

Transgenik Canlılar ve Akuakültürdeki Önemi*

*Aygül Ekici¹, Metin Timur¹, Haydar Bağış²

¹*İstanbul Üniversitesi Su Ürünleri Fakültesi Ordu Caddesi No:200 Laleli, İstanbul, Türkiye*

²*TÜBİTAK-GMBAE Beşevler Mahallesi, PK 21, 41470 Gebze, Kocaeli, Türkiye*

*E mail: aekici@istanbul.edu.tr

Abstract: *Transgenic organisms and its application in aquaculture.* The gene transfer technique, shortly, has permitted the transfer of genes from one organism to another. This technique is of great importance to many aspects of biomedical science including gene regulation, the immune system, cancer research, developmental biology. The production of transgenic animals is one of a number new and developing technologies that will have a profound impact on the genetic improvement of livestock. In aquaculture, the first microinjection method studies reported in 1985. Aim of this technology; elevated growth enhancement, resistance to some known diseases, tolerance to low oxygen concentrations and tolerance to subzero temperatures.

Key Words: Biotechnology, transgenic fish, aquaculture, transgene technology.

Özet: Transgen teknoloji kısaca, bir türe ait genin aynı veya başka bir türe aktarılmasına olanak sağlanması şeklinde ifade edebiliriz. Günümüzde bu teknoloji gen düzenlenmesi, bağışıklık sistemi, kanser araştırmaları ve gelişim biyolojisini de içeren biyomedikal alanlarda uygulanmaktadır. Ancak, hala üzerinde yoğun çalışmalar yapılan teknolojilerden biri olan transgenik hayvan üretiminde çiftlik hayvanlarının genetik alt yapılarının geliştirilmesi hedeflenmektedir. Soğukkanlı canlılarda ilk kez 1985'li yıllarda uygulanan transgen teknolojisinde temel hedef, soğuğa, düşük oksijene, hastalığa karşı balıklarda toleransın artırılması ve hızlı büyüme elde edilmesi şeklindedir.

Anahtar Kelimeler: Biyoteknoloji, transgenik balık, akuakültür, transgen teknoloji.

* TÜBİTAK-TOVAG tarafından 104V130 No'lu proje ile desteklenmektedir.

Giriş

1950'li yılların başında DNA molekülünün tanımlanması, gen teknolojisini başlatan ilk adım olmuştur. Organizmaların yapısal özelliklerinin ve işlevlerinin temelinde yeralan DNA'nın tüm canlılarda aynı veya birbirine çok yakın olması, tür içi ve türler arası gen aktarımını olası hale getirmiştir (Çırakoğlu, 2005).

Gen teknolojisi, yaklaşık 40 yıl içerisinde başta tıp ve tarım olmak üzere ormancılıktan çevre mühendisliğine, enerji sektöründen kozmetik endüstrisine kadar yaşamın hemen her alanında etkisini etkili bir şekilde göstermektedir (Çırakoğlu, 2005). Özellikle çiftlik hayvanlarına DNA'nın aktarımı ve germ hattı içerisine iletimi teknik avantaj sağlamaktadır. Transgen teknoloji, çiftlik hayvanlarının üretiminde özellikle keçi, koyun, domuz, sığır içerisine çaprazlama dışında yeni genlerin hızlı bir şekilde aktarımını sağlayan yeni bir yöntemdir. Uygulama ve metadoloji yönünden çok değişik bir teknoloji olmasına karşın genetik seleksiyon veya çaprazlama ile elde edilen sonuçlardan çok da farklılık göstermemektedir.

Gen transfer teknolojisi ile hayvan veya bitki genomu içerisine herhangi bir yabancı genin aktarımı sağlanabilmektedir. Gen, genom içerisine entegre olduğunda, anlatım yaptığında, transgenik organizmalar promotörlerin uzunluğuna, özelliğine ve aktarılan genin yapısına bağlı olarak yeni genotipik ve fenotipik özelliklere sahip olmaktadır. İşte bu temel olgudan yola çıkarak akuakültürde de transgenik

balık üretiminin oldukça yararlı olacağı ve yeni nesillerin elde edilmesinde geleneksel yetiştiricilik tekniklerinden daha etkili sonuçlar alınacağı yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır. Bu bağlamda, balıklarda ilk transgenik çalışmalar Zhu ve arkadaşları (1985) tarafından, insan büyüme hormonu geni kullanılarak japon balığı (*Carassius auratus*) yumurtalarına aktararak yapılmıştır (Sarmaşık, 2001). Ayrıca, büyüme hormonu geni kullanılarak gökkuşuğu alabalığı (*O. mykiss*), medaka (*Oryzias latipes*), Atlantik salmon (*Salmo salar*), koho salmon (*O. kisutch*), tilapya (*Oreochromis niloticus*), yayın (*Ictalurus punctatus*), turna (*Esox lucius*), topminnow (*Poeciliopsis lucida*), sazan (*Cyprinus carpio*) balıklarında da transgenik çalışmalar yapılmaktadır (Sarmaşık, 2001).

Transgenik hayvanların üretiminde kullanılan transgen yapıların iki temel özelliği vardır. Bunlar; fonksiyon kazandıran veya fonksiyon kaybına neden olan transgen yapılarıdır (Tablo 1). Fonksiyon kazandırıcı özelliğe sahip olan yapılarda amaç; bir hücre veya doku tipinde daha önce varolmayan gen ürününe yeni anlatım kazandırılmasıdır (Chen ve ark., 1995, Wheeler ve ark., 2003). Fonksiyon kaybına neden olan transgen yapılarında ise amaç, bir hücre veya doku tipinde mevcut olan bir gen yapısının özelliğinin baskılanması şeklinde ifade edilebilmektedir (Wheeler ve ark., 2003).

Transgenik Hayvanların Kullanımı

Transgenik organizmaların üretimi, biyolojik çalışmalarda bazı teknik avantajlar sağlamaktadır. Bu tür canlılar, gelişim

biyolojisi ve gen düzenleme mekanizmalarının çalışılması için yeni fırsatlar sunmaktadır. Ayrıca; onkogenik virüsler ve kanser gelişiminde rol alan genlerin hareketinin anlaşılmasında; bağışıklık sisteminde hücreler arası etkileşim mekanizmalarının anlaşılmasında; insan genetik hastalıklarının anlaşılması için model organizma olarak kullanılabilirler (Wheeler ve ark., 2003). Transgenik teknolojinin eşsiz bir kullanım alanı da, ksenotransplantasyon (Wheeler ve ark., 2003) ve diğer biyomedikal kullanımlar için insan antijenleri veya proteinlerini içeren organ, doku veya hücrelerin üretimidir (Bağış, 2002, Wheeler ve ark., 2003, Morita ve ark., 2004).

Tablo 1. Fonksiyon kazandıran ve kaybettiren transgenler (Wheeler ve ark., 2003).

Fonksiyon Kazandıran Transgenler	Fonksiyon Kaybettiren Transgenler
Yeni gen girişi (Knock-in)	Mevcut genin çıkışı (Knock-out)
Yeni anlatım	Eski anlatımın kaybı
Anlatımın artırılması	Anlatımın artırılması
Antisense (ters, zıt) RNA	Antisense (ters, zıt) RNA
İnversiyonel mutasyonlar	İnversiyonel mutasyonlar

Transgenik Organizmaların Üretimi Sonucu Oluşabilecek Olumsuzluklar:

- (1) Genlerin düzenli olmayan anlatımı sonucunda gen ürünlerinin üretiminde artış veya azalış.
- (2) Kopya sayısının aşırı derecede artması sonucunda ürünlerin anlatımında da artış.
- (3) Yan etkileri olasıdır. Örneğin, büyüme hormonu verilmiş transgenik domuzda eklem iltihabı, iskelet büyümesinde değişim, kardiyomegali, dermatitis, gastrik ülserler ve renal hastalıkların görülmesi.
- (4) İntersiyonel mutasyonlar sonucunda bazı biyolojik süreçlerin değişime uğraması.
- (5) Gen aktarılan transgenik balıkta görülen mozaik yapı sonucunda yavruların sadece bir kısmında transgen iletiminin gözlemlenmesi.
- (6) "Y" kromozomuna transgenin iletimi ile sadece erkek bireyin transgen yapıyı taşıması (Wheeler ve ark., 2003).

Transgen Teknolojisinin Akuakültürdeki Önemi ve Bu Konudaki Çalışmalar

Dünya balık stoklarındaki azalmaya karşın artan nüfusa paralel olarak su ürünleri tüketiminin giderek artması, su ürünleri yetiştiriciliğini daha da önemli hale getirmektedir.

Genel olarak akuakültürdeki başarı, iyi bir genetik altyapı, hastalıkların tespiti ve etkili bir şekilde engellenmesi, üreme döngüsünün kontrolü, büyüme ve gelişme için çevresel, fizyolojik ve beslenme koşullarının optimum seviyeye getirilmesi ile ilgilidir. Bu çabalar daha çok seleksiyon, triploidi çalışmaları, hormon enjeksiyonları gibi yöntemlerle yapılmakta ise de, gen transferi yönteminin, su ürünleri yetiştiriciliğinde verimliliği artırmada kullanılabilir etkili ıslah yöntemleri arasında olduğu yapılan çalışmalarla ortaya konulmaktadır. Günümüzde bu ileri teknolojiyi su ürünleri sektöründe uygulayan ülkeler, balıklarda gen aktarımı yaparak daha hızlı

büyüyen, hastalıklara dayanıklı, üremesi kontrol edilebilen ve çevre koşullarına daha iyi adapte olabilen balıklar üretebilmektedir (Sarmaşık, 2003).

Transgenik çalışmalarda suda yaşayan hayvanlara yönelmedeki nedenler şu şekilde özetlenebilir.

1. Çok sayıda yumurta vermeleri ve yumurtaların kolaylıkla manipüle edilebilmesi nedeniyle çiftlik hayvanlarının yumurtalarından daha kolay bir şekilde DNA aktarımına olanak sağlamakta.

2. Akuakültür en hızlı büyüyen gıda sektörlerinden biridir. 1984 yılından beri her yıl yaklaşık %10 oranında bir artış göstermektedir (Levy ve ark., 2000).

Transgenik balığın üretiminde temel prosedür ana başlıklarla şu şekilde özetlenebilir.

1. Transgenik DNA'nın yapısı ve dizaynı
2. Balık germ hücrelerinin içerisine transgenin transferi
3. Transgenik balığın takibi
4. Transgen anlatımı ve fenotipinin belirlenmesi
5. Kalıtım çalışmaları
6. Transgenik stabil hatlarının seçimi'dir (Levy ve ark. 2000).

Transgen, son uç dizisi (polyA kuyruğu), istenen özelliği şifreleyen yapısal gen ile her yerde anlatım yapan bir promotörün birlikte ifadesidir. Transgenik balığın üretiminde temel problemlerden biri de geni aktif hale getiren promotör/enhancer'ın seçimidir. Bu konuda yapılan çalışmalarda ilk olarak Rous Sarcoma Virus, SV40 ve fare metallothionein-1 promotörleri kullanılmıştır. Daha sonraki yıllarda ise balık kökenli promotörler, anti-freeze protein (AFP) ve sazan beta aktin gen yapıları, kullanıldığında memeli kökenli promotörlerden daha etkili anlatım yaptığı yapılan çalışmaları ortaya konulmuştur (Levy ve ark. 2000).

Büyümenin hızlandırılması

Büyümenin hızlandırılması ile ilgili ilk çalışmalar Palmiter (1982), tarafından farelerde yürütülmüştür (Bağış ve Pabuççuoğlu., 1997). Başarı ile sonuçlanan bu çalışma, daha sonraları diğer hayvanlarda da tekrarlanmıştır. Bu gelişmeden iki, üç yıl sonra rekombinant insan büyüme hormonu geni (hGH) döllenmiş japon balığı yumurtalarına başarılı bir şekilde aktarımları yapılarak hızlı büyüme gösteren transgenik balıklar elde edilmiştir. Daha sonraki yıllarda, sazan balığına "yalnız balık kökenli" ekspresyon vektörleri ile rekombinant büyüme hormonunun dizaynı ve aktarımı sağlanmıştır. Yani; insan büyüme hormonu gen yapısı yerine balık kökenli büyüme hormonu geni kullanıldığında daha etkili bir büyüme gözlemlenmiştir. Daha sonraki çalışmalarda "yalnız balık kökenli" ekspresyon vektörleri ile GH geni taşıyan transgenik sazanın modern akuakültür için başarılı bir örnek olduğu kanıtlanmıştır.

Salmonid balıkları kullanılarak yapılan çalışmalarda da etkili sonuçların alındığı yapılan çalışmalarla ortaya konulmuştur (Hackett ve Alvarez, 2000; Yoshizaki, 2001). Bu çalışmalarda genç salmonlarda büyüme oranı ortalama 3-5 kat artış gösterirken, bu oran, ilk bir kaç aylık süreçte kontrol gruplarına göre 10-30 katı kadar artış olduğu sonucunu ortaya koymuştur (Hackett ve Alvarez, 2000).

Üreme aktivitesinin kontrolü

Gen transferi çalışmalarında transgenik bireylerin doğal yaşam ortamına karışma riskine karşı bu bireyler birarada tutulmakta ve bu bireylerin doğaya karışması riskine karşı da kısır olmaları sağlanmaktadır. Bilindiği üzere geleneksel metotlarla elde edilebilen kısır bireylerin yanısıra transgenik bireylerin kısır hale getirilmelerinde geliştirilmiş promotörlerden yararlanılmaktadır. Bu promotörler gonadotropin hormonunun etkisini baskı altına alarak bireylerin kısır olmalarını sağlamaktadır. Böylece kısırleştirme çalışmaları ile transgenik canlıların doğal ortamdaki normal bireylerle birlikte üremeleri engellenmektedir (Maclean ve Laight, 2000).

Soğuğa karşı toleransın artırılması

Soğuk sular birçok balık türü için stres oluşturan bir faktördür. Ancak bilinen birkaç tür 0 °C ve 1°C su sıcaklığında yaşamlarını sürdürebilmektedir. Bu bağlamda gen transferi çalışmaları ile balıkların optimum şartların altındaki sıcaklıklarda bile hızlı büyüme göstermesi (Hackett ve Alvarez, 2000; Yoshizaki, 2001) ve yem alımının sağlanması yönünde çalışmalar yapılmaktadır (Hackett ve Alvarez, 2000).

Hastalıklara karşı toleransın artırılmasında

Transgenik balık uyulamalarının kullanıldığı alanlardan biri de hastalığa karşı toleransın artırılması çalışmalarıdır. Bu konuda bakteriyel hastalıklara karşı direncin artırılması ve spesifik viral patojenlere karşı toleransın artırılması için çalışmalar yapılmaktadır (Maclean ve Laight, 2000). Bu bağlamda, DNA aşısı olarak gökkuşuğu alabalığı yumurtalarına infeksiyöz hematopietik nekroz virüsü şifreleyen dizi aktarımı (Anderson ve ark., 1996) çalışmaları başarı ile yürütülmüştür. Aynı çalışmalar kapsamında insan laktoferrin geninin (hLF) ot sazani hemoraji virüsüne (GCHV) karşı toleransın artırılması için ot sazani yürütülen denemeler devam etmektedir (Zhong ve ark, 2002).

Akuakültür alanında yapılan bu çalışmalar içerisinde en etkili sonuçlar, büyümenin hızlandırılması yönünde yapılan çalışmalarla elde edilmiştir. Bu nedenle diğer çalışmalar, özellikle hastalıklara toleransın artırılması çalışmaları, üzerinde halen etkili sonuçlar alabilmek için araştırmalar devam etmektedir.

Gen Aktarımında Kullanılan Teknikler

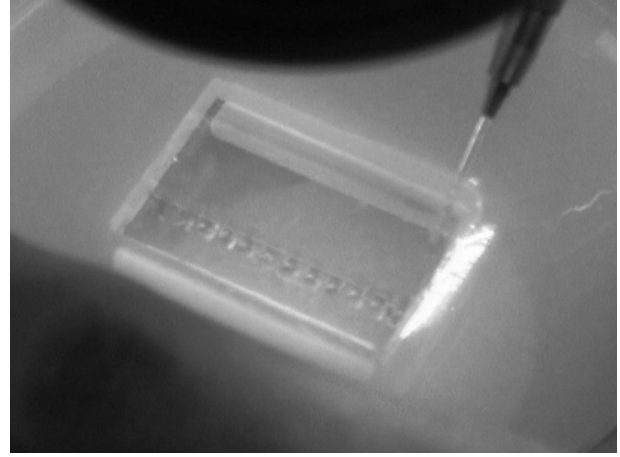
Transgenik birey elde edilmesinde çok çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Bunlar kısaca, mikroenjeksiyon, elektroporasyon, gen tabancası ve sperm elektroporasyon metodlarıdır (Powers ve ark., 1992).

Mikroenjeksiyon

Koyun ve fare gibi yüksek vertebratlılarda en etkili gen transferi metodlarından biri de mikroenjeksiyon yöntemidir (Sarmaşık, 2003). Bu teknikte transgen, döllenmiş yumurtanın blastodiskine doğrudan enjekte edilmektedir (Yoshizaki, 2001, Sarmaşık, 2003).

Balıklarda kullanılan gen transferi yöntemleri, bitkilerde ve farelerde kullanılan yöntemlerin balığa adaptasyonu olduğundan, balıklarda döllenmiş yumurtaya yabancı DNA aktarımında ilk uygulanan tekniğin mikroenjeksiyon yöntemi olduğu söylenebilir (Chen, 1995). Bu teknik yukarıda sözü

edilen diğer tekniklerle kıyaslandığında, transgenik balık üretiminde en çok tercih edilen bir yöntem olduğu söylenebilir (Hew CL ve ark. 1995). Yöntem, ilk olarak döllenmiş gökkuşuğu alabalığı (*Oncorhynchus mykiss*) ve kırmızı japon balığı (*Carassius auratus*) yumurtalarında uygulanmıştır (Yoshizaki, 2001). Daha sonraki yıllarda medaka (*Oryzias latipes*), zebra balığı (*Danio rerio*) ve diğer birçok türde başarı ile tekrarlanmıştır (Chen, 1995).



Şekil 1. Döllenmiş Yumurtaya Mikroenjeksiyon Yöntemi ile Gen Aktarımı

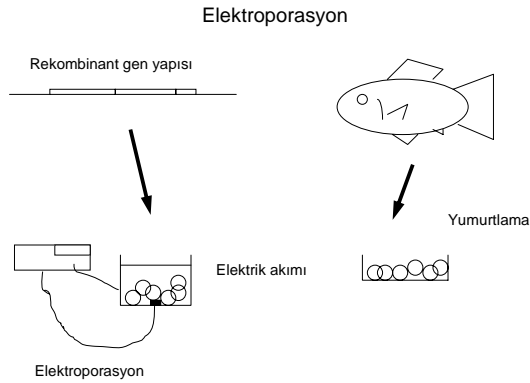
Elektroporasyon

Elektroporasyon, maya, bakteri, bitki ve hayvan hücrelerine yabancı DNA' nın transferinde kullanılan ve başarılı olduğu bildirilen bir metoddur (Chen, 1995). Bu metod, 1990 yılından itibaren balık embriyoları içerisine yabancı genin aktarılması için de kullanılmaktadır. Sözü edilen bu yöntemde hücre membranının geçirgen özelliğinden yararlanılarak döllenmiş yumurtaya elektrik akımı verilerek DNA' nın aktarımı sağlanmaktadır (Levy ve ark., 2000). Bu metodla canlı embriyoların %20 veya daha yüksek bir oranında DNA iletimi sağlandığı bildirilmektedir (Chen, 1995).

Elektroporasyon yöntemi daha çok sayıda yumurtaya DNA iletimi sağlayabildiğinden mikroenjeksiyondan farklı olarak yumurta büyüklüğü sınırlandırılmadan ve el becerisine gerek duyulmaksızın kullanılabilen etkili bir yöntem olduğu söylenebilir (Chen, 1995).

Spermatozoa hücreleriyle gen transferi

Spermatozoa aracılığıyla gen transferi, yöntemin doğallığı nedeniyle en olumlu gen transfer tekniklerinden biridir denilebilir. Bu teknik ilk olarak farelerde uygulanmıştır. Hareketli olan spermatozoa hücresi DNA'yı bağlayabilme ve yumurta içerisine taşıyabilme özelliğine sahiptir. Ancak, üreme alanı dışında bu hücrelerin varlığını sürdürebilme süresinin çok kısıtlı olması, spermatozoa hücreleri ile gen transfer uygulamasını tartışma konusu yapmaktadır. Diğer taraftan, balık spermatozoa hücreleri az bir kayıpla günlerce seminal plazmada depolanabilmekte ve bu yüzden bu teknik soğukkanlı bir canlı olan balıklarda çok ümit verici görülmektedir (Sarmaşık, 2003).



Şekil 2. Elektroporasyon Metodu ile Gen Aktarımı

Lipofeksiyon

Lipofeksiyon, liposomlar aracılığı ile yapılan gen transferi yöntemidir. Günümüzde liposomlar, memeli hücre kültürlerinde gen dağıtım sistemleri olarak başarıyla kullanılmaktadır. Bugüne kadar balığa gen aktarımında lipofeksiyon metodu kullanılmamasına karşın, bu tekniğin balığa adaptasyonunun mümkün olabileceği düşünülmektedir (Sarmaşık, 2003).

Retroviral enfeksiyon

Retroviruslar, konak genomu içerisinde genetik materyalin tek kopyasının ilavesi ve etkili bir şekilde entegrasyonu nedeniyle ideal bir gen aktarım aracıdır. Yüksek vertebralı canlılarda ve balıklarda gen aktarımı için başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir. Ancak, ilgili transgeni içeren retroviral partiküllerin hazırlanması çok fazla laboratuvar çalışması, maliyet ve teknoloji gerektiren bir yöntemdir. Bu yüzden bu metodun kullanımı sınırlıdır. Yine de bu teknik kabuklu su canlılarından tatlısu istakozu (*Astacus leptodactylus*) ve canlı yavru veren balık türlerindeki gen transferini olanaklı kılacağı bildirilmektedir (Sarmaşık, 2003).

Sonuç

Klasik genetik çalışmaları, rekombinant DNA teknolojisinin keşfine kadar organizmaların genetik özellikleri hakkında

önemli bilgiler sağlamıştır. Ancak, rekombinant DNA teknolojisinin keşfiyle spesifik genetik özelliklerden yararlanılmasında hız kazanılmıştır. Bu teknolojinin suda yaşayan canlılarda kullanımı ile, yararlı rekombinant proteinlerin üretimi ve akuakültürde çevre koşullarına toleranslı bireylerin elde edilmesi mümkün olabilmektedir. Ancak sözü edilen teknolojinin etkili olabilmesi, mevcut bazı teknik problemlerin en aza indirilmesine veya tamamen ortadan kaldırılmasına bağlıdır.

Kaynakça

- Anderson, E.D., Mourich, D.V. 1996. Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 5(2): 114-122.
- Bağış, H., Papuççuoğlu, S. 1997. Studies on the production of transgenic mice. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 21: 287-292.
- Bağış, H. 2002. Transgenik biyoreaktörlerde rekombinant proteinlerin üretimi. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 28(1): 113-123
- Chen, T.T., Lu, K.J. and Kight, K. 1995. Transgenic fish, p:910- 914. Meyers, R.A.(ed.) *Molecular Biology and Biotechnology*
- Çirakoğlu, B. 2005. Gen Teknolojisi: Bugün ve Yarın. I. Tıbbi Biyolojik Bilimler Kongresi 04-07 Ocak 2005 İstanbul.
- Hackett, P.B. and Alvarez, M.C. 2000. The molecular genetics of transgenic fish. *Recent Advances in Marine Biotechnology*, 4: 77-145
- Hew, C.L., Fletcher, G.L., Davies, P.L. 1995. Transgenic salmon: Tailoring the genome for food production. *J. Fish Bio.* Vol.47
- Levy, J.A., Marins, L.F. and Sanchez, A. 2000. Gene transfer technology in aquaculture. *Hydrobiologia*, 420:91-94
- Macleay, N. and Laight, R.J. 2000. Transgenic fish: an evaluation of benefits and risks. *Fish and Fisheries*, 1: 146-172.
- Morita, T., Yoshizaki, G., Kobayashi, M., Watabe, S. 2004. Fish eggs as bioreactors: the production of bioactive luteinizing hormone in transgenic trout embryos. *Transgenic Research*, 13: 551-557
- Powers, D.A., Chen, T.T. and Dunham, R.A. 1992. Transgenic fish. p:233-249. Murray, J.A.H. (ed.) *Transgenesis*, John Wiley&Sons Ltd.
- Sarmaşık, A., Chun, C.Z., Jang, I.K., Lu, J.K., and Chen, T.T. 2001. Production of transgenic live-bearing fish and crustaceans with replication-defective pantropic retroviral vectors. *Marine Biotechnology*. Vol. 3
- Sarmaşık, A. 2003. Application of gene transfer technology for genetic improvement of fish. *Turk. J. Zool.*, 27: 1-6
- Wheeler, M.B., Walters, E.M., Clark, S.G. 2003. Transgenic animals in biomedicine and agriculture: outlook for the future. *Animal Reproduction Science*, 79: 265-289
- Yoshizaki, G. 2001. Gene transfer in *Salmonidae*: Applications to aquaculture. *Suisanzoshoku*, 49 (2): 137-142
- Zhong J.; Wang Y.; Zhu Z. 2002. Introduction of the human lactoferrin gene into grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) to increase resistance against GCH virus. *Aquaculture*. 214 (1), 93-101