksek derişimlere ulaştığı ve in vitro koşullarda buz kristalleri oluşmasını engellediği kanıtlandı. AFP proteinleri hayvan yumurtası, kırmızı kan hücresi ve sıçan karaciğer hücrelerinin dondurulmalarında da etkin bir protein olarak kullanıldı ve in vivo çalışmalar için bazı balık türleri, *Drosophila melanogaster* ve bazı bitkilere AFP gen transferleri yapılarak transgenik canlılar elde edildi ve bu canlılarda AFPs'lerinin salınımları gösterildi. Ancak, AFP'lerin etkileri transgenik balık, sinek ve bitkilerde yapılan çalışmalarla sınırlı kaldı ve bu proteinlerin memeli organizmalardaki işlevlerinin ne olacağı bilinmemekte. Bu bağlamda, AFP III proteininin memeli hayvanlarda nasıl bir işlevselliği olacağı ve bu proteinin muhtemel işlevselliğine bağlı olarak geliştirilebilecek inovatif yeni bir dondurma perspektifinin transgen teknolojisini bazında oluşturulması,

bu alandaki bilimsel-teknolojik çalışmalara yeni bir boyut kazandıracak nitelikte. Ancak, AFP geni memeli hayvanlarda bulunuyor. Düşük ısıli ortamlarda önemli bir işleve sahip olan AFP proteininin memeli organizmalarda işlevsel olup olmadığının belirlenmesi, bilimsel ve teknolojik bir araştırma konusunu oluşturuyor.

1980'li yılların başından itibaren geliştirilen Transgen Teknolojisi, genoma başka bir organizmaya ait gen veya işlevsel gen parçacıkları taşıyan ve genomik açıdan doğada başka benzerleri bulunmayan "transgenik hayvanların" eldesini ve değişik nitelikli araştırma ve uygulama modellerinin geliştirilmesini mümkün kılmış bulunuyor. Hem genetik özelliklerinin insanlara olan yakınlığı, hem de üretim kolaylıkları nedeniyle, transgenik çalışmalarda fareler sıklıkla kullanılmaktadır. Bu bağlamda, embriyo dondurma teknolojisindeki problemlerin aşılması amacıyla üzerinde çalışılan konulardan biri de, memeli hayvanlarda antifriz proteininin işlevsel mekanizmasının aydınlatılması.

Bunun için laboratuvarımızda yaptığımız araştırmada, düşük ısıli ortamlarda salınan (eksprese olan) AFP III geninin fare embriyolarına mikroenjeksiyon tekniğiyle transfer edilmeleri ve böylece bir fare modelinin geliştirilmesi amaçlandı. Söz konusu transgenik model, hem AFP-III geninin memeli genomundaki davranışları hakkında yeni bilgiler sağladı, hem de memeli embriyo ve hücrelerinin dondurulmasında yeni tekniklere açılım sağlamış oldu. Sonuç olarak, AFP-III genini taşıyan transgenik farelerle ilgili araştırma, dünyada ilk defa laboratuvarımızda yapıldı ve sonuçlar uluslararası dergilerde yayınlandı. Yapılan araştırma, literatürdeki bu büyük açığın doldurulmasını sağlamış ve şu ana kadar yapılan ilk çalışma olma özelliğini kazandı.

Notothenioid türü balıklar







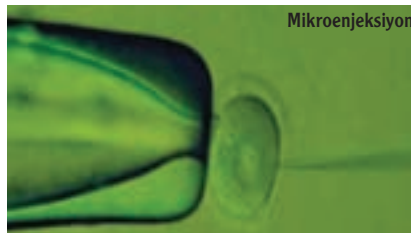
Doç. Dr. Haydar Bağış

Çalışmada kullanılan taşıyıcılar (vektörler) (pActin-EGFP, Clontech) Georgia Üniversitesi Veteriner Fakültesi'nden, AFP III geniye pUC8 plazmidine klonlanmış olarak (OP5A), Prof. Peter L. Davies (Kanada Queen's Üniversitesi Biyokimya ABD başkanı) tarafından temin edildi. Ulusal ve uluslararası bilimsel işbirliğiyle gerçekleştirilen bu araştırmanın ilk adımında AFP III geni alt klonlama (subcloning) yöntemiyle kanatlı beta-aktin promotörü içeren bir ekspresyon vektörüne aktararak laboratuvar ortamında çoğaltıldı, saflaştırıldı ve kesilerek mikroenjeksiyona hazır hale getirildi. Uygun derişime getirilen lineer AFP III gen grubu mikroenjeksiyon yolu ile fare zigotlarına transfer edildi ve gen aktarımı yapılmış embriyoların laboratuvarda kültürünü takiben alıcı dişi farelere transfer edilerek transgen adayı fare yavruları elde edildi. Kutuplardaki dip deniz balıklarından alınan "antifriz geni" laboratuvarında değiştirilerek deney faresine aktarıldı ve yeni bir tür fare yaratıldı. Yaklaşık 7 yıl süren projede üretilen transgenik fareye "Buzul Ayısı" adı verildi. Bu fareler soğuğa dirençli olan dünyanın ilk transgenikleridir. TÜBİTAK MAM Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Transgen ve Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda yapılan bu çalışmayla embriyo dondurma ve saklama konusunda yeni bir çığır açılmış oldu.

Buzul faresi adı verilen bu transgenik deney fareleri, türdeşlerinden çok farklı. Normal bir deney faresi ancak 22-24 derece gibi normal oda koşullarında yaşayabilirken buzul fareleri, +4 gibi insanları bile zorlayan hava koşullarına dayanabiliyorlar. Çünkü buzul faresinin genlerinde onu donmaya karşı koruyan bir şeyler var; kutuplardaki derin deniz balıklarında bulunan ve bu hayvanları derin denizlerin soğuk etkisinden

koruyan "antifriz geni"

Konuyla ilgili çalışma bir soruyla başladı. Laboratuvarımızda, 1999 yılından beri embriyo dondurma teknikleri üzerinde çalışmalar yapmaktayız, "buzul ayısı"nı üretme fikri de embriyo dondurma teknikleri üzerinde çalışılırken ortaya çıktı. Sıfır derecenin altında yaşayan bazı hayvanların donmama nedenlerini düşünürken bunun hayvanın vücudunda ürettiği bir proteinin soğuk ortamlarda salgılanması bilinmekteydi, dolayısıyla antifriz geni taşıyan bir transgenik fare yapmaya karar verdik. Böylece bu farenin yumurtalarını, embriyolarını, karaciğer, dalak, beyin, kas hücrelerini ve yumurtalıklarını dondurmadan buzdolabında veya dondurarak -196 °C'deki sıvı azot tankında ne kadar canlı olarak saklayabileceğimizi öğrenmeyi düşündük. "Buzul ayısı"yla ilgili çalışmalara başlarken antifriz genini nereden bulabileceğimizi araştırdık ve balıklardaki bu geni bulan bilim adamının Kanada'da yaşadığını öğrendik. Queens Üniversitesi'nden Prof. Dr. Peter L. Davies'le irtibata geçerek Kanadalı bilim adamından geni istedik ve Dr. Peter antarktık balığında bulunan antifriz genini membran bir kağıda emdirilmiş bir şekilde posta ile Kanada Queen Üniversitesi'nden Türkiye'ye yolladı. Ama gelen gen bir balığa ait olduğu için ekibimiz tarafından genin nükleotid dizisinden faydalanarak geni memeli sistemine aktarılabilir hale getirdik. Yaklaşık sekizinci mikroenjeksiyon denemesinde



balık genini memeli sistemine dönüştürebildik, daha sonra bir yıl sürecek gen enjeksiyonlarına başladık. İki yıl içerisinde ilk anaç transgenik fareleri elde edebildik.

## Fareler Hayatlarından Son Derece Hoşnutlar

Çalışmamız sonucunda yüzlerce fare üretildi, "İlk kullanılan transgenik fareleri normal fareler ile çiftleştirdik ve bunlardan onlarca fare elde edildi. Aralarından transgenik olanları PZR tekniği ile belirledik ve elde edilenlere F1 nesli dedik. Sonra bu kuşağı kendi aralarında çiftleştirdik ve yine aynı teknikle transgenik olanları bulduk. Bu şekilde yirminci kuşak yavrulara ulaştık. 2000 yılından beri devam eden projemiz süresince elde ettiğimiz transgenik farelerde morfolojik olarak herhangi bir bozukluk saptamadık. "Hepsi normal oda ısısında yaşıyorlar. Ancak soğuk ortamlarda normal farelere göre dayanıklılıkları oldukça yüksek. Ayrıca, +4 derecede bile yaşayabiliyorlar.

Sonuç olarak buradan elde edilen veri ve deneyimlerden faydalanarak edilecek bilgi ve deneyimler, ileride aynı çalışmanın koç ve teke spermaları üzerine yönlendirilmesine imkân sağlayabilecek. Bilindiği üzere, koç spermasının dondurulup çözündürülmesi önemli oranda spermatozondaki akrozomda bozukluklara sebep olmakta. Antifriz protein geni taşıyan transgenik koçlar elde edildiği takdirde, spermanın dondurulup çözündürülmesi sonrası meydana gelebilecek akrozomal bozukluklar ortadan kaldırılabilir ve genetik olarak soğuk ortamlara dirençli koçlar elde edilebilir.

Doç. Dr. Haydar Bağış  
TÜBİTAK MAM-Gen Mühendisliği ve  
Biyoteknoloji Enstitüsü (GMBE)  
Transgen ve Deney Hayvanları Lab. Sorumlusu

### Kaynaklar:

1. Haydar Bağış, Dığdem Aktopraklıgil, Hande Odaman Mercan Nevzat Yurdusev, Gazi Turgut, Sakir Sekmen, Sezen Arat, Seyfettin Cetin (2006), Stable transmission and transcription of Newfoundland ocean pout type III fish antifreeze protein (AFP) gene in transgenic mice and hypothermic storage of mouse gametes with AFP. Mol.Rep.Dev. 73: 1404-1411.
2. Haydar Bağış, Tolga Akkoc, Arzu Tas, Dığdem Aktopraklıgil: Cryogenic Effect of Antifreeze Protein on Transgenic Mouse Ovaries and Production of Live Offspring by Orthotopic Transplantation of Cryopreserved Mouse Ovaries. Mol.Rep.Dev. 2007 Basımda
3. Haydar Bağış, Arzu Tas, Orhan Kankavi, Ayhan Ata: Determination of the Stable Expression of Fish Antifreeze Protein (AFP) in several Tissues of Transgenic Mice until F7 generation. Journal of Experimental Zoology. 2007. İncelemede