Acta Pharmaceutica Turcica Vol. XXXI. 1989

BİOSENTETİK İNSAN İNSULİNİ

AYŞE CAN, NURİYE AKEV
İstanbul Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Biokimya Anabilim Dalı

Şeker hastalığı (diabetes mellitus) yaygın olaıak görülen ve kontrol altına alınamadığı takdirde çok ciddi sonuçlara yol açabilen bir hastalıktır. Bu hastalık eski çağlardan beri bilindiği halde, eksikliği şeker hastalığına neden olan insulinin keşfi ancak içinde bulunduğumuz yüzyılda gerçekleştirilmiştir. Minkowski ve von Mering'in öncü çalışmalarından sonra (1, 2), Banting ve Best insulini köpek pankreasından elde etmeyi başarmışlardır (2-4). Sanger'in insulinin yapısını aydınlatmasını (5) izleyen yıllarda, insulini sentetik olarak elde etme çabaları hızlanmış ve insulinin total sentezi Sieber ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiştir (6-8).

Daha çok gençlerde görülen insuline bağımlı diabette hastalar, pankreaslarında insulin biosentezi yapılmadığı için yaşam boyu insulin kullanmak zorundadırlar. Çoğunlukla yetişkinlerde rastlanan ve insuline bağımlı olmayan diabette ise, hastalar uygun bir diyet ve/veya ilâçla tedaviye yanıt verirler.

İnsuline bağımlı diabetiklerin tedavisinde kullanılan hayvansal kaynaklı insulin preparatlarının birincil yapıları insan insulininkinden farklıdır. Bilindiği gibi, gerek insan, gerek hayvan insulinleri, birbirlerine disülfür bağları ile bağlanmış sırasıyla biri 21 (A zinciri), diğeri 30 (B zinciri) amino asid içeren iki polipeptid zincirinden oluşurlar. Tedavide en çok kullanılan sığır ve domuz insulinlerinde, sığır insulininde A zincirinin sekizinci ve onuncu B zincirinin otuzuncu amino asidi insan insulininkinden farklıdır (Tablo 1).

amino asidleri, domuz insulininde ise sadece B zincirinin otuzuncu

İnsulin	A zinciri		B zinciri
	A_8	A_{10}	B_{30}
İnsan	Treonin	İzolösin	Treonin
Domuz	Treonin	İzolösin	Alanin
Sığır	Alanin	Valin	Alanin

Tablo 1. İnsulin türleri arasındaki farklar (9).

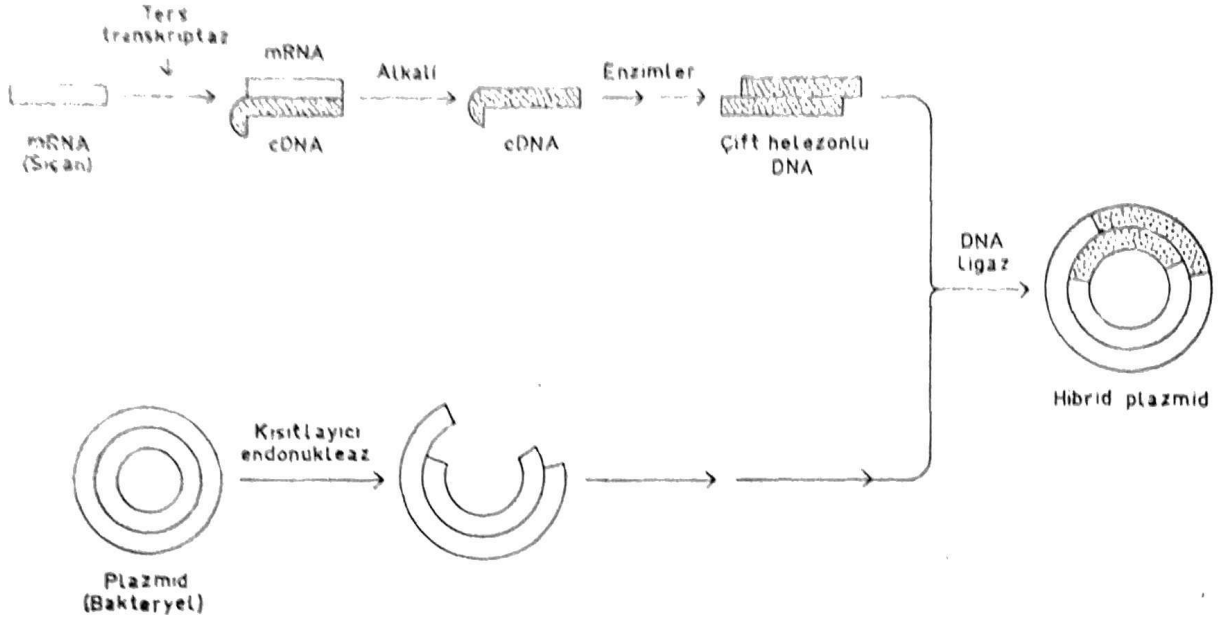
Söz konusu farklılıklar, hayvansal kökenli insulin preparatları insana verildiği zaman organizma kendi insulinine uymayan bu yabancı insulinlere karşı uzun kullanım sonucunda antikorlar geliştirdiği için, insulin allerjisi, insuline direnç gibi komplikasyonların ortaya çıkmasına neden olur. Bundan dolayı insan insulininin ticari preparatları, yapısı kendisine en yakın olan domuz insulininin B zincirinin karboksil ucunda bulunan alaninin treonin ile yer değiştirmesi sonucunda elde edilir (10). Ancak hormonun bu şekilde üretimi için gereken domuz pankreasının bir gün yeterli miktarda bulunamayacağı endişesi, insulin üretiminde hayvansal kaynaklara bağımlı olmayan yeni yöntemlerin araştırılmasına yol açmış ve bunun sonucunda biosentetik insulin hazırlanmıştır.

Herhangi bir biosentetik proteinin elde edilmesinde, protein biosentezi için gerekli bilgileri içeren ve başka bir kaynaktan elde edilen genler bakteri hücrelerinin genlerinin arasına yerleştirilir. Bu suretle oluşan ve **rekombinant bakteriler** adı verilen bakteriler, istenen proteinin sentezini gerçekleştirirler. Sonsuza kadar üretilebilecek olan bu bakterilerle, biolojik açıdan önemli bir proteinin ucuz ve kolay şekilde üretilmesi sağlanmış olur (11). Bu amaçla önce, istenen proteinin amino asid dizilişinin genetik kodunu (nukleotid bazlarının dizilişini) içeren gen kısmı (DNA parçası)'nın elde edilmesi gerekir. Bunun için iki yöntem vardır; birinde (12, 13), istenen proteinin biosentezinin yapıldığı hücreden çeşitli kromatografik yöntemlerle saflaştırılan haberci RNA (messenger, mRNA)'e karşı in vitro olarak, ters transkriptaz adı verilen enzimin katalize ettiği reaksiyonla, tamamlayıcı DNA (complementary, cDNA) elde edildikten sonra kalıp ödevini gören bu cDNA enzimatik olarak çift helezonlu DNA'e dönüştürülür (Şekil 1). Diğer bir yöntemde ise (14, 15), istenen proteinin amino asid dizilişini kodc eden üçlü baz grubunu içeren nukleotid kısımları kimyasal reaksiyonlarla sentez edildikten sonra, bu nukleotidlerin fosfotriester yöntemiyle yanyana dizilmeleri sağlanarak proteinin geni tümüyle sentetik olarak elde edilebilir.

Yukarıdaki yöntemlerden biri ile hazırlanan DNA, bakteriden izole edilmiş küçük bir DNA çemberi olan plazmid'in arasına yerleştirilir. Bu işleme klonaj adı verilir. Klonaj için önce plazmid, kısıtlayıcı (restriksiyon) endonukleazlar kullanılarak, uygun bir bölgeden yarılır. Oluşan aralığa DNA parçası, yine enzimatik olarak yerleştirilir. Söz konusu DNA'in uçlarının plazmid DNA'in uçları ile kaynaşması ise DNA ligaz adlı enzim tarafından sağlanır. Bu şekilde oluşan hibrid plazmid kendi DNA'inin yanında biosentezi istenen proteini kode eden DNA'i içerir (Şekil 1). Daha sonraki basamakta hibrid plazmidlerin bakteri, genellikle Escherchia coli, hücrelerinin içine girmesi sağlanır. Böylece bakteri çoğaldıkça kendi proteinleri yanında istenen proteini de sentez etmeye başlar. Şekil 1'de gösterilen sıçan insulininin klonaj işlemi ile elde edilmesi (12) insan insulininin biosentezi için de uygulanmıştır (13). Tümüyle sentetik DNA'in E. coli plazmidine klonajı, ilk olarak somatostatin adlı hormonda (14) ve daha sonra da insan insulinininde (15, 16) gerçekleştirilmiştir.

Rekombinant bakteri yöntemiyle üretilen biosentetik insulin ilk kez 1980 yılında insana uygulanmış. adı geçen insulinin domuz insulini ile benzer etki gösterdiği saptanmıştır (17). Daha sonraki yıllarda yapılan çeşitli araştırmalarda da biosentetik insan insulini ile domuz insulini (18-27), sığır insulini (28) ve insan pankreasından elde edilen doğal insulin (18, 25-27, 29) arasındaki farkların çok önemli olmadığı görülmüştür. Bu çalışmalar sırasında gerek sağlıklı gönüllüler, gerek diabetikler üzerinde yapılan kimyasal, fiziksel ve biolojik incelemelerin ışığı altında. biosentetik insan insulini ile doğal insan insulini ve domuz insulininini hemen hemen eşdeğer oldukları söylenebilir (30).

Biosentetik insan insulininin bakteri tarafından büyük miktarlarda üretilmesi, rekombinant DNA yönteminin, saflaştırılması zor ve pahalı olan doğal ürünlerin yeterli miktarda elde edilmesinde başarı ile kullanılabileceğini kanıtlamıştır. Bununla beraber, Dünya Sağlık Teşkilâtı raporlarında bildirildiği gibi (31), yakın bir gelecekte hayvansal insulin kaynaklarının tüketilebileceğine yönelik bir tehlike bulunmadığına göre, üretimi hayvansal kaynaklara bağlı olmayan biosentetik insulinin şeker hastalığının tedavisinde büyük bir çığır açacağı düşünülmemektedir.



Şekil 1. Sıçan insulini mRNA'inden elde edilen cDNA'in E. coli plazmidinin arasına yerleştirilmesi (klonaj) (Kaynak 12'den değiştirilerek).

Kaynaklar

1. Von Mering, J., Minkowski, O. : Arch. f. exper. Pat. u. Pharm., 26, 371 (1889-1890). —Ref : Best, C.H., Diabetes, 11, 495 (1962).
2. Frank, E. : Karbonhidrat Metabolizması Patolojisi, 1-9, Mazlum Kitabevi, İstanbul, 1949.
3. Banting, F.G., Best, C.H. : J. Lab. Clin. Med., 7, 251 (1922). —Ref : Best. C.H. : Diabetes, 11, 495 (1962).
4. Galton, M. : Diabetes (A Monograph on Diabetes Mellitus), 96, The Upjohn Company, Kalamazoo, Michigan (1963).
5. Sanger, F. : Brit. Med. Bull., 16, 183 (1960).
6. Sieber, P., Kamber, B., Hartman, A. et al. : Helvetica Chimica Acta, 57, 2617 (1974).
7. Sieber, P., Kamber, B., Eisler, K. et al. : Helvetica Chimica Acta, 59, 1489 (1976).
8. Sieber, P., Kamber, B., Hartmann, A. et al. : Helvetica Chimica Acta, 60, 27 (1977)
9. Johansen, K. : Metabolism, 32, 528 (1983).
10. Morihara, K., Oka, T., Tsuzuki, H. : Nature, 280, 412 (1979).
11. Gilbert, W., Villa-Komaroff, L. : Scientific American, 242, 68 (April 1980).
12. Ullrich, A., Shine, J., Chirgwin, J. et al. : Science, 196, 1313 (1977).
13. Goeddel, D.V., Gray, A., Ullrich, A. : Science, 208, 57 (1980).
14. Itakura, K., Hirose, T., Crea, R. et al. : Science, 198, 1056 (1977).
15. Crea, R., Kraszewski, A., Hirose, T., Itakura, K. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75, 5765 (1978).

16. Goeddel, D.V., Kleid, D.G., Bolivar, F. et al. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 106 (1979).
17. Keen, H., Glynne, A., Pickup, J.C. et al. : Lancet II, 398 (1980).
18. Chance, R.E., Kroeff, E.P., Hoffmann, J.A., Frank, B.H. : Diabetes Care, 4, 147 (1981).
19. Raptis, S., Karaiskos, C., Enzmann, F. et al. : Diabetes Care, 4, 155 (1981).
20. Massi-Benedetti, M., Burrin, J.M., Capaldo, B., Alberti, K.G.M.M. : Diabetes Care, 4, 163 (1981).
21. Bottermann, P., Gyaram, H., Wahl, K. et al. : Diabetes Care, 4, 168 (1981).
22. Viberti, G.C., Pickup, J.C., Keen, H. et al. : Diabetes Care, 4, 175 (1981).
23. Weinges, K., Ehrhardt, M., Enzmann, F., : Diabetes Care, 4, 180 (1981).
24. Galloway, J.A., Spradlin, C.T., Root, M.A., Fineberg, S.E. : Diabetes Care, 4, 183 (1981).
25. Bauman, W.A., Yalow, R.S. : Diabetes, 30, 265 (1981).
26. Fehlmann, M., Le Marchand-Brustel, Y., Dolais-Kitabgi, J. et al. : Diabetes Care, 4, 223 (1981).
27. Fussgaenger, R.D., Ditschuneit, H.H., Martini, H. et al. : Diabetes Care, 4, 228 (1981).
28. Cavallo-Perin, P., Bruno, A., Dallomo, A.M. et al. : Curr. Ther. Res. 38, 287 (1985). —Ref : C.A., 103, 135664k (1985).
29. Waldhaeusl, W.K., Kastner, G., Komjati, M., Bratusch-Marrain, P. : Diabetes Care, 4, 205 (1981).
30. Wagner, W.-H. : Drugs Made in Germany, 25, 139 (1982).
31. WHO Expert Committee on Diabetes Mellitus, World Health Organization, technical report series : 646 (1980). —Ref : Johansen, K. : Metabolism, 32, 528 (1983).

Received 27.3.1989