



# Transgenik Hayvan Üretimi

Hayvancılıkta biyoteknoloji dersi

# TRANSGENİK HAYVAN TEKNOLOJİSİ

- Transgenik hayvanlar gen transferi yoluyla hücrelerinde yabancı genleri taşıyan hayvanlardır.
- Çiftlik hayvanlarına gen transferinden beklenenler şunlardır:
- Hayvanların büyüme parametrelerinin iyileştirilmesi, üreme oranının artırılması, süt üretimi, besin değerinin artırılması ve kompozisyonunun değiştirilmesi (laktozsuz süt, amino asit yapıları değiştirilmiş proteinler vb)

- Yapağı üretim miktarının ve kalitesinin artırılması, hayvanların yemden yararlanma kabiliyetlerinin artırılması, hastalıklara dirençliliğin yükseltilmesi, transgenik hayvanların organ vericisi haline getirilmesi amaçlanmaktadır
- İnsan ve hayvan sağlığı açısından çok önemli olan bazı proteinleri ve terapötik maddeleri gen transferi yoluyla hayvanların kanından veya sütünden salgılanarak elde edilmesi amaçlar arasındadır.

# Transgenik hayvanlar üretim teknikleri

- Transgenik fare: Kullanılan yöntemler (Retrovirus vektörü, DNA mikro-enjeksiyonu, embriyonik kök hücre ( stem cell)kullanımı, Cre-loxP rekombinasyon sistemi, Yüksek kapasiteli vektörler)
- Transgenik farede hedeflenen belli başlı amaçlar: applications (Alzheimer tedavisi, test sistemleri oluşturmak, hücre ölümünün kontrolü)
- Çekirdek transferi ile transgenik çiftlik hayvanı üretimi
- Transgenik sığır, koyun, keçi ve domuz
- Transgenik kanatlı hayvanlar
- Transgenik balık

## Pronükleer mikroenjeksiyon yöntemi

- Bu yöntem yabancı genetik materyalin bir hücreli aşamadaki embriyoların pronukleuslarına direk olarak aktarılması olarak tanımlanmaktadır. Pronükleer mikroenjeksiyonla genin aktarımında, genler genoma birkaç ile yüzlerce kopya arasında değişen sayıda rastgele bölgelerden integre olmaktadır.
- Aktarılmış olan gen anneden yavruya aktarılarak generasyonlar arası geçiş özelliği gösterebilmektedir. Yöntem ilk kez fareler üzerinde çalışılmıştır.
- Koyun, sığır gibi çiftlik hayvanlarının kullanıldığı başarılı çalışmalar yapıldığı bildirilmiştir.
- Mikroenjeksiyon yönteminde transfer edilecek genin iki temel bölgeden oluşacak şekilde hazırlanması gerekir. **İlk bölge protein** kodlayan diziler olan exon ve protein kodlamayan diziler olan intronlardan oluşur ve transkripsiyonel unite olarak adlandırılır. **İkinci bölge** promotor, enhancer, reporter olarak adlandırılan genin ekspresyonunu kontrol eden düzenleyici elementlerin bulunduğu bölgedir.

- **Promotor bölgeler** transgenin ekspresyon göstereceği bölgeleri ve zamanı belirleyen düzenleyici diziler olarak tanımlanmaktadır. **Enhancer bölgeler** bulunduğu genin transkripsiyonunu arttıran dizilerdir.
- Protein kodlayan diziler reporter olarak adlandırılır ve translasyon başlama kodunu, transgen sonlandırma kodunu ile kozak dizisi olarak adlandırılan özel dizilerden oluşurlar
- Mikroenjeksiyon zamanının ve uygulanacak bölgenin seçimi önemlidir. Mikroenjeksiyon aşamasında, dişi ve erkek pronukleusu görünür halde olan bir hücreli aşamadaki embriyolar seçilmektedir.
- Mikroenjeksiyonun dişiye göre ortalama iki kat büyüklükteki erkek pronukleusa 1-2 pikolitre miktarında yapıldığı ve pronukleusun iki katı büyüklüğe ulaşmasının mikroenjeksiyonun başarılı bir şekilde gerçekleştirildiği yönünde en önemli gösterge olduğu bildirilmektedir.
- **Bir diğer husus**; yüksek konsantrasyondaki genetik materyalin enjeksiyonu embriyoların ölümüne sebep olmaktadır.
- Ortam ısısının da işlemin başarısını etkileyen önemli bir diğer parametredir. Mikroenjeksiyon başarısı kadar, mikroenjeksiyon yapılmış embriyoların taşıyıcı dişilere aktarımını da uygulamanın hassas bir aşamasıdır.

## Viral vektörlerle gen transferi tekniđi

- Hayvanlarda embriyonal dönemde, ökaryotik viral vektörler aracılığı ile gen transferi yapılabilmekte ve aktarılan genler genomik yapıya katılarak ekspresyonları sağlanmaktadır.
- DNA ve RNA karakterinde genetik materyal taşıyan viruslar içerisinde en çok tercih edilen viral vektor RNA karakterli bir virus yani ***retrovirus***.



### ***Retroviral gen aktarımı:***

- Erken gelişim dönemindeki embriyoların (8-16 hücre), aktarımı yapılmak istenen gen bölgesini taşıyan rekombinant retroviral vektorler ile enfekte edilmesi prensibine dayalı bir gen transfer yöntemidir.
- Retrovirusler, yüksek entegrasyon kapasiteleri ve taşıdıkları genetik materyalin hedef genoma tek kopya olarak entegre olma başarısının yüksek olması özellikleri nedeniyle ideal taşıyıcılardır
- Retroviral gen transferi yöntemi kullanılarak, sığır, koyun, tavuk, balık ve laboratuvar hayvanlarında başarılı gen transferi çalışmalarının yapıldığı bildirilmiştir.
- Genetik materyal olarak RNA taşıyan rekombinant retroviruslerin hedefe aktarımı ile virusun yapısında bulunan viral ters transkriptaz enzimi aktifleşir ve RNA formundaki genetik materyal DNA'ya çevrilerek genoma entegre olur.
- Retroviral gen aktarım metodunda karşılaşılan en büyük sorun virusun fiziksel hacminin getirdiği fiziksel kısıtlama sebebi ile yalnızca sınırlı büyüklükteki genetik materyalin aktarılabilmesidir. Transfer edilecek geni taşıyan retroviruslerin hazırlanması için teknolojik laboratuvar gerekmesi ve maliyetinin yüksek olması yöntemin olumsuz yanıdır.

## Embriyonik kök hücre yöntemi:

- ❖ Embriyonik kök hücreler blastosist aşamasındaki embriyoda embriyonik disk hücre kitlesinden köken alan hücrelerdir.
- ❖ Bu hücreler endoderm, mezoderm ve ektodermden köken alan çoklu hücre tiplerine dönüşebilme yeteneğine sahiptir. Embriyonik kök hücreler, ilk kez Evans ve Kaufman adlı araştırmacılar tarafından 1981 yılında fare embriyolarından elde edilmiştir.
- ❖ Embriyonik kök hücre yolu ile gen aktarımı; elektroporasyon veya transfeksiyon yolu ile gen aktarımı yapılmış kök hücrelerin morula ya da blastula aşamasındaki başka embriyoya aktarılması olarak tanımlanır.
- ❖ Embriyonik kök hücre ile gen aktarımının avantajlarından biri, genetik manipülasyon sonuçlarının hücreler embriyoya verilmeden önce in-vitro olarak, gerek farklılaşmamış hücrelerde gerekse farklılaşma esnasında izlenebilmesidir.

## Spermatozoa hücreleri aracılığı ile gen transferi:

- ❑ Spermatozoa hücreleri kullanılarak gen transferi yapılabileceğini bildirilen ilk çalışma 1971 yılında Brackett ve ark. tarafından farelerde yapılmıştır. Sonraki yıllarda spermatozoa hücreleri ile gen aktarımı yöntemi sığır, koyun, keci, domuz gibi birçok çiftlik hayvanında uygulanmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır.
- ❑ Spermatozoaların yabancı bir geni yapısına katma yeteneğinin yüksek olduğu, ancak bunun mekanizması ile ilgili kesin bir bilgi bulunmadığı bildirilmektedir.
- ❑ Yöntemin uygulanışında transfer edilecek gen spermatozoalar ile birlikte birkaç saat inkubasyona tutulur. İnkubasyon sonunda gen transferi gerçekleşmiş olan spermatozoalar ile in-vitro fertilizasyon işlemi yapılır.
- ❑ Spermatozoa aracılığıyla gen transferi, yöntemin doğallığı nedeniyle en olumlu gen transfer tekniklerinden biri olduğu düşünülmektedir. Özellikle domuzlar kullanılarak yapılan çalışmalarda oldukça yüksek bir başarı elde edilmişken aynı başarıya sığırlarda ulaşılamamıştır.
- ❑ Nispeten daha kolay ve düşük maliyetli olan bu yöntem, spermatozoanın çok özel ortamlarda yaşama gücünü koruyabilmesi, yaşam süresinin ise kısa olması nedeniyle dezavantajları olan bir uygulamadır.

## Klonlama teknolojisi ile gen transferi:

- ❑ Klonlama teknolojisi ile gen transferinde kullanılan en temel teknik nükleer transferdir.
- ❑ Nükleer transfer, verici anneden alınan döllenenmemiş yumurtanın çekirdeğinin çıkarılması ve kopyalanmak istenen başka bir organizmadan alınan hücrenin çekirdeğinin bu içi boşaltılmış yumurtaya aktarılması yolu ile tüm organizmayı kopyalama prensibine dayalı bir tekniktir.
- ❑ Nükleer transfer yapılan yumurtalar elektrofüzyon ve aktivasyon işlemlerinden sonra in-vitro kültür ortamlarında kültüre alınırlar.
- ❑ Yöntemin uygulama anında hücrelerin hücre döngüsünün hangi evresinde bulunduğu nükleer transfer başarısını etkileyen en önemli parametre olduğu görülmüştür.

## Elektroporasyon:

□ Hayvan hücrelerine yabancı DNA'nın transferinde kullanılan ve başarılı olduğu bildirilen bir methodur. Sözü edilen bu yöntemde hücre membranının geçirgen özelliğinden yararlanılır. Döllenmiş yumurtaya elektrik akımı verilerek membranda oluşan geçici porlardan DNA'nın aktarımı sağlanmaktadır.

□ Elektroporasyon yönteminin büyük tecrübeye ve manuplasyon becerisine sahip olmaksızın uygulanabilmesi tekniğin önemli avantajıdır.

