

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİSİ

Şirin FIRİDİN

Biyolog
Genetik Bölümü

Moleküler genetik araştırma tekniklerinin gelişmesi araştırmacılara farklı kaynaklardan yani organizmalardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro*'da birleştirilebilme olanağı sağlamıştır. Farklı kaynaklardan gelen moleküllerin birleştirilmesi ile oluşan DNA moleküllerine rekombinant DNA denir. doğada kendiliğinden oluşması mümkün olmayan, çoğunlukla farklı biyolojik türlerden elde edilen DNA moleküllerinin, genetik mühendislik teknolojisiyle kesilmesine ve elde edilen farklı DNA parçalarının birleştirilmesi işlemlerini kapsayan bir teknolojidir. Rekombinant DNA ise; bu işlem sonucu üretilmiş olan yeni DNA molekülüne verilen isimdir ve kısaca rDNA olarak yazılır.

Rekombinant DNA üzerinde restriksiyon endonükleaz analizleri, DNA dizileme ve yönlendirilmiş mutasyon gibi genetik analiz ve manipulasyonlar gerçekleştirilebilir. Bütün bu işlemleri yapmak için kullanılan tekniklerin tamamına rekombinant DNA teknolojisi denir. Bu teknik genetik mühendisliği olarak da adlandırılır.

Bu alanda yapılan işlemler, kısaca genlerin herhangi bir organizmadan alınarak üretilmesi (klonlama) ve üretilen genlerin gerek temel, gerekse uygulamalı araştırmalar için kullanılması olarak özetlenebilir. Bu teknoloji bugün temel bilimler, tıp, endüstri, hayvancılık, ziraat, çevre mühendisliği gibi alanlarda yaygın bir biçimde kullanılmaya başlamıştır.

Bu teknolojinin bilimsel temeli olan çeşitlenme (rekombinasyon) genetik bir olaydır ve doğada canlılar arasında görülen çeşitliliğin önemli nedenlerinden birini oluşturur. Rekombinasyon; farklı genotipteki bireyler arasında eşleşmeler söz konusu olduğunda, ana-babaya ait kalıtsal özelliklerin dölde değişik gruplanmalar halinde bir araya gelmesine yol açan olaylar dizisidir. Bu olay moleküler düzeyde, farklı nükleotid dizilerine sahip iki DNA molekülünün homolog gösteren bölgeleri arasındaki parça alış-verişi sonucunda meydana gelen yeni gruplamalardır. Bunun için DNA molekülleri arasında kırılmalar meydana gelir ve kırılma bölgelerinde DNA

molekülleri arasında parça alışverişi oluşur. Sonuçta orijinal durumdaki DNA moleküllerine tam olarak benzemeyen ve onlara ait nükleotid dizilerini kısmen taşıyan *rekombinant DNA molekülleri* oluşur.

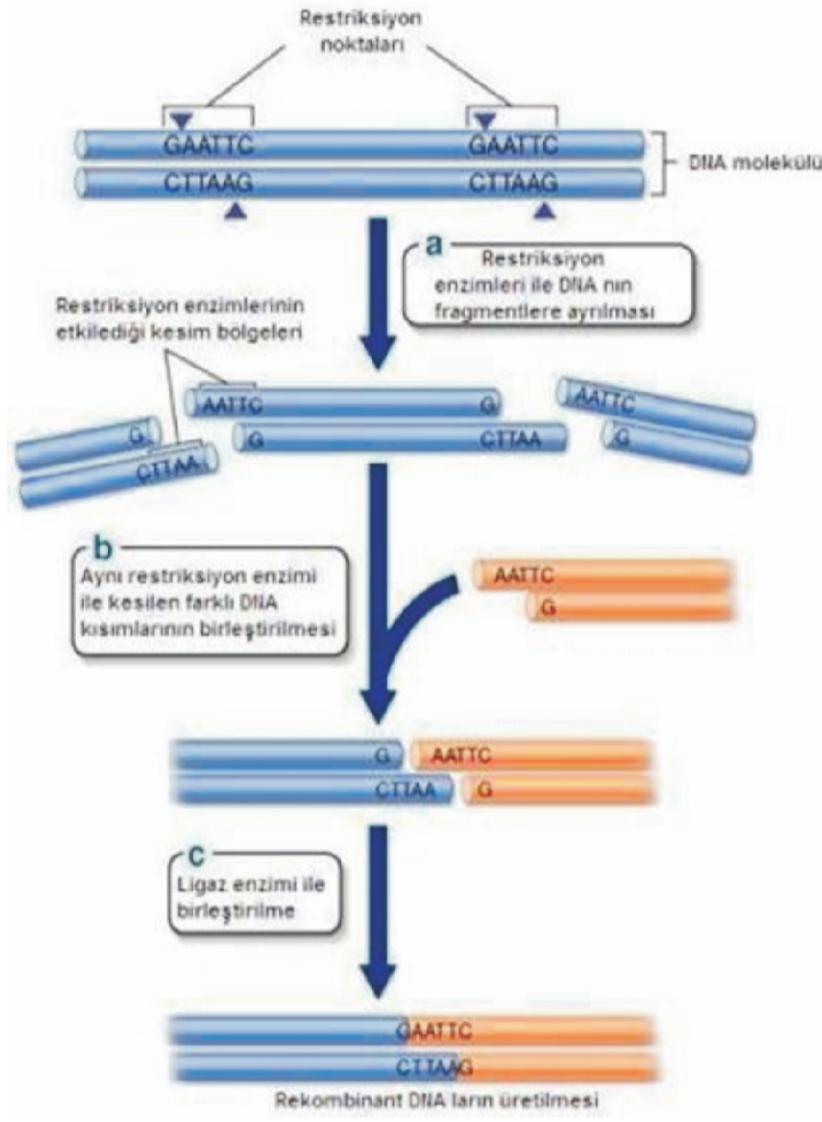
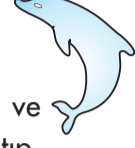
Homolog çeşitlenme (rekombinasyon), eşeyli üremeye genelde mayoz bölünmedeki kromozomal parça değişimi sonucunda meydana gelir. Bakterilerde çeşitlenme farklı işleyişlerle, transformasyon konjugasyon ve transdüksiyon olaylarıyla görülür.

Bu olayların hepsinin temeli DNA molekülleri arasında homolog olması dayanmaktadır. Bu yüzden doğada çeşitlenme, aynı türe ait bireyler arasında ya da çok yakın türler arasında kısıtlıdır. Farklı türler arasında var olan çeşitli düzeydeki eşleşme engelleri farklı türlere ait bireyler arasında genetik bilgi aktarımına, dolayısıyla da rekombinasyona olanak sağlamamaktadır.

Rekombinant DNA teknolojisinin tanımı ve kapsamı çeşitli toplumlara ya da bilim insanlarına göre farklılıklar göstermektedir. Bununla birlikte, bu değişik tanımlar arasında hepsindeki ortak yönleri birleştiren, oldukça geniş ve günümüzün modern ölçütlerine uygun bir tanım şu şekilde yapılabilir: Rekombinant DNA teknolojisi, bir canlıdan herhangi bir yolla yalıtılan bir genin uygun bir konağın içerisine sokularak orada çoğaltılmasını ve bazen de ifade edilmesini amaçlayan çalışmalar ait tekniklerin toplamıdır.

Belirli bir amaç için doğrudan genetik materyal üzerinde yapılan bu teknolojiyle, *in vitro* şartlarda genetik materyalde planlı değişiklikler yapılabilen, istenilen genlerin istenilen canlıya sokularak, doğal biçimde bulunmadığı bu konakta çoğaltılması ve istenilen ürünü vermesi için nakledilen genin ifadesi sağlanabilmektedir. Bu teknolojiyle, prokaryotik ve ökaryotik gruplara ait türlerin kendi aralarında olduğu kadar, gruplar arasında da gen aktarımları yapmak ve çeşitlilikler meydana getirmek mümkün olmaktadır.. Transgenik hayvanlar kendi genomunda başka bir organizmaya ait rekombinant bir geni taşıyan hayvanlar olarak tanımlanmaktadır.





Rekombinant DNA teknolojisindeki süratli gelişme gen aktiviteleri ile ilgili çalışmalar yapmak için yeni fırsatlar ortaya çıkarmıştır. Bununla birlikte moleküler biyoloji ve genetik mühendisliği alanında yapılan çalışmalarda, gen aktarım teknolojilerinin önemi gün geçtikçe artmaktadır. Çiftlik hayvanlarına gen transferi; elde edilen yavru sayısı, süt miktarı, yapağı miktar ve kalitesi, yemden yararlanma kabiliyeti ve hastalıklara direncin yükseltilmesi amacı ile yapılmaktadır. Önemli bir diğer hedef ise transgenik hayvanların organ vericisi haline getirilmesidir.

Rekombinant DNA tekniği geliştirildiğinde, sadece genlerin organizasyonu, düzenlenmesi ve mutasyonlar gibi, temeli akademik çalışmalara dayanan araştırmalar için kullanılırdı. Bilim adamları, bu teknolojiye yararlanarak endüstriyel

uygulamasını da bulmuşlar ve bugün biyoteknoloji adı altında tıp, kozmetik ve tarım gibi farklı alanlarda da ekonomiye milyarlarca liralık katkısı ile önemli bir endüstri doğmuştur.

Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak bir genin klonlanması 4 aşamada gerçekleştirilebilir. Gen klonlanması ise şöyle tanımlanabilir: Önemli bir ürünün yani hedef DNA bölgesinin bir vektör ile birleştirilerek özel konak hücreler içinde çok sayıda kopyasını elde etme işlemidir.

1) Gen izolasyonu

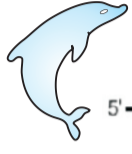
a) mRNA'sından komplementer DNA (cDNA)nın sentezlenmesi,

B) Gen kütüphanelerinin kullanılması: Aranılan genin etiketli kopyası ya da etiketli mRNA'sı elde mevcutsa tüm genomu parça parça içeren klonlar arasından aranılan geni içeren klon tespit edilip, bol miktarda gen izolasyonunda kullanılabilir.

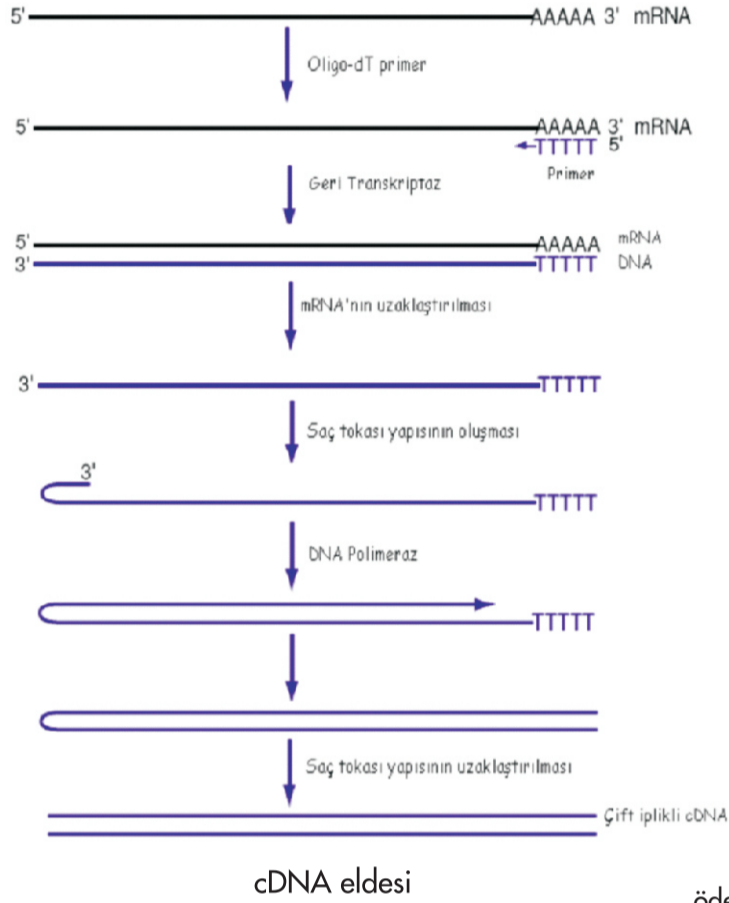
2) Uygun gen taşıma aracı (Vektör)

a) Plazmitler: Konak E.coli hücresi içerisinde çoklu kopyaları bulunan 2kb-200kb ebatlı küçük kromozomdan ayrı olarak bulunan dairesel moleküllerdir. En çok kullanılan pBR322 plazmiti Ampisilin ve Tetrasiklin antibiyotiklerine direnç bölgeleri içerir. Pek çok restriksiyon enzimi için tek bir kesme yerine sahip olup, 6000 bp'e kadar yabancı DNA parçaları taşıyabilir.

b) Virüsler: 1978'de yapılan Asimolar konferansında en az tehlikeli ve en çok incelenmiş virüs olarak λ -fajı kullanılmaya karar verilmiştir. λ DNA'sı 49 kb boyunda çift iplikli bir moleküldür. Her iki ucunda birbirlerine komplementer 12 nükleotitik tek iplikli zincirlere sahiptir. Bu uçlara "cos" (cohesive = yapışkan) uçlar denir. İnfekte olmuş hücrede DNA'ları cos bölgelerinden birbirine bağlı peşpeşe DNA zincirleri halinde sentezlenir ve sonra faj halinde paketlenirler.



DNA Teknolojisi



c) Cosmidler: Plazmit ve fajların kullanışlı özelliklerini bünyesinde toplayan melez bir vektördür. 35 000 - 45 000 bp'ye kadar DNA parçalarını klonlamada kullanılabilir. λ fajını paketleyen enzimlerin "cos" bölgelerini tanımasından yararlanır. λ fajının "cos" bölgeleri örneğin pBR322'nin tet^r geni içine klonlanır. Amp^r geni sağlam kalır. Yabancı DNA nispeten büyük parçalara kesilip herbiri (biraz şans ile) "cos" bölge plazmit ile birleştirilir. Bakteriler ekilerek ampisiline dirençli, tetrasikline duyarlı olanlar seçilir.

d) Ekspresyon vektörleri: Yabancı genin ekleneceği bölgenin önünde tercihli bir promoter bölge içeren yapay plazmitlerdir. Klon edilecek genin ürünü olan proteinin sentezlenmesi arzu ediliyorsa ekspresyon vektörleri kullanılır.

3) Genin hücreye sokulması

a) Plasmid ya da virüslerle,

b) Kimyasal yöntemle: Ca₃(PO₄)₂ kullanılarak DNA'yı tuzakladıktan sonra seçici bir ortamda (\pm tk geni ile seçerek),

c) Fiziksel yöntem: Hücre çekirdeğine sokulacak cam (ya da plastik) mikropipetlerle (uçları 0,1 - 0,5 mikron olmalı) DNA injeksiyonudur.

Bu yöntemle herhangi bir DNA parçası herhangi

bir hücreye direkt olarak sokulabilir.

d) Füzyon ile: Lipozomlar ya da eritrosit hayaletler (içlerindeki hemoglobin ve diğer proteinler boşaltılmış, bütünlüğü korunmuş eritrosit membranları) kullanılarak içerdikleri DNA'nın hücre erimesi yöntemiyle diğer bir hücre ile birleştirilmesi yöntemidir. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı

4) Geni içeren hücrenin seçimi

a) Antibiyotiklere dirençlilik,

b) Seçici ortamlar (örneğin HAT: Hipoksantin, Aminopterin ve Timin) ortamında tk- hücreler üreyemez. Çünkü Aminopterin, dCTP \rightarrow dTDP yolunu bloke eder.

Yabancı geni içeren hücre seçildikten sonra uygun koşullarda saklanabilir ya da arzu edildiğinde adı geçen geni üreten bir fabrika gibi kullanılabilir. Günümüzde değerli proteinlerin genleri (insülin, büyüme hormonu vb.) ekspresyon vektörlerine klon edilmiş olarak mevcuttur. Hatta çeşitli firmalardan ücreti ödenerek temin edilebilir.

Rekombinant DNA teknolojisi uygulamaları özellikle genetik mühendisliği ve biyoteknolojide kullanılmaktadır. Dünya nüfusunun %3-5'nin genellikle tedavi olanağı bulmayan kalıtsal hastalıklardan etkilendiği bilinmektedir. Bu alandaki en büyük ümit ve beklenti genetik bozuklukların gen aktarımı yöntemleriyle düzeltilmesi ya da etkin tedavi yöntemlerinin geliştirilmesidir. Kısa zamanda çok geniş bir uygulama alanı bulan bu yöntemin gerçek değeri önümüzdeki yıllarda çok daha iyi anlaşılacaktır.

KAYNAKLAR

Ekici, A., Timur, M. ve Bağış, H., 2006. Transgenik canlılar ve aküakültürdeki önemi. E Ü Su Ürünleri Dergisi, 23: 211-214.

Ekinci, M.S., Akyol, İ., Karaman, M. ve Ozkose, E., 2005. Hayvansal biyoteknoloji uygulamalarında güncel gelişmeler. KSÜ Fen ve Mühendislik Dergisi, 8: 89-95.

Karakaya, H., ? . Moleküler Genetik. İstanbul Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı-Biyofizik Ders Notları

Beldüz, A.O. 2008 yılı Moleküler Biyoloji Ders Notları

Wikipedia.org

