

3. Ulusal Antibiyotik ve Kemoterapi Kongresi (7-9 Haziran 1988, Ankara)

"Antiviral ajanlar: Profilaktik ve tedavi amaçlı kullanımları" Simpozyumu sunularından:

Paper submitted to the Symposium "Antiviral agents: Prophylactic and therapeutic usages" in the 3rd National Congress of Antibiotic and Chemotherapy (7-9 June 1988, Ankara):

İNTERFERONLARIN REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ İLE ELDESİ

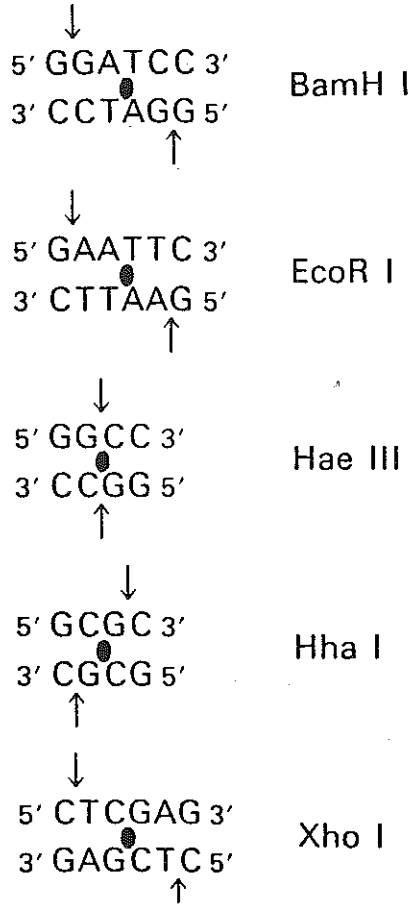
Şükrüye AYTER (BAYKAN)

Production of interferons by recombinant DNA technology.

İnterferonlar hedef hücreler üzerinde antiviral, antitümöral ve immünmodülatör etki gösteren moleküllerdir. Antijenik, biyolojik ve kimyasal özellikleri dikkate alındığı zaman interferonlar üç grup halinde toplanabilirler. Lökosit veya alfa interferon (IFN- α), fibroblast veya beta interferon (IFN - β) ve immün veya gama interferon (IFN - γ). Bu üç sınıf interferon molekülü hemen hemen tüm memeli türlerinde mevcuttur (7, 8). IFN- α ve IFN - β aside dirençli ve virus tarafından indüklenebilen moleküller olduğundan bunlar hakkında daha fazla çalışma yapılabilmiş ve bilgi edinilmiştir. Bu iki tip interferonun rekombinant DNA teknolojisi ile de sentezlenmiş olması sayesinde yapıları ve aktiviteleri de açıklanabilmıştır. IFN - γ ise diğer interferonlarla kros reaksiyon vermeyen, aside dirençsiz farklı bir moleküldür (7). İnterferonların indüksiyonu ve aktivitelerinin moleküler mekanizmalarını açıklamak üzere yoğun çalışmalar yapılmasına karşın doğal interferon miktarının çok düşük olması nedeni ile bu konudaki çalışmalar yavaş ilerlemektedir. Ancak rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesi ile yüksek konsantrasyonda saf interferon eldesi mümkün olabilmıştır.

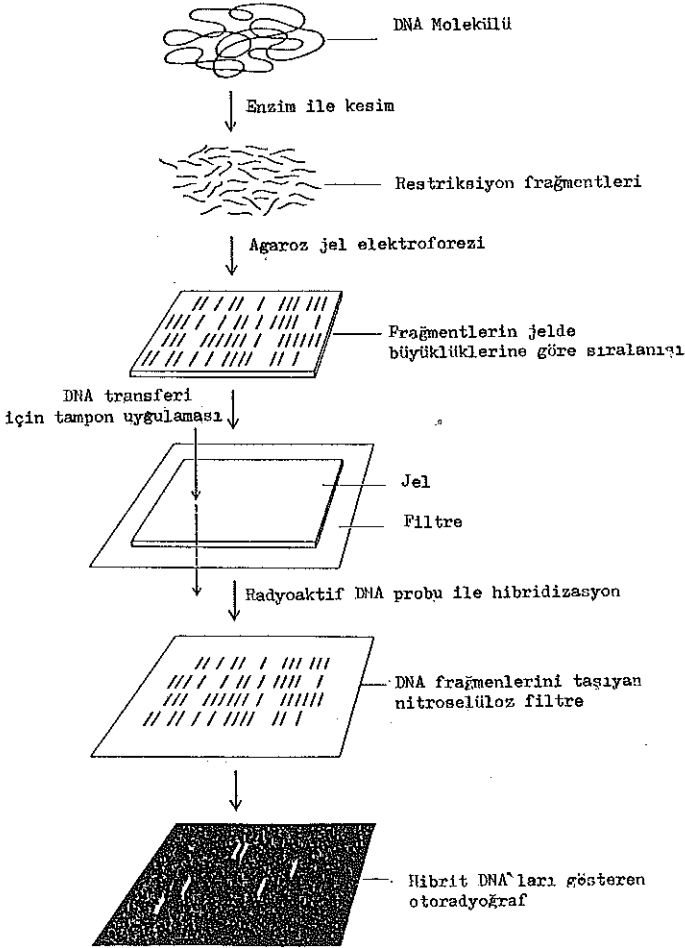
Rekombinant interferondan söz edildiği zaman hücrelerde bulunan interferon genlerinin izole edilip veya in vitro şartlarda sentezlenip, uygun taşıyıcı sistemler yardımı ile bakteriye aktarılması ve bu genlerin bakteride çoğaltılarak interferon molekülünün sentezlenmesi olaylarından söz edilmektedir (7, 11). Rekombinant DNA teknolojisi birçok disiplinin birlikte iş gördüğü bir teknik olduğundan ve kullanılan metodların büyük bir kısmının yeni geliştirilmiş olması nedeni ile bunlardan kısaca söz etmek yerinde olacaktır. Bu teknolojinin ana elemanlarından biri bakteriyel endonükleazlardan olan restriksiyon enzimleridir (6, 10). Bu enzimler çift zincirli DNA'yı özgül nükleotid dizilerinden tanır ve keserler. Tanım bölgeleri 4-6 nükleotid genişliğinde olan enzimler bu teknolojiye özellikle tercih edilirler. Bugün tanıma bölgeleri ve optimum çalışma koşulları bilinen 200'den fazla restriksiyon enzimi

bulunmakta ve ticari olarak sağlanabilmektedir. Bir restriksiyon enziminin tanınma bölgesi ne kadar geniş olursa, DNA molekülü üzerinde tekrarlanma şansı o kadar azalır ve DNA bu enzimle kesildiği zaman da daha az sayıda fragment elde edilir. Tanıma bölgesi incelendiği zaman nükleotid sekansları yönünden bilateral simetriye sahip olduğu görülür. Kesim noktaları simetri merkezinde veya dışında olabilir ve buna bağlı olarak da küt veya yapışkan uçlu DNA fragmentleri verirler (Şekil 1). Bir DNA molekülünün aynı restriksiyon enzimi ile kesilmesi halinde her zaman aynı fragmentler elde edilir ve bu fragmentler değişik amaçlarla kullanılabilir (6).



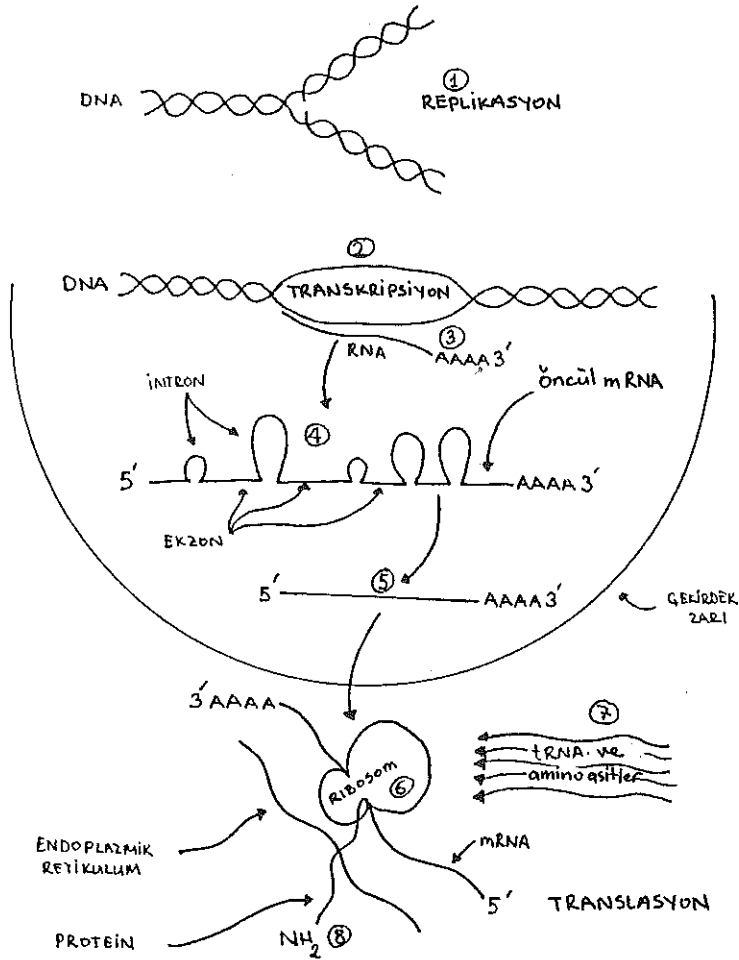
Şekil 1. Restriksiyon enzimleri kesim noktalarının yerine bağlı olarak yapışkan veya küt uçlu fragment verebilirler.

Hücresel DNA, restriksiyon enzimlerinden bir veya birkaçı kullanılarak parçalandığı zaman, ortaya çıkacak fragmentlerden bir tanesi ilgilendiğimiz interferon genlerini taşıyor olacaktır. Bu fragmentlerin birbirinden ayrılması jel elektroforezi ile sağlanır (4, 11). Tercihan agaroz jelde, elektrik akımının yardımı ile fragmentler büyüklüklerine göre birbirlerinden ayrılırlar (Şekil 2). Bundan sonra manipülasyonu kolaylaştırmak amacı ile jeldeki fragmentler nitroselüloz filtrelere aktarılırlar. Filtreler 80 °C'da ısıtılarak hem DNA'ların denatürasyonu (ilerideki hibridizasyon çalışmaları için) hem de fragmentlerin filtrelerde fiksasyonu sağlanmış olur. Bir sonraki aşama, radyoaktif işaretli prob



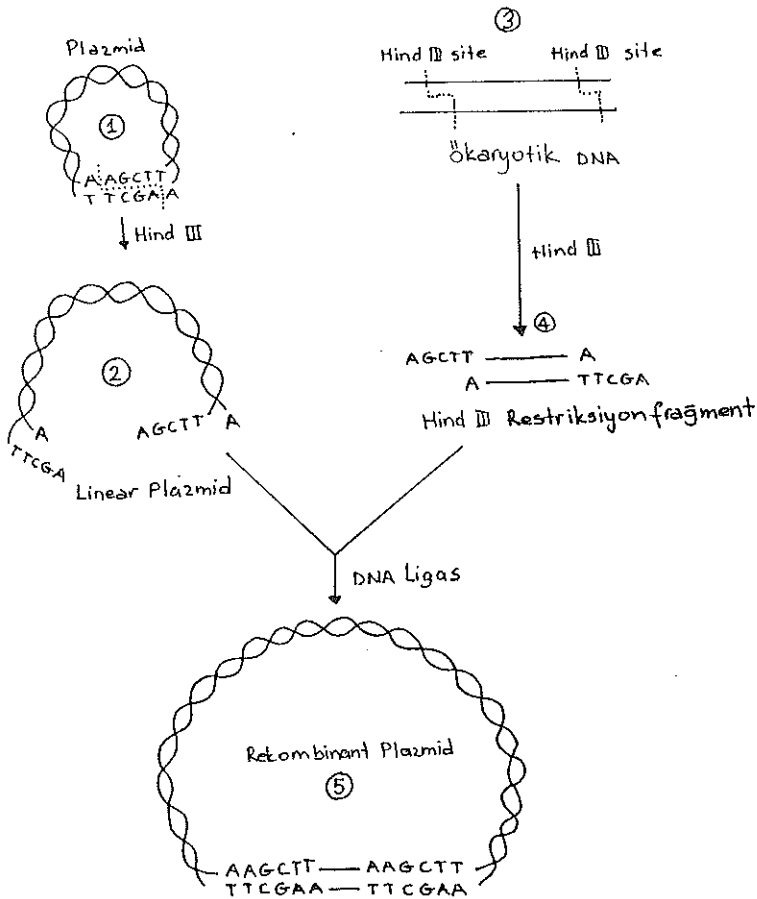
Şekil 2. Restriksiyon enzimi fragmentleri jel elektroforezi yardımı ile birbirlerinden büyüklüklerine göre ayrılırlar.

kullanılarak interferon genini taşıyan fragmentin saptanmasıdır. Prob olarak radyoaktif işaretli interferon mRNA'sı veya cDNA kullanılabilir. Memeli genomuna ait genlerin bakteriyeye aktarılıp, bakterinin genleriymiş gibi çoğaltılması olayı gen klonlanması olarak bilinir. Ancak, memeli genomundan elde edilen genler, bakteride çoğalsalar bile her zaman bakteride ekspres olmayabilirler. Çünkü, bakteri ve ökaryotlarda genetik bilginin aktarımı sırasında farklı mekanizmalar işlemektedir. Örneğin, memeli genomunda proteine çevrilen (ekzon) ve çevrilmeyen (intron) bölgeler mevcuttur. Genetik bilginin akımı sırasında, mRNA'nın sentezini takiben "RNA splicing" adı verilen bir mekanizma ile proteince çevrilmeyen intron bölgeler çıkarılır ve geri kalan ekzon bölgeler birleştirilerek olgun mRNA sentezlenmiş olur (Şekil 3). Oysa bakteride böyle bir mekanizma bulunmadığından, memeli gen fragmentleri doğrudan bakteriyeye aktarılacak olursa, intron bölgelerin çıkarılarak fonksiyonel proteinin sentezlenmesi söz konusu değildir. Bu nedenle intron bölge içeren genlerden ürün elde etmek söz konusu olduğu zaman intron bölge içermeyen genler sentetik olarak oluşturulurlar.



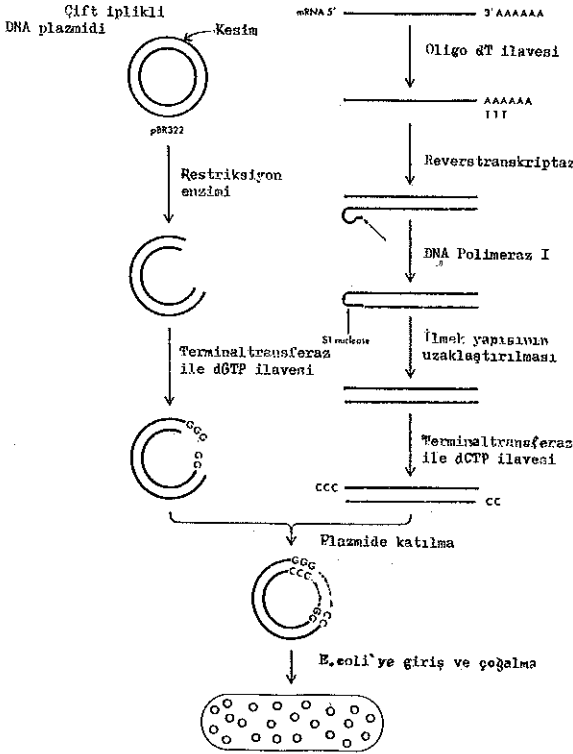
Şekil 3. Ökaryotlarda gen akımı sırasındaki işlemler yukarıdaki gibi şematik olarak özetlenebilir.

Rekombinant interferonlar her iki metodla da elde edilebilir. α ve β interferon genleri intron bölge içermediği için interferon sentezleyen hücrelerden mRNA izole edilip kısmî pürifikasyonu yapıldıktan sonra revers transkriptaz enzimi ve DNA polimeraz yardımı ile cDNA hazırlanır (12) (Şekil 4). Bu cDNA'lar intron bölge içermediği için bakteride proteine çevrilebilirler. Değişik metodlarla hazırlanan interferon genlerinin bakteriye aktarılması ise özel vektörler aracılığı ile gerçekleştirilir. Vektör olarak kromozomdan bağımsız çoğalabilen sitoplazmik plazmid veya viral DNA'lar kullanılmaktadır (2). İyi bir vektörde aranan özelliklerin başında, restriksiyon enzimleri için tek kesim noktası, birden fazla genetik marker, tercihan kesim noktasının



Şekil 4. Rekombinant vektörlerin hazırlanışı.

markerlerden birinin içinde olması gelmektedir. Bu markerler izleyici marker olarak bilinirler. Rekombinant plazmid hazırlanırken cDNA ve vektör plazmid DNA ligaz enzimi varlığında reaksiyona sokulur (Şekil 5). Daha sonra bu rekombinant plazmidler transformasyon yolu ile bakterilere aktarılırlar. Plazmidi alan bakteriler özel yöntemlerle izlenip seçilir ve üretilirler. İnterferon - α *E.coli*'de ilk kez üretildiği zaman hücre başına 50 molekül interferon eldesinin büyük başarı olarak değerlendirilmesine karşın, rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak bu miktar artmış ve ilk verimin bin katına çıkmıştır (11). Bu bakterileri verimli birer interferon fabrikası haline getirebilmek için değişik yöntemler uygulanmakta ve genin çalışmasını hızlandıracak



Şekil 5. Değişik metodlarla elde edilen ökaryotik DNA fragmentlerinin bakteriye verilinceye kadar geçirdiği işlemler.

özel promotör diziler de rekombinant vektörlere eklenerek, 1 litre *E.coli* kültüründen mg düzeyinde interferon elde edilebilmektedir. Bakteri hücresi memeli hücresine göre daha basit bir yapıda olduğundan bu interferonların pürifikasyonları da daha kolay olmaktadır. Pürifikasyonda değişik metodlar kullanılabilirle birlikte, interferonun tümüne veya fonksiyonel bölgelerine karşı antikor içeren afinite kromatografileri en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Bu yolla elde edilen interferonlar kristalize edilebilmiş, deney hayvanları ve doku kültürü sistemlerinde test edilerek non-toksik olduğu gösterilmiştir (7).

Rekombinant DNA çalışmalarının interferon konusundaki bilgilere bir diğer katkısı da, genetik kod bilgileri kullanılarak cDNA'nın nükleotid dizilerinden interferonların amino asit dizilerinin çıkarılabildiği olmasıdır. Bu çalışmalar sonunda IFN - α ve β 'nin 166 amino asit içerdiği açıklık kazanmıştır. Ayrıca hibridizasyon çalışmaları da interferonlar için heterogen bir gen grubunun bulunduğunu ortaya koymuştur. Interferon alfa için alt tipleri kodlayan en az 13 ayrı aktif gen mevcuttur, bunların yanında bir de psödogen diyebileceğimiz inaktif interferon genleri mevcuttur (9). IFN - β için ise tek gen gösterilmiş ve klonlanmıştır. IFN - α gen ve psödogenleri, IFN - β genlerinin tümü 9 no.lu kromozomda yer almaktadır. Rekombinant interferonlar biyolojik aktivite ve yapısal özellikleri yönünden doğal interferonlarla karşılaştırıldığı zaman aralarında büyük benzerlikler ve bazı farklılıklar bulunduğu göze çarpmaktadır (3). Doğal kaynaklardan elde edilen IFN - α ve β moleküllerinin bir kısmı glikolize moleküllerdir. Bakteride sentezlenen interferonlar ise şeker ünitesi içermezler (1, 3, 5). Doğal ortamları dışında sentezlenmiş interferon moleküllerinin biyolojik aktivitelerini ölçebileceğimiz biyolojik deney sistemlerinin başında antiviral aktivitelerinin saptanması gelmektedir. Glikolizasyonun antiviral aktivite için gerekli olmaması rekombinant interferonların önem kazanmasında rol oynamıştır. Glikolize olmayan alfa ve beta interferonlar antiviral aktivite gösterebilmektedirler.

Söz konusu immün interferon olduğu zaman şeker ünitesi aktivite için şart olduğundan bakteride sentezlenen moleküllerin invitro glikolizasyonu ve aktivasyonu gerekmektedir. Doğal ve rekombinant interferonlar yapısal olarak karşılaştırıldığı zaman göze çarpan diğer bir yapısal özellik ise rekombinant lökosit interferonun, doğal interferondan 10 amino asit daha eksik olmasıdır. Bu on amino asitlik fark sekresyon sırasında işlenmeye bağlı olarak ortaya çıkmakta ve aktiviteyi etkilememektedir.

Bugün rekombinant interferonların hazırlanmasında aşılması gereken önemli problem glikolizasyon olduğu için bu konuda yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Doğal interferonlarda glikolizasyon mekanizmaları çalışıldığı zaman Asp-x-ser amino asit dizisinin gerekli olduğu, ancak konakçıya ait başka mekanizmaların da işe karıştığı anlaşılmıştır (1). Serumda bulunan bazı taşıyıcı proteinlerin glikolizasyon için sinyal olabileceğini de destekleyen bulgular mevcuttur.

Invitro glikolizasyonun gerçekleştirilmesi halinde önemli bir problem çözülecek ve rekombinant interferonların kullanım alanları yeni boyutlar kazanacaktır (5).

KAYNAKLAR

1. Derynck D, Content J, DeClerck E, Volckaert G, Tavernier J, Devos R, Fiers W: Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene, *Nature* 285: 542 (1980).

2. Gluzman Y: *Eukariotic Viral Vectors*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York (1982).
3. Goeddel D V, Yelverton E, Ulrich A, Heyneker H L, Miozzari G, Holmes W, Seeburg P H, Dull T, May L, Stebbing N, Crea R, Maeda S, McCandliss R, Sloma A, Tabor J M, Gross M, Familetti P C, Petska S: Human leucocyte interferon produced by E.coli is biologically active, *Nature* 287: 411 (1980).
4. Helling R B, Geodman H M, Boyer H W: Analysis of endonucleases Eco R I fragments of DNA from Lambdoid bacteriophages and other viruses by agarosegel electrophoresis, *J Virol* 14: 1235 (1974).
5. Nagata S, Taira H, Hall A, Lorraine J, Streuli M, Ecsödi J, Boll W, Cantell K, Weissmann C: *Nature* 284: 316 (1980).
6. Nathans D, Smith H O: Restriction endonucleases in the analysis restructuring of DNA molecules, *Ann Rev Biochem* 44: 273 (1975).
7. Petska S: The human interferons-From protein purification and sequence to cloning and expression in bacteria: Before, between and beyond, *Arch Biochem Biophys* 221: 1 (1983).
8. Petska S, Langer A J: Interferons and their action, *Ann Rev Biochem* 56: 727 (1987).
9. Streuli M, Nagata S, Weissmann C: At least three human type alpha interferons: structure of alpha 2, *Science* 209: 1343 (1980).
10. Watson J D, Tooze J, Kurtz T D: *Recombinant DNA*, Chapter 5, Methods of creating recombinant DNA molecules, s.58, Scientific American Inc, New York (1983).
11. Watson J D, Tooze J, Kurtz T D: *Recombinant DNA*, Chapter 18, The science used in the recombinant DNA technology industry, s.231, Scientific American Inc, New York (1983).
12. Wu R (ed): *Recombinant DNA*, Methods in Enzymology, vol.68, Academic Press, New York (1979).