ANKEM Derg 2008;22(Ek 2):5-8

2007 NOBEL ÖDÜLÜ ÖYKÜSÜ: EMBRİYONİK KÖK HÜCRELERİ VE KNOCK-OUT FARE MODELLERİNİN ÖNEMİ

Emin KANSU

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı ve Onkoloji Enstitüsü, ANKARA
ekansu@ada.net.tr

ÖZET

Fare embriyonik kök hücreleri 1981 yılında, insan embriyonik kök hücreleri de 1998 yılında in-vitro şartlarda gösterilmiştir. 2007 Tıp ve Fizyoloji Nobel ödülüne layık görülen Oliver Smithies, Mario Capecchi ve Sir Martin Evans fare embriyonik kök hücrelerini "homolog rekombinasyon" yoluyla hücre içine dışarıdan yerleştirdikleri genlerle genetik olarak modifiye etmeyi başarmışlardır.

Araştırıcılar gen-hedefleme teknolojisi sonucunda fare hücrelerinde belirli bir genin susturulabileceğini (gene knock-out, K/o) göstermişlerdir. Böylece susturulan genin fizyolojik ve biyolojik önemi ile hastalık durumlarındaki etkilerinin incelenmesi mümkün olabilmiştir. Knock-out fare modellerinin geliştirilmesi günümüzde biyolojik ve sağlık bilimlerine en çok katkıda bulunabilecek buluşlardan biri durumuna gelmiştir.

Anahtar sözcükler: *embriyonik kök hücreleri, knock-out fare, transjenik fare*

SUMMARY

2007 Nobel Prize in Medicine and Physiology: Importance of Embryonic Stem Cells and Knock/out Mouse Models

Embryonic stem cells can form all three germ layers including mesoderm, endoderm and ectoderm. These layers can also differentiate to cardiomyocytes, hepatocytes, neural progenitors, osteoblasts, chondrocytes and endothelial cells. In the early 1980's a novel technology known as gene transfer (transgenics) was developed. Oliver Smithies, Mario Capecchi and Sir Martin Evans created a "Knock-out, K/o" mouse by inserting gene at a precise location in the mouse genome. This leads to a process in which a particular gene of interest to be removed to define the precise effects of the gene. The gene knockout is created by selectively disabling a specific target gene in embryonic stem cells.

Keywords: *embryonic stem cells, knock-out mouse, transgenic mouse*

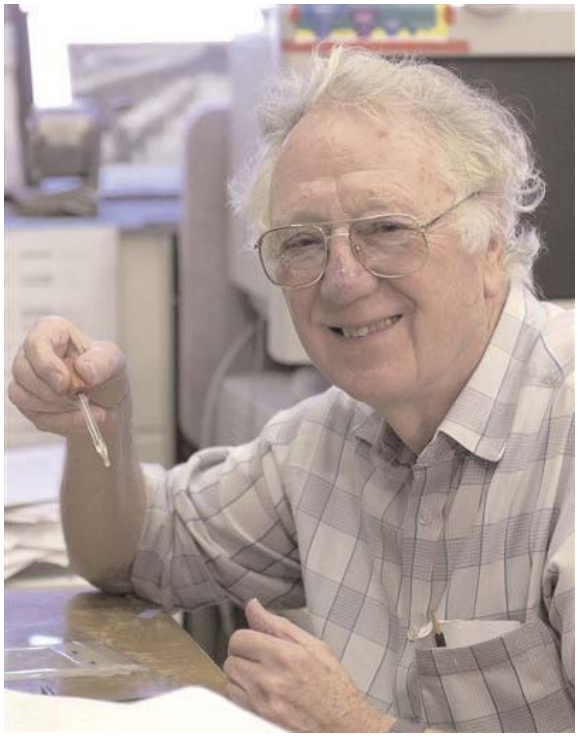
Embriyonik kök hücreleri ilk kez 1981 yılında Sir Martin Evans tarafından farelerde blastositlerin iç hücre (inner-cell mass) kitlelerinden izole edilmişler ve fare fibroblast hücre dizileri üzerinde in-vitro şartlarda kültürlerde üretilmişlerdir[5,6,9,10].

İnsan embriyonik kök hücreleri (hESC) ilk kez 1998 yılında Wisconsin Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde Dr Jamie Thomson ve ark.[15] tarafından infertilite nedeniyle in-vitro fertilizasyon (IVF) işlemi için tedavi programına alınan çiftlerden geriye kalan artık embriyolardan elde edilmişlerdir. Thomson ve ark.[15] blastosit iç hücre kitlesindeki 160 ila 180 embriyonik kök hücreyi lazer diseksiyon mikro-cerrahi yöntemiyle blastosit içinden ayırmışlar ve fare embriyonik fibroblastları üzerinde petri kutularında kültüre koymuşlardır. Fare fibroblastları üzerinde çoğalan embriyonik kök hücrelerini pasajlar yaparak ve yeni petri kutularında kültür ortamlarına ekerek hücreleri diziler halinde uzun süre koruyabilmişlerdir. Embriyonik kök hücrelerinin "Embriyoid cisimcikler=embriyoid bodies" olarak eldesi mümkün olabilmektedir.

Knock-out fare modelleri

2007 Tıp ve Fizyoloji Nobel Ödülü, Mario Capecchi, Oliver Smithies ve Sir Martin Evans'a verilmiştir[16]. Bu üç değerli araştırıcının fare kök hücrelerinde geliştirdikleri yeni teknikler genetik değişiklikler sonucu memelilerdeki fizyolojik süreçlerin anlaşılmasına olduğu kadar

***Resim 1a**: Sir Martin Evans.*



***Resim 1b**: Prof.Oliver Smithies.*

birçok hastalığın fizyopatolojisinin de anlaşılmasına ışık tutmuştur.

Sir Martin Evans, 1941 yılında İngiltere'de doğmuştur, halen Cardiff Üniversitesi'nde kistik fibrozis üzerinde çalışmakta ve Genetik profesörü olarak görev yapmaktadır (Resim 1a).

Oliver Smithies, 1925 yılında İngiltere'de doğmuştur. Chapel Hill'de, North Carolina Üniversitesi'nde Patoloji ve Laboratuvar Tıbbı dalında profesör olarak görev yapmaktadır. Prof Smithies, hipertansiyon ve ateroskleroz hastalıklarının anlaşılmasına yardımcı olabilecek fare modelleri geliştirmiştir (Resim 1b).

Mario Capecchi, 1937 yılında İtalya'da doğmuştur ve doktora derecesini 1967 yılında Harvard Üniversitesi'nde Biyofizik dalında almıştır. Halen, Salt Lake City'de Utah Üniversitesi'nde İnsan Genetiği ve Biyolojisi profesörü ve "Howard Hughes Medical Institute" araştırıcısı olarak görev yapmaktadır (Resim 1c).

Kromozomlarımızda bulunan DNA sekansları anneden ve babadan gelen kromozom çiftleri arasında karşılıklı değişirler (Exchange of DNA sequences). Bu değişme bireyler arasın-

***Resim 1c**: Prof. Mario Capecchi.*

daki genetik variyasyonu arttırır ve bu süreç "Homolog rekombinasyon" olarak tanımlanır. Homolog rekombinasyon evolüsyonda çok iyi korunmaktadır ve ilk kez 1958 yılında Nobel Ödülüne layık görülen Joshua Lederberg tara-

fından bakterilerde tanımlanmıştır.

Capecchi ve Smithies, bakteride gösterilmiş olan homolog rekombinasyonun memeli hücrelerindeki genlerin modifikasyonunda kullanılabileceğini göstermişlerdir[1,4,11]. Capecchi, memeli hücrelerindeki kromozomlarda ve hücreye dışarıdan konulan DNA arasında homolog rekombinasyonun gerçekleşebileceğini ve böylece dışarıdan hücreye verilen DNA ile "defektif=hastalıklı" genlerin homolog rekombinasyon yoluyla tamir edilebileceğini göstermişlerdir. Smithies de yaptığı çalışmalarda insan hücrelerinde mutasyona uğramış genlerin tamir olabileceğine işaret etmiş ve endojen genlerin aktiviteleriyle bağımsız olarak hedeflenebileceklerini belirlemiştir. Bu bulgular memeli hücrelerindeki bütün genlerin homolog rekombinasyona yatkın olduklarını göstermiştir[3,13].

Capecchi ve Smithies, ilk çalışmalarında kullandıkları hücrelerde gen-hedeflenmesinin kolay başarılamayacağını görerek, yeni hücre türlerinin arayışına başlamışlardır. Amaçlanan hücrelerde DNA modifikasyonlarının irsiyetle geçişinin esas alınması gerektiğini görerek Cardiff Üniversitesi'nde fare embriyonik kanser hücreleriyle çalışan Sir Martin Evans ile temasa geçmişlerdir. Evans'ın çalıştığı embriyonik kanser hücreleri tümöral olmasına rağmen "embriyonik hücre" özelliklerini koruyarak her türlü hücreye farklılaşabilme özelliğinde olabilen hücreler olması deneylerin uygulanmasını daha kolaylaştırmıştır[3].

Bu hücrelerin arzu edilmeyen tarafı anormal kromozomlara sahip olmaları nedeniyle yeni hücre arayışları içine giren Martin Evans kısa süre içinde normal sayı ve nitelikte kromozomları olan fare embriyonik kök hücrelerini elde etmeyi başarmıştır. Takiben, fare embriyonik kök hücrelerinin "germ-line"ı etkilediğini göstermek amacıyla yapılan deneylerde bir fare türünden elde edilen embriyolara başka bir fare türünden embriyonik kök hücreler injekte edilmiştir. Her iki ayrı tür farenin hücrelerinde oluşan bu "mosaik embriyolar" doğuma kadar gelişimlerini tamamlamak üzere başka bir dişi anne fareye yerleştirilmiştir. Sonunda canlı doğan "mosaik" fare yavrular birleştirilmişler ve embriyonik kök hücrelerden gelen genlerin yeni doğanlara Mendel kanunlarına göre geçişleri gerçekleşmiştir. Martin Evans, bu deneylerden sonra fare embriyonik kök hücrelerini genetik olarak modifiye etmiş ve retrovirüsleri kullanmıştır. Retrovirüslerin kendi genlerini fare embriyonik hücrelerin kromozomlarına integre etmeleri sonucunda fare germ-line'ına yerleşmeleri gerçekleşmiştir[7,8,14].

1986 yılına kadar yapılan araştırmalar sonucunda Capecchi ve Smithies genlerin kültürdeki hücrelere homolog rekombinasyon yoluyla yerleştirilmesinin mümkün olabileceğini göstermişlerdir. Sir Martin Evans da fare germline'ı için gereken fare embriyonik kök hücrelerini ürettiği için bu aşamada homolog rekombinasyonun emriyonik hücrelerde gerçekleşmesi kolay olmuştur ve ilk deneylerde Lesch-Nyhan sendromu'ndan sorumlu "HPRT" geni seçilmiştir.

Fare embriyonik kök hücrelerinin homolog rekombinasyonda kullanımı sonucu "gen-hedeflenmiş – Knock-out (K/o)" farelerin oluşturulması 1989 yılında yayınlanmıştır[2].

Gen-hedefleyerek, belirli geni susturulmuş "gene knock-out mouse K/o) fare modelleri" 1989 yılı sonrasında hızla üretilmeye başlanmıştır. Genetik ve moleküler biyoloji alanında en önemli ve etkin bir teknoloji haline gelmiştir. Fare genomunda çalışılması amaçlanan herhangi bir gende mutasyon yaratmak mümkün olabilmiştir.

Nobel ödülüne layık görülen bu üç araştırıcının geliştirdikleri "knock-out" teknolojisi sayesinde fare genomunda bulunan özgül genlerin susturulması sonucu gelişen durumların takibi ve değişik tür hastalıkların gelişimi izlenebilmektedir. Fare genomunda bulunan 20,000 genin 10,000 kadarında genin susturulması (knock-out) mümkün olabilmiştir. Bu tekniğin uygulanması sonucunda insanda görülen kardiyovasküler, nöro-dejeneratif hastalıklar, diabet, kanser ve diğer birçok hastalıkların çalışılabileceği ve araştırmacıların kullanabilecekleri 500 farklı "knock-out fare" modeli geliştirilmiştir.

"Knock-out fare" teknolojisi Cardiff Üniversitesi'nden Sir Martin Evans tarafından 1980'lerin başında tanımlanan fare embriyonik kök hücrelerinin bir yan ürünü olarak düşünülebilir. Gen hedefleme veya " knock-out" tekno-

lojisinden sonra memelilerin gelişim biyolojisinde, fötal yaşamın idamesinde, organların oluşumunda görev alan sorumlu aşamaların tanınmasında önemli gelişmeler olmuştur. Capecchi'nin çalışmaları sayesinde özellikle doğumsal malformasyonlara neden olan genetik bozukluklar daha iyi anlaşılmaya başlanmıştır. Smithies de kistik fibrozis veya talassemi gibi bazı kalıtsal hastalıkların yanında aterosklerozis ve hipertansiyonda yeni "knock-out" fare modelleri geliştirmiştir. Gen-hedefleme veya "knock-out fare" modelleriyle yaşamın ilk evrelerinden, embriyo, fetüs ve yaşlanmaya kadar tüm normal gelişim biyolojisinin çalışılması mümkün görünmektedir.

Martin Evans, aynı teknolojiyle kistik fibrozis ve diğer kalıtsal hastalıklar için "knock-out" fare modelleri oluşturmuş ve gen-tedavisinin etkilerini ölçebilecek sistemler geliştirmiştir. Farelerde gen-hedefleme (knock-out fare modeli) günümüzde biyolojik ve tıp bilimlerine en çok katkıda bulunabilecek buluşlardan biri durumuna gelmiştir.

"Knock-out fare" modelleri yardımıyla genomdaki her bir genin görevi çok daha güvenilir ve kolay anlaşılabilir hale gelmiştir. Fare ve insan genomlarının 2000-2001 yıllarından sonra çözümü sonucu önümüze çıkan binlerce yeni genin fonksiyonları bu teknoloji sayesinde anlaşılabilmektedir. Fareden elde edilen bilgilerle insan genlerinin de önemli bir bölümü çözümlenmektedir, çünkü fare genlerinin sekansları % 95 oranında insan genlerine eşdeğer özellik taşımaktadır. Araştırmacılar, insanda sık rastlanan aterosklerozis, kistik fibrozis, diabetes mellitus ve kanser gibi hastalıklar da dahil olmak üzere "knock-out fare" modeli geliştirmişlerdir.

KAYNAKLAR

1. Capecchi MR: High efficiency transformation by direct microinjection of DNA into cultured mammalian cells, Cell 1980;22(2):479-88.
2. Capecchi MR: The new mouse genetics: Altering the genome by gene targeting, Trends Genet 1989;5(3):70-6.
3. Capecchi MR: Generating mice with targeted mutations, Nat Med 2001;7(10):1086-90.
4. Doetschman T, Gregg RG, Maeda N et al: Targeted correction of a mutant HPRT gene in mouse embryonic stem cells, Nature 1987;330(6148):576-8.
5. Evans MJ: The isolation and properties of a clonal tissue culture strain of pluripotent mouse teratoma cells, J Embryol Exp Morphol 1972;28(1):163-76.
6. Evans MJ, Kaufman MH: Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos, Nature 1981;292(5819):154-6.
7. Ishibashi S, Brown MS, Goldstein JL, Gerard RD, Hammer RE, Herz J: Hypercholesterolemia in low density lipoprotein receptor knock-out mice and its reversal by adeno-virus mediated gene delivery, J Clin Invest 1993;92(2):883-93.
8. Martin GR: Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells, Proc Natl Acad Sci (USA) 1981;78(12):7634-8.
9. Martin GR, Evans MJ: The morphology and growth of a pluripotent teratocarcinoma cell line and its derivatives in tissue culture, Cell 1974;2(3):163-72.
10. Papaioannou VE, McBurney M, Gardner RL, Evans MJ: Fate of teratocarcinoma cells injected into early mouse embryos, Nature 1975;258(5530):70-3.
11. Smithies O, Gregg RG, Boggs SS, Koralewski MA, Kucherlapati RS: Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination, Nature 1985;317(6034):230-4.
12. Smithies O, Maeda N: Gene targeting approaches to complex genetic diseases: Atherosclerosis and essential hypertension, Proc Natl Acad Sci (USA) 1995;92(12):5266-72.
13. Thomas KR, Capecchi MR: Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells, Cell 1987;51(3):503-12.
14. Thomas KR, Capecchi MR: Targeted disruption of the murine int-1 proto-oncogene resulting in severe abnormalities in midbrain and cerebellar development, Nature 1990;346(6287):847-50.
15. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts, Science 1998;282(5391):1145-7.
16. www.nobelprize.org