

Genlerin İşlevini Öğrenme Sanatı

Gen Nakavtı

İnsan gen haritasının çıkarılması şüphesiz 21. yüzyılın en önemli bilimsel gelişmelerinden biri. Her büyük keşif ve gelişme gibi insan DNA'sının diziliminin belirlenmesi de önemli soruları beraberinde getirdi. Özelliklerimizin yaklaşık 25 bin gen tarafından belirlendiğini keşfettik, ama bu yaşam kitabının ne anlama geldiğini ancak genlerin neler yaptığını açığa çıkardığımızda öğrenebileceğiz. Son yirmi yıldır dünya çapında çok sayıda bilim insanı bu sorunun cevabını öğrenmeye çalışıyor. Utah Üniversitesi profesörlerinden Mario Capecchi'nin "gen nakavtı" olarak bilinen tekniği geliştirmesi, bu amaca ulaşmada en önemli kilometre taşlarından biri oldu. Bu teknik sayesinde ilk defa memeli hayvanların genleriyle tek tek oynayarak sonuçta ortaya çıkan bozukluklara bakıp bu genlerin işlevlerini öğrenmeye başladık. Capecchi, moleküler hayat bilimlerinde çığır açan bu keşfi dolayısıyla 2007 yılında Fizyoloji ve Tıp dalında Nobel Ödülü'nü alan üç bilim insanından biri oldu.

Mario Capecchi'nin yaşam hikâyesi Roberto Benigni'nin Oscar ödüllü "Yaşam Güzeldir" filminin devamı olabilecek bir senaryo gibi. Onun yaşamı gelecekte bilimi kendine meslek seçecekler için büyük bir esin kaynağı.

Capecchi 1937 yılında Kuzey İtalya şehirlerinden Verona'da, havacı bir İtalyan babanın ve Amerikalı şair bir annenin çocuğu olarak dünyaya geldi. II. Dünya Savaşı öncesinde Naziler Yahudilerin, çingenelerin, eşcinsellerin, Nazizm ve faşizm karşıtı bir grup sanatçının toplumdan ayıklanmasını hedef almıştı. Düşüncelerini şiirleri ile hiç çekinmeden ortaya koyan annesi başına gelecekleri tahmin etmiş gibi varını yoğunu satıp 3,5 yaşındaki Mario'yu çiftçi bir ailenin yanına gönderdi. Annesi yanılmamıştı, gestapo tarafından tutuklanarak Dachau'daki toplama kampına gönderildi. İlk aylar çiftlikte herşey yolunda gitti ve küçük Mario savaşın etkilerinden uzak bir yaşam sürdü. Savaşın ilk etkisini, Amerikan uçakları tarlada çalışan çiftçileri taradığında hissetti. O uçaklardan atılan kurşunlardan biri de küçük Mario'nun

bacağına isabet etmişti. Bir yıl sonra annesinin verdiği para bitince, küçük Mario kendini sokakta buldu. Capecchi 1942'den 1946'ya kadar yetim yurtlarında yaşadı, bir ara Mussolini'nin gençlik ordusu Balilla'ya da katıldı. Orada da açlık ve yokluk peşini bırakmadığı için zamanının çoğunu kaçmayı planlayarak geçirdi. Aslında kaçmayı başarıp bombaların harap ettiği yıkık dökük binalarda kaldığı ve pazarlardan çaldıkları ile karnını doyurduğu günler yurtlarda ve orduya geçirdiği günlerden çok daha rahattı. Birkaç defa babasının yanına gitti, ama psikolojik bir rahatsızlığı olan babası kısa bir süre sonra onu yine sokağa attı. Hırsızlıkla ve yumrukları sayesinde kazandığı sokak kavgalarıyla hayatta kalmayı başardı. Fakat açlık-tan beslenme yetersizliği yaşamaya başlayınca Kuzey İtalya'daki Reggio Emilia'da bir hastaneye yatırıldı.

Dokuzuncu doğum gününde tanımadığı fakat kendini annesi olarak tanıtan bir kadın çıkageldi. Kadını tanımamıştı, ama günde sadece bir kâse kahve ve bir dilim ekmekten oluşan tek öğün ile beslendiği hastaneden onun sayesinde kurtulabileceğini göre-

Anahtar Kavramlar

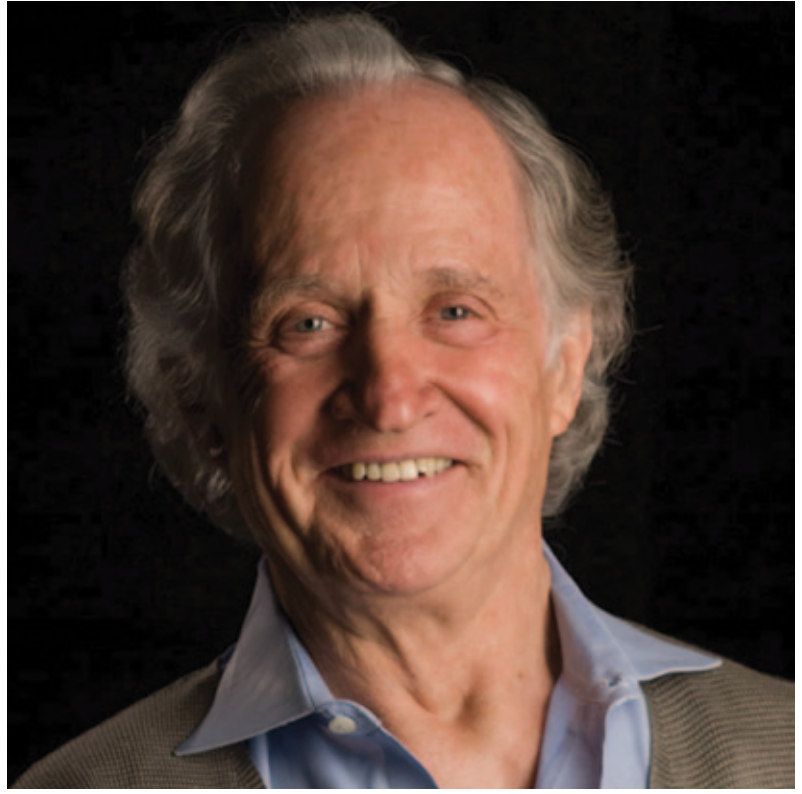
Utah Üniversitesi profesörlerinden Mario Capecchi "gen nakavtı" olarak bilinen bir teknik geliştirdi. Bu teknikte önce üzerinde çalışılan genlerin yapıları embriyonik kök hücrelerinde bozulur, yani mutasyona uğratılır. Daha sonra mutasyon taşıyan bu kök hücrelerinden tam bir fare elde edilir. Sonuçta ortaya çıkan bozukluklara bakılarak üzerinde çalışılan genin işlevi öğrenilir.

Gen nakavtı çalışmaları sonucunda genlerin işlevlerini öğreniyor ve bu bilgiyi insan sağlığı için kullanmanın yollarını araştırıyoruz. Nakavt fareler sayesinde, daha önce nedenini bilmediğimiz çok sayıda hastalığın ardındaki genetik bozuklukları da birer birer öğreniyoruz.

Nakavt fareler insan sağlığı açısından önemli olan pek çok hastalık için de model oluşturuyor. Araştırma aşamasında olan ilaçlar önce nakavt fareler üzerinde denenerek tedavi etkisi olup olmadığı ve yan etkilerinin bulunup bulunmadığı belirleniyor.

rek onu kabul etti. O tarihten üç hafta sonra, annesiyle birlikte göçmenleri taşıyan bir gemi ile Akdeniz'in mavi sularından okyanusa doğru yola çıkacaktı. Hedefleri Amerika'ydı. Savaştan harap olmuş, açlığın ve yoksulluğun kol gezdiği Avrupadan Amerika'ya geldiğinde dünyası gerçekten değişti. Capecchi, annesi, fizikçi olan dayısı ve yengesiyle birlikte Amerika'nın doğu kıyısındaki tarihi Philadelphia şehrine yerleşti. Çocukları olmayan dayısı ve yengesi onu kendi çocukları gibi himayeleri altına aldı. Eğitime çok önem veren bir bilim insanı olan dayısı Capecchi'nin sonraki yaşam çizgisinin belirlenmesinde çok önemli rol oynadı. Dokuz yaşına kadar hiç eğitim almamış, okuma yazma bilmeyen Capecchi üçüncü sınıfa gönderilince ilk günlerde kafası yerine yumruklarını kullanmaya başladı. Kaba gücü sayesinde okulda kendine bir yer de edinmişti, ama kısa zamanda kaba gücün kendini ileri götürmeyeceğinin farkına vardı. Enerjisini spora ve derslerine yönlendirmeye başladı. Güreş takımına girdi. Bir süre sonra derslerde sınıf arkadaşlarıyla arasını yavaş yavaş kapatmaya başladı. Üniversiteye başladığında önce temel bilimlere ilgi duydu. Lisans öğrencisiyken bir laboratuvarında yarı zamanlı çalışmaya başladı. O zamanlar daha yeni gelişen bir bilim dalı olan moleküler biyolojiye (genetik mühendisliği olarak da adlandırılan bilim dalı) ilgi duymaya başladı. Bu ilgisi onu DNA'nın yapısını çözen bilim insanlarından birinin, Jim Watson'un yanında doktora yapmaya kadar götürdü. Harvard Üniversitesi'nde doktorasını aldıktan sonra dört yıl kadar aynı yerde öğretim üyesi olarak çalıştı, ama oradaki politik atmosferden rahatsız olduğu için dünya çapında meşhur Harvard'ı bırakıp son derece sakin bir yer olan Utah'a taşındı.

Yaşam hikâyesinin "başkalarından farklı olması" Capecchi'nin bilimsel çalışmalarına da yansdı. 1980 yılında farelerde, üzerinde çalışılan geni bozup (yani mutasyona uğratarak) bu gen bozulduğunda ne olduğunu, yani o genin işlevini öğrenmek üzere bir proje hazırladı ve destek almak için Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) gönderdi; hakemler yapmak istediği şeyin imkânsız olduğunu söyleyip projeye destek vermeyi reddetti. Fakat o bildiğinden şaşmadı. Başka bir proje için aldığı maddi desteği kullanarak gen nakavt deneylerine devam etti. Düşüncesinin doğru olduğunu gösteren veriler elde edince çalışmasını devam ettirebilmek için yeniden NIH'den destek istedi. Bu kez hakemler kabul mektuplarına "bizi dinlemediğiniz için memnun olduk" diye yazmışlardı. O tarihten sonraki yaklaşık yirmi yıllık çalışmaları Capecchi'ye 2007 yılında Nobel Ödülü kazandırdı. Capecchi'nin hikâyesi, yaşamın ilk yıllarındaki başarının veya başarısızlığın sonraki yıllar için bir gös-



Mario Capecchi

terge olamayacağımı, her şeyin tam tersine dönebileceğini gösteriyor. Bunu en güzel yine kendisi ifade ediyor. 1996 yılında Japonya'nın prestijli Kyoto Ödülü'nü alırken Capecchi sözlerini şöyle tamamlıyor: "Ne kadar iyi olduğunuzu düşünürseniz düşünün, kimlerin hayatta başarılı olacağını bilemezsiniz. Hiç beklenmedik başlangıçlar olağanüstü yaşam hikâyelerine dönüşebilir. Bu nedenle toplum dehalarını en beklenmedik yerlerde de aramalı ve onlara çiçek açacakları ortamları sunmalıdır." Nobel Ödülü'nü aldığı sabahın erken saatlerinde, gelenek haline gelen telefon konuşmasında, yaşamının savaş yıllarının İtalyasında geçen diliminin, kendisini elindeki çok sınırlı kaynaklarla yaratıcı olmaya ittiğini ve bunun daha sonraki yaşamındaki başarısında önemli rolü olduğunu söyledi.

İnsan gen haritası tamamlandığında, her bir hücremizin çekirdeğinde yerleşmiş ve özelliklerimizi belirleyen, bizleri diğer canlılardan farklı kılan veya bazı özellikler açısından bizleri onlara benzeten yaklaşık yirmi beş bin genimiz olduğunu öğrendik. Genler hakkında pek bir şey bilmediğimiz dönemlerde bile insan yaşamının yumurtanın ve spermin kaynaşmasıyla başladığını biliyorduk. Ancak bu tek hücrenin yaşamın sonraki dönemlerinde sayıları ikiyüzlü aşkın, değişik tipte hücreye nasıl dönüştüğünü, ayrıca yaşamın herhangi bir döneminde değişik organ ve dokuların, o organ ve dokulara özgü işlevleri nasıl yerine getirdiğini bilmiyorduk. Öte yandan, bazı hasta-

lıkların sadece bazı ailelerin çocuklarında veya anne-baba, dede-nine ve hatta büyükanne-büyükbaba kuşaklarında görüldüğü için kalıtsal temelleri olduğundan emindik. Fakat bu tür hastalıkların ardında hangi genlerin olduğunu bilmiyorduk.

Genlerin işlevlerinin ne olduğunu ilk defa bizden çok daha basit yapıları organizmalar sayesinde öğrenmeye başladık. Bunlardan biri bilimsel adı *Saccharomyces cerevisiae* olan bildiğimiz ekmeğin mayasıdır. Tek hücreli bir organizma olan ekmeğin mayası insan hücreleri ile aynı yapıdadır. Hücre bölünmesi sırasında hem ekmeğin mayası hücrelerinde hem de insan vücudunun hücrelerinde aynı işlemler gerçekleşir. Ekmeğin mayası hücreleri de önce DNA'larının kopyasını yapar, yeni moleküller sentezler ve belli bir süre sonra ikiye bölünerek yaşamını iki yavru hücre olarak devam ettirir. Bu benzerlikten dolayı bilim insanları ekmeğin mayasından elde edecekleri bilgilerin daha karmaşık organizmalar için, örneğin insan için de geçerli olacağını biliyordu. Ekmeğin mayasında hücre bölünmesinden sorumlu genlerin hangileri olduğunu bulurlarsa, o genlerin eşleniklerinin, örneğin bir farede veya bir insanda da hücre bölünmesinden sorumlu olduğunu bulmuş olacaktı. İlk olarak hücre bölünmesi üzerinde yoğunlaştılar. Bir yolunu bulup ekmeğin mayasının genlerini bozabilirlerse, önce maya hücrelerinin bölünmesinde ortaya çıkacak anormallikleri belirleyip daha sonra da bu anormalliklere neden olan genleri tespit edebileceklerdi. Çok sayıda ekmeğin mayası hücresini DNA'nın yapısını bozan kimyasal maddelere tabi tuttular. Mikroskopla izleyerek hücre bölünmesinde değişiklik olup olmadığına baktılar. Bekledikleri gibi bazı hücreler hücre bölünmesinde gerçekten de anormallikler sergiledi. Uzun ve zahmetli çalışmalar sonucunda anormallik gösteren bu hücrelerde hangi genlerin mutasyona uğramış olduğunu buldular. Tespitlerini doğrulamak için söz konusu genlerin sağlıklı kopyalarını, anormallik sergileyen hücrelere aktardılar. Anormallik ortadan kalktı ve hücreler yeniden normal yaşam seyrlerine devam etti. Ekmeğin mayası ile yapılan çalışmalar sayesinde, hücre bölünmesinde rol oynayan onlarca gen birer birer tespit edildi.

Ekmeğin mayası ile yapılan çalışmalar hücre bölünmesinden sorumlu genlerin belirlenmesinde başarılı olmuştu, ama çok hücreli canlıların daha karmaşık işlevlerini açıklamakta yetersizdi. Araştırmacılar ekmeğin mayasında uyguladıkları yöntemi bu sefer çok hücreli organizmalara uygulamaya başladılar. Bu çalışmalar için bildiğimiz meyve sineğini ve mikroskop altında görülebilen 1 mm boyunda bir çeşit yuvarlak solucan olan *Caenorhabditis elegans*'ı kullandılar. Küçük olmaları, kolaylıkla üretilibilmeleri ve jeneras-



Mutasyon taşıyan, iki yerine dört kanadı olan meyve sineği

Visual Photos

yon sürelerinin kısa olması nedeniyle bu iki organizma genetik araştırmalarında en çok kullanılan organizmalar haline geldi. DNA'nın yapısını bozan kimyasal maddelere tabi tutulan meyve sinekleri ve *C. elegans*'ların yavrularında fiziksel anormallikler ortaya çıktı. Yüzlerce mutant (mutasyon taşıyan) meyve sineği ve *C. elegans* elde edildi. Bunlar arasında çok ilginç olanlar da vardı; örneğin başından anten yerine bacak çıkan, iki yerine dört kanadı olan meyve sinekleri de ortaya çıkmıştı. Bu anormalliklerin arkasındaki genetik değişimlerin belirlenmesi uzun bir süre aldı. Böylece genlerin işlevleri de birer birer gün ışığına çıkmaya başladı. Meyve sinekleri yapı olarak bizden çok farklı olmalarına rağmen genetik düzeyde bize önemli oranda benzerlik gösterir. Öyle ki insanlarda genetik hastalıklardan sorumlu genlerin yaklaşık %75'inin meyve sineğinde eşleniği vardır. Dolayısıyla meyve sineğinde işlevi belirlenen bir genin insandaki eşleniği de çok büyük ihtimalle aynı işlevi yerine getiriyor demektir.

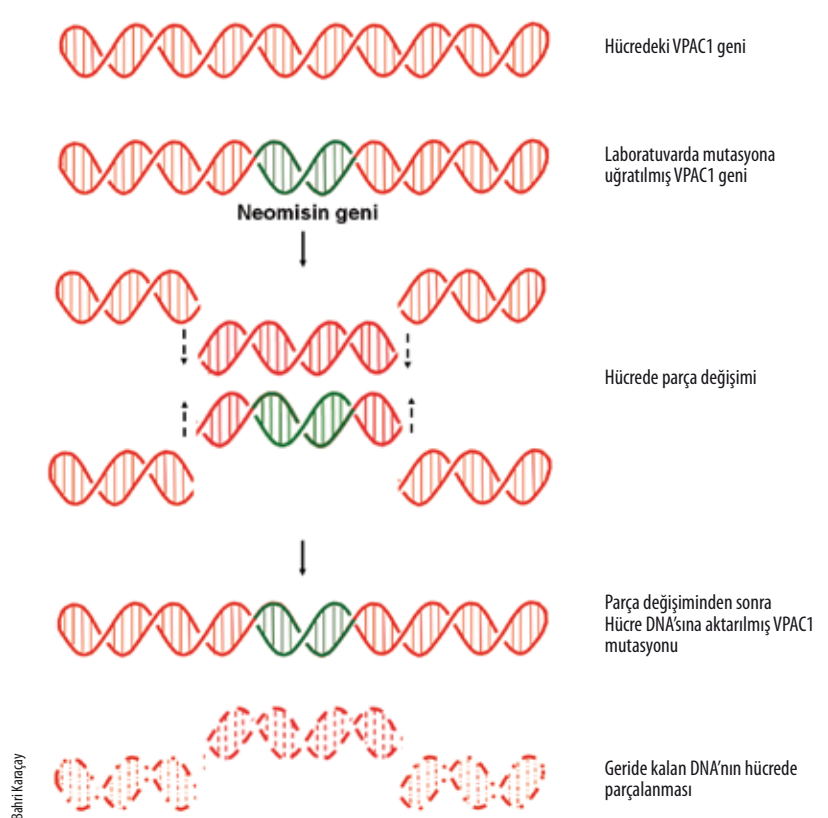
Ekmeğin mayası, meyve sineği ve *Caenorhabditis elegans* bizimle benzerlik gösterse de aramızdaki farklılıklar benzerliklerden çok daha fazla olduğu için, bu organizmalar insan genlerinin işlevinin öğrenilmesinde yetersiz kaldı. Bize çok daha yakın olan memeli hayvanlardan türümüz hakkında daha sağlıklı bilgiler elde edilebilirdi. Fakat uzun bir süre memeli hayvanların genlerinin yapısı ile nasıl oynanacağı bilinmiyordu. Bunda önemli olan bir etken, memeli hayvanların çok daha karmaşık bir genetik yapısının ve daha fazla geninin olmasıydı. Diğer bir önemli faktör ise memeli hayvanların her genin iki kopyasını taşımasıdır. Genin bir kopyası mutasyona uğrasa bile sağlıklı olan diğer kopya işlevin yerine gelmesini garantileyeceği için mutasyonun etkisi örtülmüş olur. Bütün bu

Yaşam hikâyesinin "başkalarından farklı olması" Capecchi'nin bilimsel çalışmalarına da yansdı. 1980 yılında farelerde, üzerinde çalışılan geni bozup (yani mutasyona uğratarak) bu gen bozulduğunda ne olduğunu görmek, yani o genin işlevini öğrenmek üzere bir proje hazırladı ve destek almak için Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsüne (NIH) gönderdi; hakemler yapmak istediği şeyin imkânsız olduğunu söyleyip projeye destek vermeyi reddetti. Fakat o bildiğinden şaşmadı. Başka bir proje için aldığı maddi desteği kullanarak gen nakavt deneylerine devam etti.

zorluklara rağmen genlerin memeli hayvanlardaki işlevlerini öğrenmek gerekiyordu. Çünkü ancak memeli hayvanlarla yapılacak bu tür çalışmalar sayesinde, örneğin son derece karmaşık bir yapıya sahip olan bağışıklık sistemimiz hakkında bilgi edinebilecektik. Ancak bu tür çalışmalar sayesinde gelişim hakkında, beynin çalışması veya hastalıkların mekanizmaları hakkında yeni şeyler öğrenebilecektik. Bu nedenlerle bilim insanları laboratuvar hayvanlarına, özellikle de fareye yöneldi.

Capecchi 1970'lerde Utah Üniversitesinde laboratuvarını kurarken genlerde değişiklik meydana getirme fikri imkânsız olarak algılanıyordu. Bırakın belli genleri hedef alıp onlarda değişiklik yapmayı, o günlerde genlerin hücelere aktarılması bile imkânsız gibi görünüyordu. Fakat 1977 yılında Capecchi New York'taki Columbia Üniversitesinden Michael Wigler ve Richard Axel'in yayımladığı bir makale okudu. Bu bilim insanları DNA'yı kalsiyum fosfat adlı kimyasal madde ile karıştırıp besi tabaklarında büyütülen hücrelerin üstüne koyduklarında, DNA'nın hücelere aktarıldığını gördüler. DNA'ların çoğu hücre tarafından parçalanıyordu, ama milyonda bir hücrede aktarılan DNA çekirdeğe kadar gidiyor ve orada çalışarak kodladığı proteini üretiyordu. Capecchi, gen aktarımında başarıyı artırmak için özel bir enjektör kullandı ve aktarmak istediği DNA'yı doğrudan hücrenin çekirdeğine enjekte etti. Bu yöntemle gen aktarılan hücrelerin sayısı bir milyon kat arttı. Aktardığı genlerin çok az bir kısmı, sadece hücrenin çekirdeğine girmekle kalmamış, hücrenin DNA'sı ile yer değiştirmişti. Bir diğer deyişle aktarılan DNA ile hücrenin DNA'sı arasında parça değişimi gerçekleşmişti. Capecchi sağlıklı genler yanında mutant genleri de hücreye aktarmak ve onları incelemek istiyordu.

O günlerde Martin Evans da embriyonik kök hücrelerini laboratuvarında büyütme, onlardan doku elde etmeye, hatta yine kök hücrelerinden başlayarak tam bir fare elde etmeye çalışıyordu. Capecchi, Gordon Konferansları'ndan birinde Evans'ın araştırmalarını kendi ağzından dinledi ve o anda genleri bu embriyonik kök hücrelerine aktarmaya karar verdi. Çünkü eğer embriyonik kök hücrelerinde genlerin yapısını değiştirebilirse, bu hücrelerden tam bir fare elde ettiğinde farenin bütün hücreleri değişikliğe uğramış DNA'yı taşıyacaktı. Diğer bir deyişle, Capecchi farede o geni "nakavt" etmiş olacaktı. Embriyonik kök hücreleri, bu cümlelerin sonundaki nokta büyüklüğünde olan üç buçuk günlük bir fare embriyonunun iç kısmında oluşan bir grup hücredir. Embriyonun gelişmesi sırasında bu kök hücreleri embriyonu oluşturan bütün hücelere ve dokulara dönüşür.

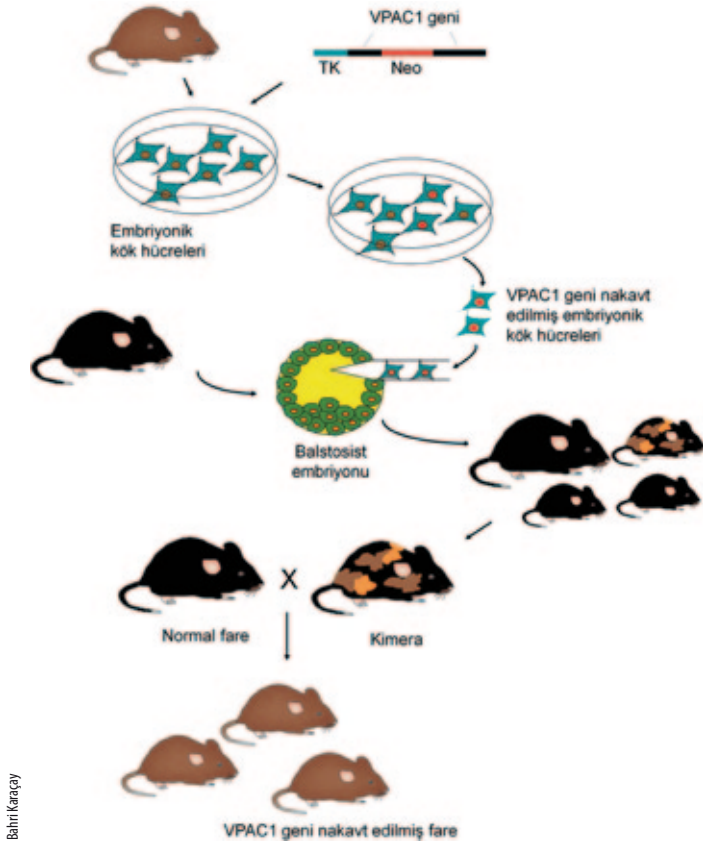


Capecchi embriyonik kök hücrelerini nasıl büyüteceğini öğrenmek üzere eşi ile birlikte Evans'ın laboratuvarında birkaç hafta geçirdi. Kendi laboratuvarına geri döndüğünde genleri embriyonik kök hücrelerine aktarmaya başladı. Capecchi 1987 yılında farede genlerin nakavt edilmesi tekniğini açıklayan makalesini yayımlayarak bilim tarihinde bir ilkin altına imzasını attı.

Doktora sonrası çalışmam sırasında projelerimden biri, üzerinde çalıştığım VPAC1 adlı geni nakavt ederek işlevini öğrenmekti. Capecchi'nin geliştirdiği yöntemi kullanarak VPAC1 genini nakavt etmeye karar verdik. VPAC1 geni hücrenin dış yüzünde bulunan, reseptör adı verilen moleküllerden biridir. Ligand adı verilen özel proteinlerin reseptörlere bağlanması hücre içinde bir seri tepkime başlatır. Daha önce yaptığımız çalışmalarda VPAC1 geninin sinir sisteminin gelişiminde önemli olabileceğine dair veriler elde etmiştik. Fakat VPAC1 geninin işlevinin ne olduğunu bilmiyorduk. Gerçek işlevini öğrenmenin tek yolu, farede VPAC1 genini nakavt ederek bu genin eksikliğinin ne tür anormalliklere neden olduğunu belirlemektir.

Herhangi bir genin farede yapısının bozulması işlemi, yani genin nakavt edilmesi, embriyonik kök hücreleri ile başlar. Embriyonik kök hücrenin en önemli özelliği, henüz herhangi bir hücre tipi-

Rekombinasyon sonucu laboratuvarında VPAC1 geninde yaratılan mutasyon, hücrenin kendi VPAC1 genine aktarıldı.



ne başkalaşmamış olmasıdır. Bununla beraber farenin vücudunu oluşturan her hücre tipine dönüşme özelliğine sahiptir. Kendi ortamlarından, yani embriyondan ayrıldıkları için laboratuvar besi yerlerinde başkalaşımalarının önlenmesi gerekir. Bunun için besi yerine özel kimyasal maddeler eklenir. Fare kök hücreleri ile çalıştığım, başkalaşımını engellemek için “Lösemi Engelleyici Faktör” olarak da bilinen ve kısaca LIF diye adlandırılan bir proteini besi yerlerine ekliyordum. Embriyonik kök hücreleri embriyondan ayrıldıktan sonra doku kültürü tabaklarında, önceden bu tabakların tabanına döşenmiş besleyici hücreler üzerinde büyütülür. Besleyici hücreler ise yaklaşık iki haftalık fare embriyonlarından elde edilir. Fibroblast adı verilen bu hücreleri fare embriyonlarından elde edip besi tabağının tabanını tamamen kaplayacak şekilde büyüttüm. Daha sonra embriyonik kök hücrelerini, bu besleyici hücre tabakası üzerinde büyütme başladım. Besleyici hücre tabakası, embriyonik kök hücrelerinin çoğalmak için ihtiyaç duyduğu proteinleri ve ne olduklarını tam olarak bilmediğimiz bazı faktörler salgılar. Besi ortamına konan fibroblastlar normal şartlarda bölünmeye ve sayılarını artırmaya devam edecekleri için kontrol edilmezlerse embriyonik kök hücreleri ile rekabete girerler. Bu nedenle fibroblast hücrelerinin çoğalması, Mitomisin C adı verilen bir kim-

Genlerin nakavt edilme işlemi: VPAC1 genini nakavt etmek için önce laboratuvar şartlarında daha önce fare DNA'sından izole ettiğim VPAC1 geninin bir parçasını çıkarıp yerine Neomisin antibiyotikini etkisiz hale getiren Neomisin genini ekledim. Bu DNA'yı kahverengi bir fare embriyonundan elde edilmiş kök hücrelerine aktardım. Besi yerine Neomisin antibiyotikini (G418) eklediğimde, sadece aktardığım DNA'yı kendi DNA'sına aktarmış olan hücreler yaşadı. Yaklaşık her bin hücreden biri aktardığım DNA'yı yapısına aktarmıştı. Bir takım ek analizlerle, aktardığım DNA'nın embriyonik kök hücrelerinin VPAC1 geni ile yer değiştirmiş olduğunu belirledikten sonra, VPAC1 geni nakavt edilmiş embriyonik kök hücrelerini 3,5 günlük blastosist devresindeki embriyonlara aktardım. Bu embriyonları da taşıyıcı farelerin rahmine aktardım. Doğan yavruların bir kısmı kimeraydı. Bu farelerin vücutlarının bir kısmı aktardığım VPAC1 geni nakavt edilmiş kök hücrelerinden meydana gelmişti. Normal siyah farelerle çiftleştirdiğimde, kimeralardan sadece ikisinin hep kahverengi yavruları oldu. Bu yavrulardan bir kısmının bütün vücudu, aktardığım VPAC1 geni nakavt olmuş kök hücrelerinden oluşmuştu. Bir diğer değişle bu farelerin VPAC1 genleri nakavt olmuştu.

yasal madde ile durdurulur. Mitomisin C, besleyici hücrelerin diğer fonksiyonlarını etkilemeden sadece bölünmelerini durdurur. Böylece besleyici hücreler üzerlerine konan embriyonik kök hücrelerinin ihtiyaç duyduğu faktörleri üretmeye devam eder, fakat embriyonik kök hücreleri ile rekabet etmezler.

Nakavt projemin ikinci aşamasında VPAC1 geninin yapısını bozacak DNA parçasını elektrik şoku vererek bu hücrelere aktardım. Aktardığım DNA aslında yapısını bozacağım VPAC1 DNA'sı ile tıpa tıpa aynıydı. Fakat normalde farenin vücudunda olmayan ve bakteriden elde edilmiş bir antibiyotik direnç genini de o DNA parçasına eklemiştim. Antibiyotiğe direnç sağlayan Neomisin adlı bu gen, daha sonra aktardığım DNA parçasının hücrenin VPAC1 geni ile yer değiştirip değiştirmediğinin göstergesi olacaktı. Hazırladığım bu DNA'yı, embriyonik kök hücrelerine aktarmak için özel olarak geliştirilmiş bir aletle hücrelere kısa süreli bir elektrik şoku verdim. Hücrelerin zarlarında besin alışverişini sağlayan kapıcıklar vardır. Elektrik şoku nedeniyle embriyonik kök hücrelerinin bu noktalarında saliselik süreler için açıklıklar olur ve hücrelerle karıştırılmış olan DNA molekülleri bu açıklıklardan hücrenin içine girer. DNA aktarılmış embriyonik kök hücrelerini büyüttüğüm besi tabaklarına, G418 adındaki antibiyotik ekliyordum. Normal fare hücrelerinde Neomisin genini kullanamaz ve ölürlür. Sadece aktardığım gen almış olan hücreler ise Neomisin genini çalıştırarak G418 antibiyotikini etkisiz hale getirerek yaşamlarına devam eder. Çok az sayıdaki hücrede, aktardığımız gen ile hücrenin kendi VPAC1 geni arasında parça değişimi olur. Bunun oranı yüzde bir veya daha azdır. Bu hücrelerdeki parça değişimi sonucunda hücrenin VPAC1 geninin ortasına Neomisin genini aktarılmış olur. Hem Neomisin geninin VPAC1 geninin ortasına yerleşmesi hem de Neomisin genini koymak için VPAC1 geninden bir parçanın çıkarılmış olması, VPAC1 genini işlemez hale getirir. Diğer bir değişle VPAC1 geni nakavt edilmiştir.

VPAC1 geni parçalanmış olan bu embriyonik kök hücrelerini, siyah farelerden elde edilmiş, “blastosist” devresinde olan ve küçük bir topu andıran embriyonlara aktardım. Embriyonik kök hücreleri kahverengi farenin embriyonundan elde edilmişti. Dolayısıyla siyah farenin embriyonuna kahverengi fareden gelen ve VPAC1 geni parçalanmış embriyonik kök hücrelerini aktarmış oldum. Bu embriyonları taşıyıcı farenin rahmine aktardım. Fare yavruları bir haftalık olduklarında kıl renkleri iyice belirginleşir. Yavruların çoğu siyahtı. Embriyonik kök

hücrelerini aktardığımız embriyonlar siyah fareden geldiği için, bu siyah yavrular aktardığımız hücreleri yapılarına mal etmemiş olan yavrulardı. Yavrulardan iki tanesinin ise kıl renkleri karışıktı. Vücutlarının bir kısmı siyah, bir kısmı kahverengi, diğer kısımları kahverengi ile siyahın değişik oranlarda karışımıydı. Bunun anlamı şuydu: Embriyonik kök hücreleri sadece bu iki yavru fareyi oluşturan embriyonun yapısına kaynaşmıştı. Embriyonik kök hücrelerinin mucizevi özelliklerinin, vücudu oluşturan her bir hücre tipine dönüşebilme yeteneği olduğunu söylemiştik. Bu yavruların embriyonlarına aktardığımız embriyonik kök hücrelerinin bir kısmı deri hücreleri haline gelmişti, bu nedenle derilerinde kahverengi kısımlar vardı. Aktardığımız hücrelerin VPAC1 geni nakavt edilmiş olduğu için, derideki kahverengi hücrelerin VPAC1 genleri çalışmıyor demektir. İki tür hücrenin karışımı ile meydana gelmiş olan böyle hayvanlara “kimera” (İngilizcesi “chimera”) adı verilir. Kimeraların derilerinin tamamının değil, sadece belli bölümlerinin kahverengi olması, aktardığımız embriyonik kök hücrelerinin sadece vücutlarının bir kısmını oluşturduğunu gösteriyordu. Derinin yanı sıra başka dokuların yapılarına da girmiş olduğunu biliyorduk. Asıl arzu ettiğimiz şey ise, diğer dokuların yanı sıra, özellikle sperm veya yumurta hücrelerini yapacak dokuların (testislerin ve yumurtalıkların), aktardığımız VPAC1 geni bozulmuş hücrelerden gelmesiydi. Çünkü VPAC1 geninde oluşturduğumuz değişimin (mutasyon) gelecek nesillere aktarılması, aktardığımız embriyonik kök hücrelerinin testisleri ve yumurtalıkları oluşturması ile mümkündür.

Bunu anlamanın bir yolu vardı: Kimeraları siyah farelerle eşleştirmek ve doğacak yavruların kıl renklerine bakmak. Eğer aktardığımız embriyonik kök hücreleri eşey dokularını oluşturmuşsa, onların oluşturacağı eşey hücreleri de kahverengi olacak ve doğacak yavrular tamamen kahverengi olacaktır. Eğer doğan yavrular siyah olursa VPAC1 genindeki mutasyon gelecek kuşağa aktarılmamış olacaktır.

İlk embriyon transferinde elde ettiğimiz kimeralar beklediğimiz sonucu vermedi, ama daha sonraki kimeralar beklediğimiz sonucu verdi. Tamamen siyah yavrular yanında tamamen kahverengi yavrular da elde ettik. Sadece kahverengi olanları büyütüp kendi aralarında çiftleştirdiğimizde ortaya çıkan yavruların hepsi kahverengiydi ve artık siyah yavru görmüyorduk. Bu farelerin bütün hücrelerindeki VPAC1 geni nakavt olmuştu. Beş yıllık bir çalışmanın ardından VPAC1 geni nakavt edilmiş fareler elde etmeyi başarmıştık. VPAC1 mutasyonu-

nu taşıyan farelerin bağırsaklarında anormallikler vardı. Sütten kesilmelerinden hemen sonra, katı besinlerle beslenmeye başladıklarında anormallik ortaya çıktı ve bu hayvanlar kısa bir süre sonra öldü. Bu sonuçlar VPAC1 geninin hayati bir önem taşıdığını gösteriyordu. Bu satırları kaleme aldığım, anormalliğin bağırsakların yapısındaki bir anormallikten mi yoksa bağırsakların çalışmasını kontrol eden sinirlerin çalışmasından mı kaynaklandığını çözmek için çalışmalar devam ediyor. Bağırsaklarda ortaya çıkan anormalliklerin yanı sıra, bu farelerin pankreaslarında da anormallikler vardı. Vücutta şekerin kullanılmasında en önemli hormonları salgılayan bu dokuda anormallik olması beklemediğimiz bir sonuçtu. VPAC1 pankreasın oluşumunda da önemli bir rol oynuyor olmalıydı. Çünkü pankreası oluşturan bazı hücreler gelişmemişti.

Capecchi'nin geliştirdiği yöntemle, yüzlerce gen VPAC1 geni örneğinde açıkladığım şekilde nakavt edildi ve edilmeye devam ediyor. Bu çalışmalar sonucunda genlerin işlevlerini öğreniyor ve bu bilgiyi insan sağlığı için kullanmanın yollarını araştırıyoruz. Çünkü tedavinin ilk adımı hastalıkların nedenlerini bilmektir. Nakavt fareler sayesinde, çok sayıda hastalığın ardındaki genetik bozuklukları da öğrendik. Yaklaşık beşbin civarında hastalığın genetik bozukluklar sonucu ortaya çıktığı biliniyor. Nakavt teknolojisi bütün bu hastalıkların neden ve nasıl ortaya çıktığı, nasıl ilerlediği ve nasıl bir tedavi uygulanması gerektiği konusunda da cevaplar sunuyor. İnsan sağlığı açısından önemli olan pek çok hastalığa model oluşturdukları için nakavt fareler araştırma aşamasında olan ilaçların değerlendirilmesinde de kullanılıyor. Son yıllarda genleri vücudun bütün hücrelerinde nakavt etmek yerine sadece belli doku ve hücrelerinde nakavt edip üzerinde çalıştığımız genin bu doku ve hücrelerde ne yaptığını öğrenmeye başladık. Yakın gelecekte Capecchi'nin geliştirdiği bu tekniği kullanarak genlerin çalışma düzeylerini de kontrol edebileceğiz. Bütün bu çalışmalar sağlık açısından önemli bilgiler vermesinin yanı sıra temel bilimler açısından da çok önemli açıklamaları beraberinde getirecektir.

Kaynaklar

Capecchi, M. R., “Gene Targeting in Mice: Functional Analysis of the Mammalian Genome for the Twenty-First Century”, *Nature Reviews Genetics*, Sayı 6, s.507-512, Haziran 2005.
<http://nobelprize.org/mediaplayer/index.php?id=771&player=2> (Capecchi, M.R. Nobel Ödülü kabul konuşması, Aralık 2007, Karolinska Institute, Stockholm).
<http://nobelprize.org/mediaplayer/index.php?id=741&view=1> (Nobel Vakfından Adam Smith'in Capecchi ile Nobel Ödülünü aldığı gün yaptığı geleneksel telefon görüşmesi).

Stix, G., “Of Survival and Science”, *Scientific American*, s.26-27, Ağustos 1999.
 O'Dorisio, M. S., Karaçay, B., Fabricius, D., Shutt, D., Khanna, G., Thedens, D., Desmond, M., Yang, B., “Characterization of the VPAC1 Null Mouse”, 8th International Symposium for VIP-PACAP and Related Peptides, Manchester, Vermont, Eylül 8-9, 2007.



Bahri Karaçay, Iowa Üniversitesi Tıp Fakültesi Pediatri Bölümü, Çocuk Nörolojisi Kürsüsü öğretim üyesidir. Ayrıca aynı üniversitenin Gen Tedavi Merkezi ve Holden Kanseri Merkezi üyesidir. Nörolojik doğum kusurları üzerinde genler düzeyinde araştırmalar yürütüyor. Beş yaşın altındaki çocuklarda görülen sinir sistemi tümörü nöroblastoma ve yine sinir sistemini etkileyen Alexander hastalığına gen tedavisi geliştiriyor. Ayrıca alkolün ve LCM virüsünün fetüs beyni üzerindeki etkilerini araştırıyor.