İçindekiler

Yazarlar Hakkında vii **Önsöz** viii



BÖLÜM 1
Biyoteknoloji Yüzyılı ve İşgücü 1

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

1.1 Biyoteknoloji Nedir ve Sizin İçin Ne Anlam İçermektedir? 2
Biyoteknolojinin Kısa Tarihçesi 3
Biyoteknoloji: Çok Disiplinli Bir Bilim 5
Modern Biyoteknoloji Ürünleri 6
Etik ve Biyoteknoloji 8

1.2 Biyoteknoloji Türleri 9
Mikrobiyal Biyoteknoloji 9
Tarımsal Biyoteknoloji 9
Hayvan Biyoteknolojisi 9
Adli Biyoteknoloji 11
Biyoremediyasyon 12
Akuatik Biyoteknoloji 12
Tıbbi Biyoteknoloji 13
Biyoteknoloji Mevzuatı 14
Biyoteknoloji "Genel Çerçeve" 14

1.3 Yirmibirinci Yüzyılın Biyolojik Sorunları 14
Yeni Biyoteknoloji Yüzyılı Nasıl Olacak? 14
Gelecekte Bir Senaryo: İnsan Genom Projesinden Nasıl Yararlanabiliriz? 15

1.4 Biyoteknoloji İşgücü 18
Biyoteknoloji İşletmesi 18
Biyoteknoloji Şirketi Nedir? 18
Biyoteknolojide İş Olanakları 20
Biyoteknolojide Ücretler 23
Biyoteknoloji Endüstrisinde İşe Alma Eğilimleri 24

Sorular ve Etkinlikler 25



BÖLÜM 2
Genler ve Genomlara Giriş 27

Çeviren: Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

2.1 Hücre Yapısının İncelenmesi 28
Prokaryotik Hücreler 28
Ökaryotik Hücreler 28

2.2 Yaşam Molekülü 31
DNA'nın Genetik Kalıtım Materyali Olduğunun Kanıtlanması 31
DNA'nın Yapısı 33
Gen Nedir? 34

2.3 Kromozom Yapısı, DNA Replikasyonu ve Genomlar 34
Kromozomun Yapısı 35

2.4 RNA ve Protein Sentezi 40
Kodu Kopyalama: Transkripsiyon 40
Gen Ekspresyonu Kontrolünün Esasları 46

2.5 Mutasyonlar: Sebepleri ve Sonuçları 50
Mutasyon Tipleri 50

2.6 Epigenomu Açıklamak 55

Sorular ve Etkinlikler 57



BÖLÜM 3
Rekombinant DNA Teknolojisi ve Genomik 58

Çeviren: Fuat ÖZYÖRÜK

3.1 Rekombinant DNA Teknolojisi ve DNA Klonlanmasına Giriş 59
Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri 59
Bakteriyel Hücrelerin Transformasyonu ve Rekombinant Bakterilerde Antibiyotik Seleksiyonu 64
İnsan Geni Klonlanmasına Giriş 65

3.2 İyi Bir Vektör Nasıl Olmalıdır? 66
DNA Klonlama Vektörlerinin Pratik Özellikleri 66
Vektör Tipleri 67

3.3 İlgilenilen Geni Nasıl Tanır ve Klonlarsınız? 69
DNA Kütüphaneleri Oluşturma: Klonlanmış Gen Koleksiyonlarının Derlenmesi 69

3.4 Rekombinant DNA Teknolojisi Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları 74
Agaroz Jel Elektroforezi 75
Gen Yapısı Restriksiyon Haritalaması 76
DNA Dizilemesi 77
Yeni-Nesil Dizileme (NGS) 80
Floresan In Situ Hibridizasyon 82
Southern Blot 82
Gen Ekspresyonu Çalışmaları 84
Northern Blot Analizi 84

3.5 Genomik ve Biyoinformatik: Biyoteknolojinin Popüler Alanları 88
Tüm-Genom "Shotgun" Dizileme 88
Biyoinformatik: Moleküler Biyoloji ve Bilgisayar Teknolojisinin Bileşimi 90
Biyoinformatik Uygulama Örnekleri 90
Destansı Bir Genom Klonlama Çalışması: İnsan Genom Projesi 91
İnsan Genomundan Neler Öğrendik? 92
İnsan Genom Projesi "Omik" Devrimini Başlattı 94
HGP'den 10 Yıl Sonra: Sırada Ne Var? 96

Sorular ve Etkinlikler 98



BÖLÜM 4
Ürün Olarak Proteinler 100

Çeviren: Deniz EKİNCİ

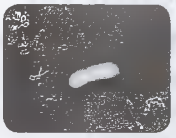
4.1 Biyoteknoloji Ürünü Olarak Proteinler 101
Biyoteknolojik İlaçlar ve Diğer Tıbbi Uygulamaları 103
Gıda İşleme 104
Tekstil ve Giyim 104
Deterjanlar 105
Biyoremediyasyon: Çevre Kirliliğinin Proteinlerle Temizlenmesi 105

4.2 Protein Yapıları 105
Yapısal Düzenlenme 105
Protein Katlanması 106
Glikozilasyon 106
Yönlendirilmiş Moleküler Evrimle Protein Mühendisliği 107

4.3 Protein Üretimi 109
Protein Anlatımı: Akış yukarı (Upstream) Süreç 109
Protein Saflaştırma Yöntemleri: Akış aşağı (Downstream) Süreç 111
Doğrulama 116
Proteinlerin Muhafazası 118
Protein Saflaştırmada Ölçek Büyütme 119
Saflaştırma Sonrası Analiz Yöntemleri 119

4.4 Proteomik 120

Sorular ve Etkinlikler 121



BÖLÜM 5
Mikrobiyal Biyoteknoloji 122

Çevirenler: Deniz EKİNCİ, Ahmet Can OLCAY

5.1 Mikropların Yapısı 123
Mayalar da Önemli Mikroplardır 124

5.2 Araç Olarak Mikroorganizmalar 126
Mikrobiyal Enzimler 126
Bakteri Transformasyonu 126
Klonlama ve Ekspresyon Yöntemleri 128

5.3 Çeşitli Günlük Uygulamalarda Mikropların Kullanılması 131
Gıda Ürünleri 131
Terapötik Proteinler 133
Mikropların Diğer Mikroplara Karşı Kullanılması 135

5.4 Aşılar 137
Antikorlar Hakkında Temel Bilgiler 138
Aşı Türleri: Aşılar Nasıl Üretilir? 140
Aşılar İçin Bakteriyel ve Viral Hedefler 142

5.5 Mikrobiyal Genomlar 144
Mikrobiyal Genomlar Niçin Dizilenir? 144
Bugüne Kadar Dizilenmiş Önemli Genomlar 144
Metagenomik Çalışmaları Mikrobiyal Toplulukların Genomlarını Diziler 146
Viral Genomik 147
Yapay Genomlar Yaratmak: Bir Bakteri Suşuna Ait İşlevsel Yapay Genom Üretildi 147

5.6 Biyoyakıt Üretimi için Mikroplar 149

5.7 Mikrobiyal Tanılama 150
Bakteriyel Belirleme Stratejileri 150
Hastalık Yapan Mikroorganizmaların İzlenmesi 150
Bulaşıcı Hastalıkların İzlenmesinde Mikrodizinler 151

5.8 Biyoterörizmle Savaşım 151
Biyosilah Olarak Mikroplar 152
Biyoterörizmin Hedefleri 153
Biyosilahlara Karşı Biyoteknolojinin Kullanımı 154

Sorular ve Etkinlikler 156



BÖLÜM 6
Bitki Biyoteknolojisi 158

Çevirenler: Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU, Ahmet YILDIRIM

6.1 Tarımın Geleceği: Transgenik Bitkiler 159

6.2 Bitki Transgenetiğinde Kullanılan Yöntemler 160
Klasik Seleksiyon Islahı ve Melezleme 160
Klonlama: Tek Hücreden Bitki Üretimi 161
Antisens Teknolojisi 163
Gen Susturma: Antisens Teknolojisine Bir Alternatif 165

6.3 Pratik Uygulamalar 165
Bitkiler İçin Aşılar 165
Genetik Pestisitler 166
Herbisit Dayanıklılığı 166
Artırılmış Besin Değeri 168
Bitki Biyoteknolojisinin Eczacılıktaki Geleceği 169
Bitki Biyoteknolojisinin Geleceği: Yakıtlar 169

6.4 Sağlık ve Çevre Kaygıları 171
İnsan Sağlığıyla İlgili Kaygılar 172
Çevre Konusunda Kaygılar 172
Yasal Düzenlemeler 173
Sorular ve Etkinlikler 174



BÖLÜM 7
Hayvan Biyoteknolojisi 175

Çeviren: Zihni DEMİRBAĞ

7.1 Araştırmada Hayvanlar 176
Araştırmalarda Niçin Hayvanlar Kullanılır? 176
Araştırmalarda Kullanılan Hayvan Türleri 177
Hayvan Araştırmalarındaki Yasal Düzenlemeler 178
Hayvanların Kullanımına Alternatifler 178
Hayvan Araştırmaları Mevzuatı 179
Veterinerlik: İnsan ve Hayvanlara Faydaları 179

7.2 Klonlama 180
Dolly'i Oluşturmak: Klonlamada Büyük Hamle 180
Klonlamanın Sınırları 180
Klonlamanın Geleceği 182

7.3 Transgenik Hayvanlar 183
Transgenik Teknikleri 183
Tarımsal Üretimin Transgeniklerle Artırılması 184
Biyoreaktörler Olarak Transgenik Hayvanlar 186
Nakavtlar: Transgeniklerin Özel Bir Durumu 187

7.4 İnsan Antikorlarının Hayvanlarda Üretilmeleri 189
Monoklonal Antikorlar 189
Sorular ve Etkinlikle 192



BÖLÜM 8
DNA Parmakizi ve Adli Analizler 193

Çeviren: Zihni DEMİRBAĞ

8.1 DNA Parmakizi Nedir? 194
DNA Tiplendirmesi Nasıl Gerçekleştirilir? 195

8.2 DNA Parmakizinin Hazırlanması 196
Örneklerin Toplanması 196
Analiz için DNA'nın Elde Edilmesi 197
PCR ve DNA'nın Çoğaltılması 197
STR Analizi 197

8.3 DNA'nın Kullanıma Sunulması 198
Narborough Köyü Cinayeti DNA Ayrıştırmada Yeni Bir Yöntemin Geliştirilmesine Yol Açtı 98
Görgü Tanığı İfadesi DNA Testinden Daha mı Güvenilir? 199
Dünyadaki Olaylar Yeni Teknolojilerin Gelişmesine Yol Açar 200

8.4 DNA ve Delil Kuralları 201
DNA Parmakizi ve Deliller Zinciri 202
İnsan Hatası ve Bulaşma Kaynakları 202
DNA ve Jüri Heyeti 203

8.5 Ailesel Yakınlıklar ve DNA Profilleri 203
Mitokondriyal DNA Analizi 203
Y-Kromozomu Analizi 204

8.6 İnsana Ait Olmayan DNA Analizi 205
Bitkilerin DNA ile Kimliklendirilmeleri 205
Hayvan DNA'sı Analizi 206
Dolandırıcılığın DNA ile İzlenmesi 206
Sorular ve Etkinlikler 207



BÖLÜM 9
Biyoremediyasyon 209

Çevirenler: Abdullah Tahir BAYRAÇ, Ahmet YILDIRIM

9.1 Biyoremediyasyon Nedir? 210
Biyoremediyasyon Niçin Önemlidir? 210

9.2 Biyoremediyasyonun Temel Öğeleri 211
Temizlenmesi Gereken Şey Nedir? 211
Çevredeki Kimyasallar 212
Temizleme Reaksiyonlarının Temel Prensipleri 213
Aktörler: Metabolize Edici Mikroplar 214
Biyoremediyasyon GenomikProgramları 216

9.3 Temizleme Alanları ve Stratejileri 218
Toprağın Temizlenmesi 218
Suyun Biyoremediyasyonu 220
Atıkları Enerjiye Dönüştürmek 222

9.4 Genetik Olarak Değiştirilmiş Organizmalarla Çevre Temizliği 223
Petrol-Yiyen Bakteriler 224
Ağır Metal Temizliği İçin *E. coli* Tasarlamak 224
Biyosensörler 225
Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Biyoremediyasyon 225

9.5 Çevresel Felaketler: Biyoremediyasonda Örnek Olaylar 226
Exxon Valdez Petrol Sızıntısı 227
Kuveyt Petrol Yatakları 228
Deepwater Horizon Petrol Sızıntısı 228

9.6 Zorlu Biyoremediyasyonlar 230
Değerli Metallerin Geri Kazanılması 230
Radyoaktif Atıkların Biyoremediyasyonu 230
Sorular ve Etkinlikler 232



BÖLÜM 10
Akuatik Biyoteknoloji 234

Çevirenler: Deniz EKİNCİ, Mehmet YAZICIOĞLU

10.1 Akuatik Biyoteknolojiye Giriş 235

10.2 Akuakültür: Dünya Gıda Arzının Biyoteknolojiyle Artırılması 235
Akuakültür Ekonomisi 236
Balık Yetiştiriciliği Uygulamaları 238
Akuakültür İçin Tür Geliştirme 241
Deniz Ürünlerinin Kalite ve Güvenliğinin Artırılması 241
Akuakültürde Engeller ve Kısıtlamalar 242
Akuakültürün Geleceği 243

10.3 Genetik Teknolojiler ve Akuatik Organizmalar 245
Yeni Genlerin Keşfi ve Klonlanması 245
Balıkların ve Kabuklu Deniz Canlılarının Genetik Manipülasyonu 249

10.4 Akuatik Biyoteknolojinin Tıbbi Uygulamaları 253
Denizden İlaç İzole Etmek İçin Yapılan Biyoaraştırmalar 254

10.5 Tıbbi Olmayan Ürünler 257
Ürünlerden Bir Derleme 257
Biyokütle ve Biyoişleme 257

10.6 Akuatik Biyoteknolojinin Çevresel Uygulamaları 258
Kirlenme Önleyici Maddeler 258
Biyosensörler 259
Çevresel Remediyasyon 259
Sorular ve Etkinlikler 261



BÖLÜM 11
Tıbbi Biyoteknoloji 263

Çeviren: Derya ÖZYÖRÜK

11.1 Moleküler Biyolojinin Gücü: İnsan Hastalıklarının Tanı ve Teşhisinde 264
İnsan Hastalık Modelleri 264
Hastalık Tanısında Biyomarkörler 266
İnsan Genom Projesi İnsan Kromozomlarının Tümündeki Hastalık Genlerini Belirledi 266
Genetik Hastalıkların Saptanması: Kromozom Anormallikleri ve Hatalı Genler İçin Testler 266

11.2 Tıbbi Ürünler ve Biyoteknoloji Uygulamaları 272
Yeni İlaç ve Ecza Ürünleri Arayışı 272
Yapay Kan 277
Aşılar ve Terapötik Antikorlar 279

11.3 Gen Terapisi 280
Nasıl Yapılır? 280
Genetik Hastalıkların Tedavisi: Gen Terapisinde Hedefler 283
Gene Terapisinde Karşılaşılan Zorluklar 286

11.4 Rejeneratif Tıbbın Potansiyeli 287
Hücre ve Doku Nakli 287
Doku Mühendisliği 290
Kök Hücreler 292
Klonlama 299
Terapötik Klonlama ve Reprodüktif Klonlama 299
Amerika Birleşik Devletleri'nde Embriyonik Kök Hücre ve Terapötik Klonlama İle İlgili Düzenlemeler 299
Sorular ve Etkinlikler 305



BÖLÜM 12
Biyoteknoloji Mevzuatı 306

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

12.1 Yasal Çerçeve 307

12.2 ABD Tarım Bakanlığı 308
Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Hizmetleri 308

12.3 Çevre Koruma Dairesi 310
Deneysel Kullanım İzinleri 310
Serbestleştirme ve Ticarileştirme 310

12.4 ABD Gıda ve İlaç Dairesi 311
Gıda ve Gıda Katkı Maddeleri 311
FDA İlaç Onay Süreci 311
İyi Laboratuvar (İLU), Klinik (İKU) ve İmalat (İİU) Uygulamalarının Geliştirilmesi 312
Hızlı İlaç Onayına Karşı Halk Güvenliği 312
Laboratuvar Çalışanlarını Korumak İçin FDA Yasal Düzenlemeleri 313

12.5 Mevzuat ve Düzenlemeler: Devletin Devam Eden Rolü 313
Biyoteknoloji Ürünlerinin Etiketlenmesi 314

12.6 Patent Uygulamaları 314
Patent Edinme 315
Biyoteknoloji Sektöründe Patentlerin Değeri 317

12.7 Uluslararası Biyoteknoloji Yasaları 318
Avrupa Birliği 318
Sorular ve Etkinlikler 319



BÖLÜM 13
Etik ve Biyoteknoloji 321

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

13.1 Etik Nedir? 322
Etik Karar Verme Yaklaşımları 323
Etik Uygulama Canlandırması 324

13.2 Etik ve Biyoteknoloji 325
Hücre ve Ürünleri 325
GD Bitkiler: Ne Yersen O musun? 326
Hayvancılık mı, Hayvanları Değiştirmek mi? 328
Yapay Genomlar ve Yapay Biyoloji 329
İnsanlık Sorusu 329
İnsan Olmak Ne Demektir? 330
Embriyoları Araştırma İçin Ayırmak veya Araştırma İçin Embriyo Oluşturmak 332
İnsan ve Diğer Hayvanlar Herhangi Bir Nedenle Klonlanmalı mı? 332
Hasta Hakları ve Biyolojik Materyaller 334
Genetik Bilgi 334

13.3 Ekonomi, Bilimin Rolü ve İletişim 336

Sorular ve Etkinlikler 339

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

Ek 1 Soruların Cevapları ve Etkinlikler E-1

Ek 2 Proteinlerdeki 20 Amino Asit E-9

Hak Sahiplikleri H-1

Sözlük S-1

Dizin D-1

BÖLÜM

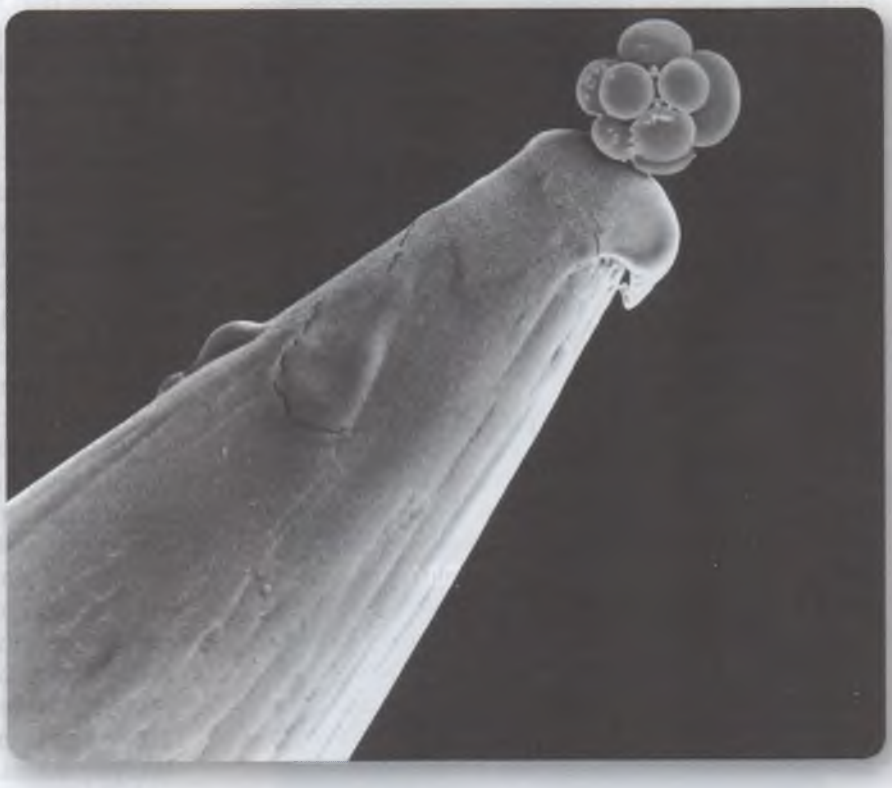
1

Biyoteknoloji Yüzyılı ve İşgücü

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Biyoteknolojiyi tanımlayabilmeli ve ona katkıda bulunan birçok bilimsel disiplini anlayabilmelisiniz.
- Biyoteknoloji ve ürünlerinin tarihsel ve güncel uygulamalarına örnekler verebilmelisiniz.
- Biyoteknolojinin farklı alan ve uygulamalarını sıralayıp, tanımlayabilmelisiniz.
- Biyoteknolojideki potansiyel gelişmelere örnekler verebilmelisiniz.
- Biyoteknoloji sonucunda tıbbi tanılamanın nasıl değişeceğini tartışabilmeli, İnsan Genom Projesinden elde edilen verilerin insan hastalıklarının tanı ve tedavisinde kullanılmasına örnekler verebilmelisiniz.
- Biyoteknolojinin taraf ve karşıtları olduğunu, bu alanda birçok çelişkili durumlar bulunduğunu kavrayabilmelisiniz.
- Biyoteknolojide kariyer kategorileri ve seçenekleriyle, onları keşfetmenin yollarını tanımlayabilmelisiniz.
- Bir biyoteknoloji şirketinde iş sahibi olmak için gerekli özel becerilerin neler olduğunu değerlendirebilmelisiniz.
- Bir biyoteknoloji şirketinin kurulması, finanse edilmesi ve değerinin artırılması için gereken temel öğeleri kavrayarak; tipik bir biyoteknoloji şirketinin organizasyon yapısını tanımlayabilmelisiniz.



Mucize hücreler? Bu iğne ucundaki küçük küme, döllenmeden yaklaşık üç gün sonraki bir insan embriyosudur. Bazı bilim insanları, embriyo içindeki kök hücrelerin insanlardaki bir takım hastalıkları biyoteknoloji aracılığıyla tedavi edip, iyileştirebilecek potansiyelde olduklarına inanmaktadırlar. Bu hücrelerin kullanımı, aynı zamanda biyoteknolojinin en tartışmalı başlıklarındandır.

Bir kez bile olsa mısır gevreği yemişseniz, biyoteknoloji ile etkileşmişsiniz demektir. Gevrek yemez misiniz? Ya krema, yoğurt, peynir veya süt? Bu yüzyılda, yediklerimizin her gün biraz daha fazlası, genetiği biyoteknoloji aracılığı ile değiştirilerek elde edilmiş canlılardan üretilecek. Bu **genetiği değiştirilmiş (GD) gıdalar**, ilk sayfada gösterilen insan embriyosu resmi gibi, son yılların tartışmalı konularının başında gelmektedir. Bu bölüm, sizlere kitap boyunca okuyacağınız inanılmaz çeşitlilikteki biyoteknoloji konularının temel bir tanıtımını yapacak şekilde düzenlenmiştir. İlerleyen sayfalarda göreceğiniz gibi biyoteknoloji, gelecekteki keşifler için birçok uygulama alanı ve büyük potansiyeliyle, multidisipliner bir bilimdir.

Bu bölümde biyoteknolojinin kapsamlı bir tarihsel incelemesi ya da güncel uygulamalarını sunmuyoruz. Bunun yerine, gelecek bölümlerde ayrıntılarıyla tartışılacak birçok başlığın kısa bir tanıtımını yapıyoruz. Biyoteknolojiyi tanımlayarak başlayıp, bu alana katkı sağlayan birçok bilim dalına genel bir bakış sunuyoruz. Hem tarihsel hem de modern uygulamaları vurgulayarak, kitap boyunca işleyeceğiniz biyoteknoloji modellerini tanımlıyoruz. Bölüm sonunda biyoteknoloji işgücünün türlü yönlerini ve bu sektörde çalışmak için sahip olunması gerekli becerileri tartışacağız. Bu bölümde verilen anahtar terimler ve biyoteknolojinin farklı tiplerini iyi öğrenmelisiniz, çünkü bunlar gelecek bölümlerdeki çalışma konularının temelini oluşturmaktadır.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Her bölümün başında yer alan "Geleceği Öngörme" kutucuklarında okuduğunuzda görüleceği gibi, 2001 yılında insan genom dizisinin tamamlanmasından buyana, biyoteknolojideki gelişmeler önemli oranda ilerlemektedir. Önce, genomların nasıl analiz edildiklerini ve biyoteknolojide genomik çalışmaların rolünü göreceğiz (Bölüm 2). Rekombine genlerin hastalık tanı ve tedavisinde yeni yollar yaratmada nasıl bir potansiyele sahip olduklarını (Bölüm 3); ayrıca vücuda uygulanması ve alımı zor ilaçların, nanoparçacıklar içinde verilip zamana bağlı olarak deri yoluyla nasıl alınabileceğini araştıracağız (Bölüm 4). Bakteriler biyoyakıt elde etmede kullanılabilir. Yapay genomların, yeni özellikler taşıyan bakterilerin yaratılmasında nasıl kullanılabileceğini tartışacağız (Bölüm 5). Kar amacı gütmeyen gruplar ve biyoteknoloji şirketlerinin işbirliğinin, transgenik bitkilerin geliştirilmesi ve toplumsal kabulünü nasıl hızlandıracağını tartışacağız (Bölüm 6). Hayvansal biyoteknolojide aşı geliştirmenin, insan ve hayvan sağlık hizmetlerinin maliyetlerini düşürücü rolü olduğunu göreceğiz (Bölüm 7). Hastalıklar, babalık testleri ve güvenlik konuları gibi birçok alanda DNA'nın nasıl kullanıldığını göreceğiz (Bölüm 8). Zehirli maddeleri zararsız yan bileşiklere dönüştürebilen canlıların yaratılması ve diğer biyoremediyasyon teknikleri özellikle 2010'da Meksika Körfezi'ndeki petrol sızıntısının bakteriler kullanılarak temizlenmesiyle büyük dikkat çekmeye başladı. Bu konuyla ilgili gelişmeleri inceleyeceğiz (Bölüm 9). Büyük bölümü suyla kaplı bir gezegende yaşıyoruz. Bu nedenle, su ürünleri biyoteknolojisi de yeni ürünlerin, ilaçların ve yöntemlerin kaynağı haline gelmekte (Bölüm 10). İlaçların vücut içinde ilgili organlara iletilmesindeki yeni uygulamalar da dikkatle okunması gereken konulardan (Bölüm 11). Yeniden düzenlenen yasalar biyoteknolojide yeni keşiflerin onaylanmasını hızlandırmakla birlikte, daha sıkı koruyucu önlemler alınmasını da sağladı (Bölüm 12). Son olarak, etik düşünce ve anlamlı diyalogların biyoteknolojideki ilerlemeler için nasıl bir gereklilik olduğunu göreceğiz (Bölüm 13).

1.1 Biyoteknoloji Nedir ve Sizin İçin Anlamı Nedir?

Hiç Flavr Savr domatesi yediniz mi, monoklonal antikorlarla tedavi edildiniz mi, embriyonik hücrelerden üretilmiş bir doku nakli yaptırdınız mı veya "nakavt" fare gördünüz mü? Hiç grip aşısı oldunuz mu, insülin kullanmak zorunda olan bir şeker hastası tanıyor musunuz, evde hamilelik testi kullandınız mı, bakteri enfeksiyonunu tedavi için antibiyotik kullandınız mı, bir kadeh şarap yudumladınız mı, peynir yediniz mi veya ekmek yaptınız mı? İlk cümlede listelenenleri deneyimlememiş olsanız bile, ikinci listeden en az birini biliyorsunuzdur. Eğer öyleyse biyoteknolojinin yararları konusunda deneyim sahibisiniz.

Hastalıkların olmadığı, herkes için yiyeceğin bol ve kirlilikten uzak bir çevrenin olduğu bir dünya hayal edebilir misiniz? Bu senaryolar, tam da biyoteknoloji sektöründe hayatlarını bu heyecan verici bilime adayan birçok kişinin zihinlerinde canlandırdıkları şeyler. Biyoteknolojinin ilişkili alanlarını ve bunların bilimsel ayrıntılarını tam olarak anlamıyor olsanız bile, biyoteknolojide birinci elden deneyimli sayılırsınız. **Biyoteknoloji**, canlıların veya onların ürünlerinin, insana (veya çevresine) yararlı bir ürün üretmek veya bir problemi çözmek için kullanılması olarak tanımlanır. Bu tanımı hatırda tutun. Biyoteknoloji hakkında daha fazla öğrendikçe, bu tanımı, tarihsel örnekler ve günlük yaşantımızdan modern uygulamalarla genişletip geliştireceğiz ve biyoteknolojinin geleceği hakkında düşüneceğiz.

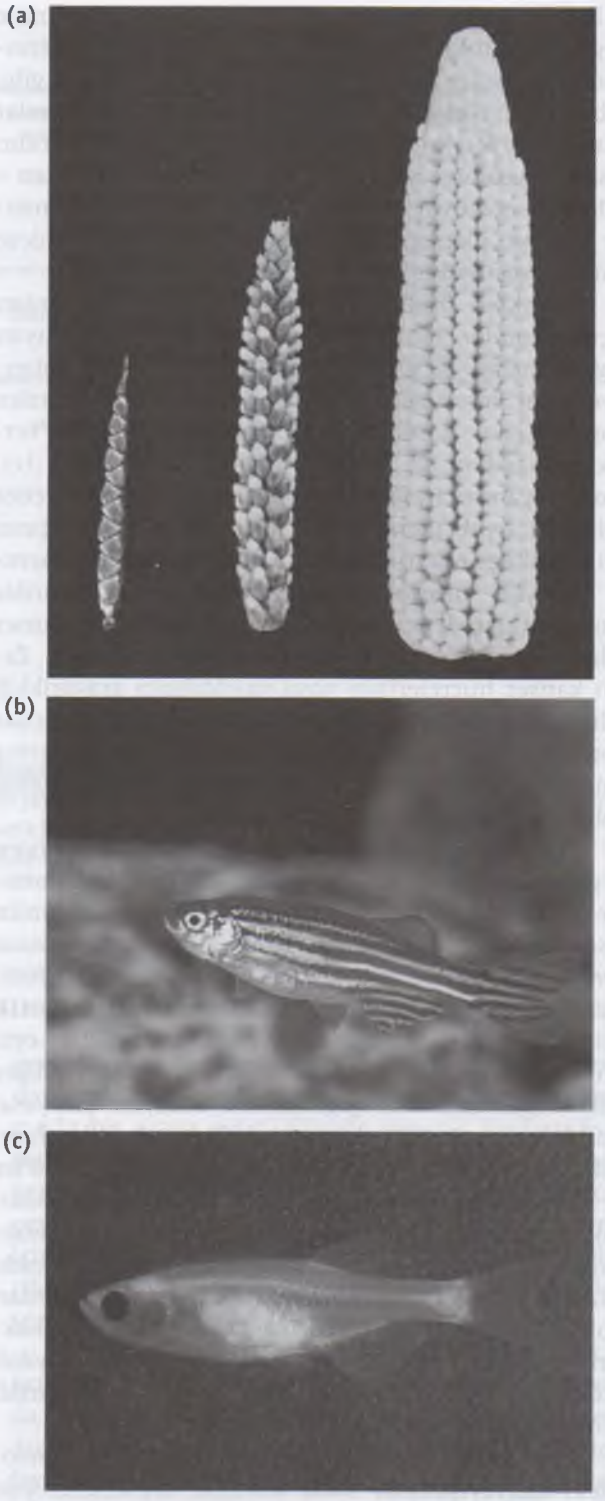
Biyoteknolojinin son zamanlarda dikkat çekiyor olması onun nispeten yeni bir alan olduğunu düşündürebilir; ancak bu bilim dalının birçok bakımdan eski tarihlerden kalma uygulamalarının olduğunu bilmek sizi şaşırtacaktır. Bir sonraki kısımda tartışılacağı üzere, biyoteknolojideki eski ve yeni uygulamalar, onu bilimin en hızlı değişen ve en heyecanlı alanlarından biri yapmaktadır. Günlük hayatımıza olan etkileri, bu yüzyılda—bazılarının söylediği gibi "biyoteknoloji yüzyılı"—daha önemli hale gelecektir.

Biyoteknolojinin Kısa Tarihçesi

Eğer ailenize ve arkadaşlarınıza biyoteknolojiyi tanımlamalarını söylerseniz, cevapları sizi şaşırtabilir. Biyoteknolojinin ne olduğu hakkında hiçbir fikirleri olmayabilir. Belki de biyoteknolojinin, beyaz laboratuvar önlükleri içindeki ciddi görünüşlü bilim insanlarının, pahalı laboratuvarlarda gizlice yaptıkları karmaşık gen klonlama deneylerinden oluştuğunu söylerler. Daha fazla ayrıntı istediğinizde ise, ne yazık ki arkadaşlarınız bu "deneylerin" nasıl yapıldıklarını, bu araştırmalardan ne gibi bilgiler elde edileceğini ve bu bilgilerin nasıl kullanılacağını açıklayamayacaklardır. Her ne kadar DNA klonlamak ve organizmaların genetiğini değiştirmek günümüz modern tekniklerinden olsa da, biyoteknoloji yeni bir bilim değildir. Aslında yapılan birçok işlem, eski uygulamalarda yeni yöntemlerin kullanılmasıdır. İnsanlar binlerce yıldan beri biyolojik organizmaları kendilerine yararlı birçok işlemde kullanmaktadırlar. Arkeolojik kayıtlar Çinliler, Yunanlılar, Romalılar, Babilliler ve Mısırlıların yaklaşık olarak M.Ö. 2000'li yıllardan buyana biyoteknoloji ile ilgilendiklerini göstermektedir.

Biyoteknoloji, yemek için hayvan avlayıp, bitki toplamak olmasa da; koyun, sığır gibi hayvanların evcilleştirilip, hayvancılık faaliyeti yapılması biyoteknolojiye klasik bir örnek olarak verilebilir. Atalarımız ayrıca mikroorganizmalardan yararlanarak, **fermantasyonu (mayalanma)** ekmek, peynir, yoğurt ile bira ve şarap gibi alkollü içecekler yapımında kullanmışlardır. Fermantasyon sürecinde, bazı fungus türleri (maya) enerji elde etmek için şekerleri parçalarlar ve bu sırada da atık madde olarak etanol (alkol) üretirler. Ekmek yapılırken, hamurun kabarması için maya (*Saccharomices cerevisiae*, genel adıyla ekmek mayası) eklenir. Bu kabarmanın nedeni, mayanın şekeri parçalaması sırasında ortama karbondioksit salınması ve bunun hamurda kabarcıklar meydana getirmesidir. Bu sırada açığa çıkan alkol de ekmek pişirilirken buharlaşır. Evde ekmek veya pizza hamuru yaptığınızda, marketten aldığınız *S. cerevisiae* paketini hamur karışımınıza eklemişsinizdir. Benzer işlemler yoğurt, peynir ve içeceklerin üretiminde de geçerlidir.

İnsanlar yiyecek amaçlı bitkisel ve hayvansal üretimlerini iyileştirmek için, bir biyoteknoloji uygulaması olan, **seleksiyon ıslahını** binlerce yıldır kullanmaktadırlar. Seleksiyon ıslahında, istenen özelliklere sahip olan canlılar, aynı özellikleri taşıyan döller elde edebilmek için tasarlayarak çiftleştirilirler. Örneğin, melezleme yoluyla elde edilen bitkiler, en büyük, en tatlı ve en yumuşak mısır koçanlarını üretmek isteyen çiftçilerin tarlalarında arzu edilen ürünleri en üst düzeyde üretmelerini sağlar (**Şekil 1.1a**). Benzer ıslah teknikleri hindi (en büyük ve en yumuşak göğüs etine sahip hindi üretimi için ıslah), sığır, tavuk ve domuz yetiştiriciliği gibi hayvancılık yapılan işletmelerde de



ŞEKİL 1.1 Seleksiyon Islahı Biyoteknolojinin Bugün de Kullanılan Eski Uygulamalarına Bir Örnektir (a) Seleksiyon ıslahıyla geliştirilmiş mısır. Soldan sağa; teosinte (*Zea canina*), seleksiyonla ıslah edilmiş hibrit ve günümüz mısırı (*Zea mays*). (b) Doğal zebra balığı ve (c) seleksiyonla üretilen saydam zebra balığı, "Casper".

kullanılır. Diğer örnekler arasında, insan tüketimine uygun bugünkü formlarına getirilmek için generasyonlar boyunca kültüre alınan marul ve lahana gibi, yabani bitki türlerinin ıslahı sayılabilir. Bu yaklaşımlar aslında biyoteknolojinin genetik uygulamalarıdır. İnsanlar yüzlerce yıldan bu yana farkında olmadan – pahalı laboratuvar, gelişmiş aletler, doktoralı elemanlar ve iyi planlanmış deneyler olmadan –genlere müdahale etmekteler.

İstedikleri özellikleri taşıyan bitki ve hayvanları seçen insanlar, bunu yaparak faydalı genleri taşıyan organizmaları da seçmekte ve onların genetik potansiyellerini insanlığın hizmetinde kullanmaktadırlar. Boston Çocuk Hastanesi araştırıcıları Casper adını verdikleri, saydam bir zebra balığı ürettiler (Şekil 1.1c). Casper, yansıtıcı pigment yoksunu bir mutant zebra balığı ile siyah pigment yoksunu bir zebra balığının çiftleştirilmesinden elde edildi. Zebra balıkları önemli deneysel **model organizmalar**dır. Araştırıcılar Casper'ın ilaç deneyleri, in vivo kök hücre ve kanser çalışmaları için önemli olduğunu belirtmekteler. Zaten kanser hücrelerinin nasıl yayıldığının araştırıldığı çalışmalara değerli katkılar sağladı bile; araştırıcılar floresan tümör hücrelerini balığın karın boşluklarına enjekte ettikten sonra, bu hücrelerin vücutta hangi bölgelere dağıldığını takip edebildiler.

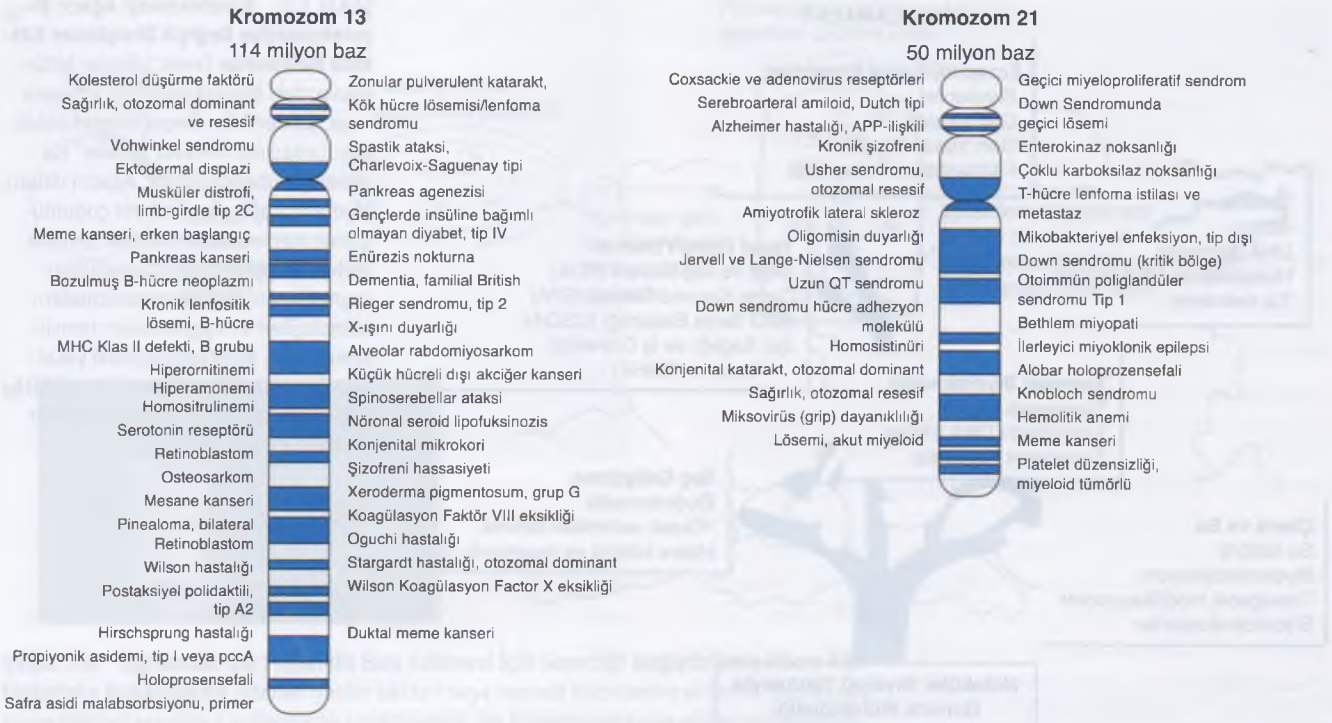
Biyoteknolojinin en yaygın ve genel kabul gören uygulamalarından biri de antibiyotiklerin kullanımıdır. 1928'de Alexander Fleming, *Penicillium* küfünün insanlarda cilt hastalığına neden olan *Staphylococcus aureus* adlı bakterinin çoğalmasını önlediğini keşfetti. Fleming'in daha sonraki çalışmaları **antibiyotik** penisilinin keşfi ve saflaştırılmasına öncülük etti. Antibiyotikler, mikroorganizmalarca üretilen ve diğer mikroorganizmaların çoğalmasını önleyen kimyasal maddelerdir. Penisilinin tıpta bakteriyel iltihapların tedavisinde kullanımı 1940'larda yaygınlaştı. 1950'ler ve 1960'larda biyokimya ve hücre biyolojisi alanlarındaki ilerlemeler, birçok bakteri türünden, bol miktarda antibiyotiğin saflaştırılabilmesini mümkün kıldı. Ticari değeri olan moleküllerin mikroorganizmalardan izole edilmesi için **seri üretim** (büyük ölçekli) – bakteri ve diğer hücreler bol miktarda üretilip faydalı ürünler büyük ölçeklerde hasat edilir – geliştirildi (Bölüm 4'de ayrıntılı açıklanmaktadır).

1960'lardan buyana genetik ve moleküler biyolojideki kavrayışımızın hızla artması, biyoteknolojide heyecan verici yeni buluşlar ve uygulamalara yol açtı. DNA yapısı ve fonksiyonlarının bilinmeye başlamasıyla, yeni teknolojiler **gen klonlama** (ilgi geni bulma ve çoğaltma) ve **genetik mühendisliği** (bir organizmanın genetiğini değiştirme) uygulamalarını getirdi. Genetik mühendisliği yöntemleriyle, bilim insanları farklı kaynaklardan DNA'ları bir araya getirebildiler. **Rekombinant DNA teknolojisi** adı verilen bu işlem insülin, insan büyüme hormonu, kan pıhtılaşması etmeni gibi tıbbi öneme sahip birçok proteinin üretiminde kullanılmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi başlangıcından buyana biyoteknolojinin birçok önemli alanına hakim oldu. Kısa bir süre sonra öğreneceğiniz gibi, birçok kişi rekombinant DNA teknolojisinin modern biyoteknolojiyi bir endüstriye dönüştürdüğüne inanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisinin; hastalıklara dayanıklı, yüksek verimli, "altın pirinç" gibi besin değeri artırılmış bitkiler ve çevre kirliliğini azaltacak kapasiteye sahip genetiği değiştirilmiş bakteriler gibi yüzlerce uygulama alanına sahip olduğunu da öğreneceksiniz.

Gen klonlama ve rekombinant DNA teknolojileri, insanlardaki genetik hastalıkların nedeni olan binlerce genin belirlenmesini sağlayarak, insan sağlığına çok büyük katkı sunmuşlardır. Gen klonlamada en üst düzey proje olan **İnsan Genom Projesi**, uluslararası bir proje olarak 1990'da başlamıştır. İnsan Genom Projesinin öncelikli hedefi, insan hücrelerindeki DNA'da yer alan tüm genleri —**genom**— belirlemek ve bunların 24 kromozom (kromozom 1- 22, artı X ve Y kromozomları) üzerindeki yerlerini haritalamaktı. İnsan Genom Projesi, hastalıkların tanısında kullanılabilecek yeni yaklaşımlara ve genetik hastalıklara neden olan koşulların tedavi ve iyileştirilmelerindeki moleküler uygulamalara sınırsız katkılar sağlamaktadır.

Sadece olasılıkları hayal edin. İnsan Genom Projesi, normal hücre faaliyetlerini kontrol eden genlerden, saç rengi, göz rengi, boy ve kilo gibi karakterleri belirleyen, pek çok genetik hastalığın nedeni olan genlere kadar, insan genlerinin *her birinin* kromozomlar üzerindeki yerlerini ve kodlarını söyleyebilmektedir (**Şekil 1.2**). İnsan Genom Projesinin bir sonucu olarak, insan genetiği hakkındaki yeni bilgilerin yakın gelecekte temel bilimler ve tıp üzerinde çok büyük ve çeşitli etkileri olacaktır. 1000 Genom Projesi, diğer canlıların genomlarıyla yapılan karşılaştırmalar sayesinde (bakınız Bölüm 3) şimdiden insan genetiğinin daha iyi anlaşılmasına katkılar sağladı. İnsan genlerinin tümünün fonksiyonlarının anlaşılması için harcanan çabalarla, biyolojinin çözülmeyen sırları birçok açıdan ortaya çıkarılmaktadır. Bu kitaptaki birçok bölümde genomun sırlarını keşfedeceğiz.

Az önce öğrendiğiniz gibi, biyoteknoloji uzun ve zengin bir tarihe sahiptir. Gelecek bölümler biyoteknolojideki gelişmeleri keşfe ve geleceğin neler getireceğine bakmaya adandı. Biyoteknoloji konularına çalışırken bunaltıcı gelebilecek birçok isim ve tanımlamalarla karşılaşacaksınız. Kitabın sonunda yer alan dizin ve sözlük, önemli terimlerin tanımlarını bulup öğrenmenize yardımcı olacaktır.



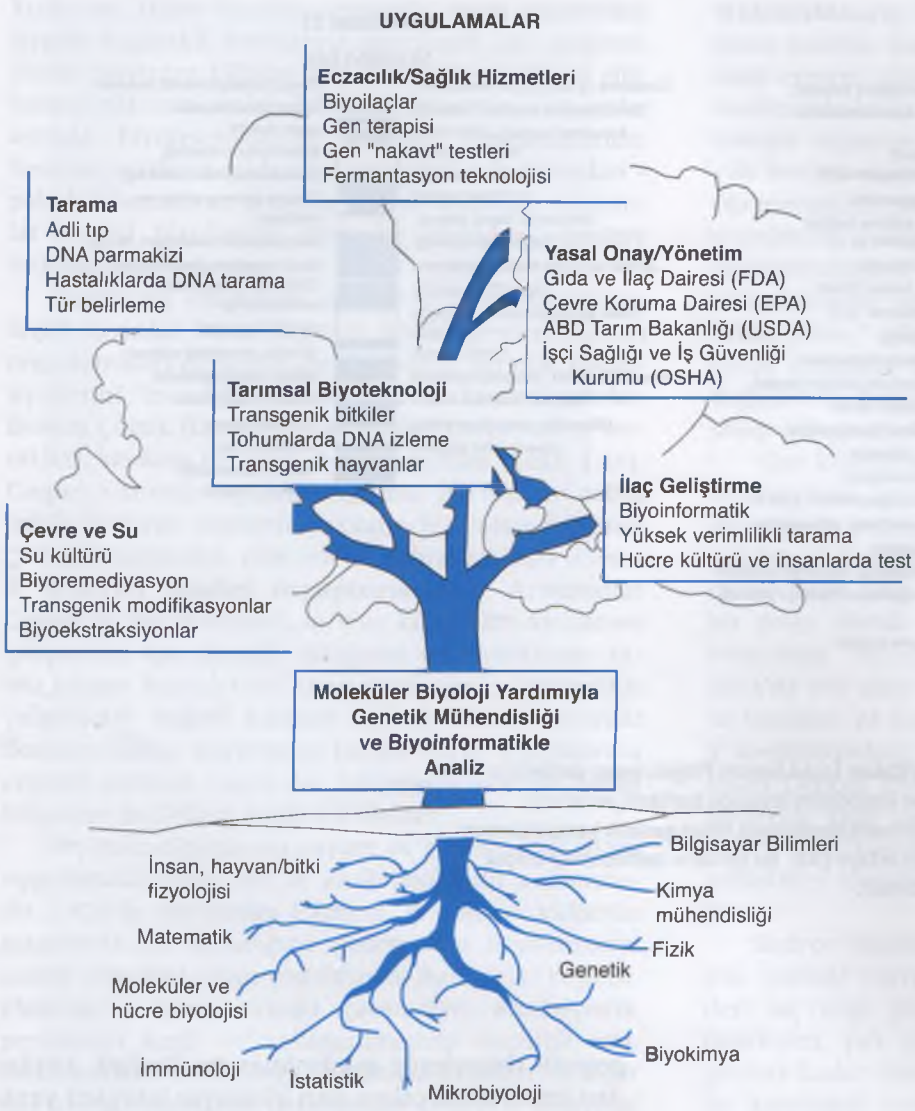
ŞEKİL 1.2 Kromozom 13 ve 21'in Gen Haritaları İnsan Genom Projesi insan genlerinin tamamına yakın bölümünün bulunması ve her kromozom üzerinde bunların yerlerinin belirlenmesini sağladı. Kromozom 13 ve 21'in haritalanmasıyla insan genetik hastalıklarının bu kromozomlardaki genlerle ilişkili oldukları ortaya çıktı. Bu genlerin belirlenmesi birçok genetik hastalığın tedavisi için önemli bir adımdır.

Biyoteknoloji: Çok Disiplinli Bir Bilim

Biyoteknoloji çalışırken karşılaşacağınız güçlüklerden biri de, çeşitli bilim dallarından karmaşık gelebilecek bilgileri bir araya getirmeye uğraşmanız olacak. Farklı bilim dallarının katkılarını değerlendirmeden biyoteknolojiyi konuşmak imkânsızdır. Başlıca odak noktası moleküler biyoloji olmasına rağmen, biyoteknoloji tek başına var olan, dar kapsamlı bir çalışma alanı değildir. Biyoloji, kimya, matematik, bilgisayar bilimleri ve mühendislikle, ayrıca felsefe ve ekonomi gibi diğer bilim dallarına dayanan, geniş ve *interdisipliner* bir alandır. Bu bölümün devamında biyoteknolojinin farklı alanlarda yetişmiş insanlara nasıl bir istihdam zenginliği sunduğunu da değerlendireceğiz.

Bir sonraki sayfada yer alan **Şekil 1.3** biyoteknolojiye katkı sağlayan birçok dalı bir diyagram ile göstermektedir. "Kökler"i **temel bilimler**in oluşturduğuna dikkat edin. Temel bilimler canlı varlıkların temel süreçlerinin biyokimyasal, moleküler ve genetik düzeylerde araştırılmasıdır. Değişik alanlardan temel bilim çalışmaları bilgisayar bilimleri yardımıyla bir araya getirildiğinde genetik mühendisliğinin çalışmalarına ulaşılır. Ağacın üst bölümündeki genetik mühendisliği uygulamaları, insan ve canlı çevre yararına bir ürün veya işlem ortaya çıkarmak için kullanılabilir. Bu işlemlerin çoğu henüz geliştirilmeyi ve bugün biyoteknolojide çalışan insanların sezgisel katılımını beklemektedir.

Biyoteknolojinin interdisipliner doğası basit bir örnekle şöyle açıklanabilir. Bir üniversitede, devlet ya da özel kurumda, mikrobiyoloji alanında temel düzeyde araştırma yapan bilim insanları bakterilerde hastalık tedavisinde kullanılma potansiyeli gösteren bir gen veya gen ürünü keşfedebilir. Bu genin rolünü anlamada genellikle biyokimyasal, moleküler ve genetik teknikler kullanılacaktır. Bu süreçte ayrıca, genin dizisinin ve ürettiği proteinin yapısının belirlenmesinde, bilgisayar biliminin gelişmiş yöntemlerinden de yararlanılacaktır (**biyoinformatik** alanının bir bölümü).

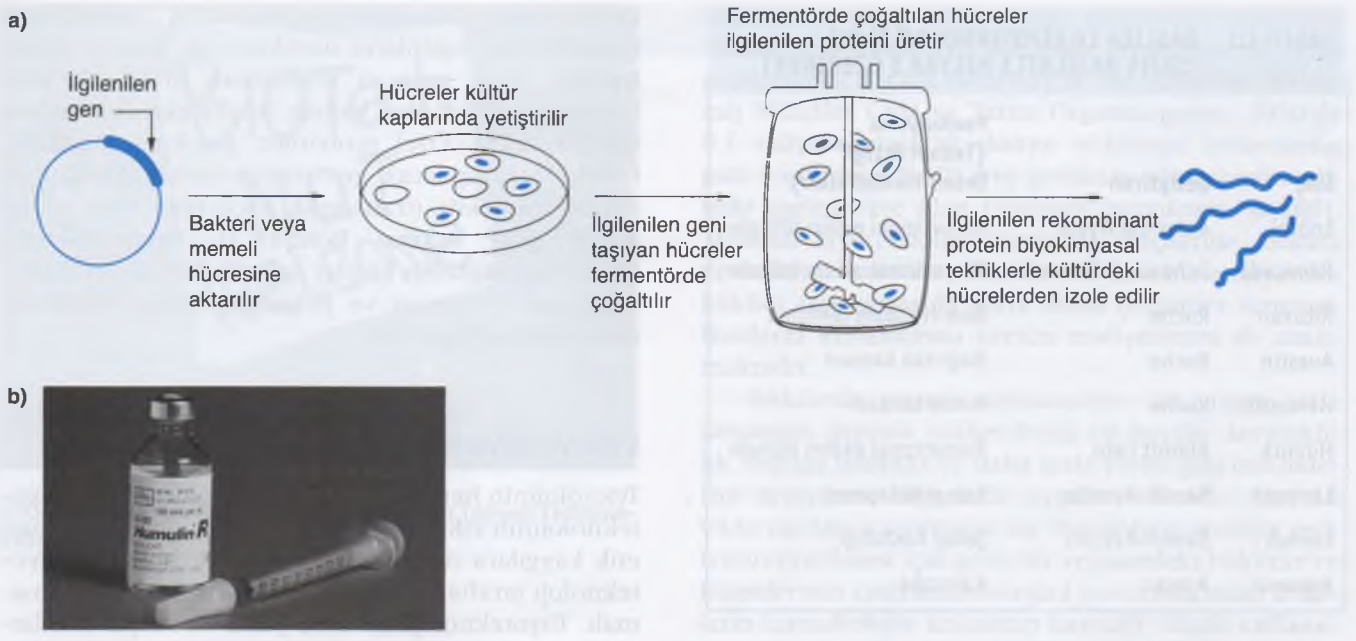


ŞEKİL 1.3 Biyoteknoloji Ağacı: Biyoteknolojiye Değişik Disiplinler Katkıda Bulunurlar Temel bilimler bütün alanlardaki biyoteknolojinin altyapısı veya "kökleri"dir. Birçok biyoteknoloji uygulamasının merkezi "gövde" ise genetik mühendisliğidir. Ağacın dalları, biyoteknolojik yönelimlerin çoğunluğunun merkezi durumundaki genetik mühendisliği ve biyoinformatikten kaynaklanan, değişik organizmaları, teknolojileri ve uygulamaları temsil etmektedir. Biyoteknolojideki yasal uygulamalar, FDA, USDA, EPA ve OSHA gibi resmi kurumlarca yerine getirilir (bakınız Bölüm 12).

Temel çalışmalar genin ayrıntılı işleyiş düzeyini belirledikten sonra, bu gen artık ilaç geliştirmeden, tarımsal biyoteknolojiye, çevre ve denizle ilgili uygulamalara kadar çok çeşitli alanlarda kullanılabilir (Şekil 1.3). Her alana ait çalışmaları incelemeyi bitirdiğimizde, biyoteknoloji uygulamalarının birçoğu daha anlaşılabilir hale gelecektir. Bu noktada aklımızda tutmamız gereken, biyoteknolojinin birçok dalda beceri gerektiren bir bilim olduğudur.

Modern Biyoteknoloji Ürünleri

Bu kitabın tamamında pek çok ileri ve yenilikçi ürünle biyoteknoloji uygulamalarını değerlendiriyoruz. Sadece insan kullanımı için olan ürünler değil, mikrobiyoloji, deniz biyolojisi ve bitki biyolojisi gibi diğer alanlardaki biyoteknoloji uygulamaları da bunların içindedir. Bugün çoğunlukla ulaşılabilen mevcut biyoteknoloji ürünlerinin sayısı bu tanıtım bölümünde bahsedilemeyecek kadar çoktur. Yine de, burada bahsedilenlerin birçoğu insanların halen ihtiyaç duydukları ürünleri yansıtmaktadır; örneğin, eczacılık ürünleri, insan sağlık koşullarını iyileştirmek için ilaç bulmak gibi. Aslında ABD'deki biyoteknoloji şirketlerinin % 65'ten fazlası ilaç sektöründedir. Dünyanın ilk biyoteknoloji şirketi olarak kabul edilen, Kaliforniya'daki bir biyoteknoloji şirketi, **Genentech** 1982'de insan yararına ilk biyoteknoloji ürünü olan ve şeker hastalığı tedavisinde kullanılan rekombinant insülin üretimi için izin aldı (**Şekil 1.4**). Bugün piyasada yüzlerce ilaç, aşı ve tanı kiti bulunmakta, 300'den fazla bioteknoloji ecza ürünü de 200'ün üzerinde hastalığın tedavisini hedefleyen geliştirilme süreçlerinde yer almaktadır. **Şekil 1.5**'te gösterildiği



ŞEKİL 1.4 İlgilenilen Bir Proteinin Elde Edilmesi İçin Genetiği Değiştirilmiş Hücre Kültürlerinin Kullanılması İstenen genler bakteri veya memeli hücrelerine aktarılır. Bu hücreler hücre kültürü teknikleri kullanılarak çoğaltılabilir. Bu hücrelerden izole edilen rekombinant proteinler yüzlerce farklı biyoteknoloji uygulamasında kullanılırlar. Bu örnekte memeli hücreleri gösterilmekte, ancak aynı işlemler genellikle bakteriler kullanılarak yapılmaktadır.

gibi, biyoteknoloji endüstrisinde ilaç geliştirme çalışmaları başlıca insan hastalıklarıyla mücadeleye odaklanmakta; gelişim hattındaki ilaçların yarıdan fazlası ise kanser tedavisi için tasarlanmaktadır. Tablo 1.1, en çok satan biyoteknoloji ilaçları ile onları geliştiren şirketlerin kısa bir listesini gösteriyor. Kazanılmış bağışıklık yetersizliği (AIDS), felç, şeker ve kanser gibi değişik hastalıkların tanı ve tedavisinde kullanılanlar, piyasadaki biyoteknoloji ürünlerinin ana çoğunluğunu oluşturmaktadır.

En yaygın kullanılan biyoteknoloji ürünlerinin çoğunluğu, gen klonlama ile oluşturulan proteinlerdir (Tablo 1.2). Gen klonlama ile üretildikleri için bu proteinlere **rekombinant proteinler** denilmektedir. Örneğin, insan hastalıklarının tedavisinde kullanılan rekombinant proteinlerin çoğu insan genlerinin bakterilerin genomuna eklenmesiyle üretilir.

Genlerin nasıl klonlandığı ve istenen proteinleri nasıl ürettikleri ilerde ayrıntılarıyla anlatılacaktır (Bölüm 3). Bu yaklaşımın bir tanıtımı olarak Şekil 1.4'te gösterilenleri göz önüne alınız. İlerleyen sayfalarda öğreneceğiniz gibi, bilim insanları ilgilendikleri bir genin yerini belirleyebilir, onu bakteri veya memeli hücresine aktarıp, **hücre kültürü** adı verilen bir teknikle çoğaltabilirler. Hücre kültüründe, hücreler gelişmeleri için gerekli besinlerin yer aldığı petrilerde veya şişelerdeki sıvı kültürde yetiştirilirler. İlgilenilen DNA'yı içeren hücrelerin toplu üretiminde **fermentör** veya **biyoreaktör** adı verilen büyük kültür kapları kullanılır. Bilim insanları, bu hücrelerdeki ilgilendikleri o özel genin ürettiği proteinleri hasat ederek Tablo 2'de gösterilen uygulamalar için kullanırlar.



ŞEKİL 1.5 Hastalık Araştırmalarına Konu Olan Biyoteknoloji İlaçları Biyoteknoloji endüstrisinin insan hastalıklarının tedavisinde en çok ilgi gösterdiği alan kanserle savaştır. Ayrıca AIDS ile ilişkili araştırmalar ve grip gibi bulaşıcı hastalıklar da listenin üst sıralarında yer almaktadır.

TABLO 1.1 BAŞLICA 10 BİYOTEKNOLOJİ İLACI (SATIŞ HASILATI 1 MİLYAR $ ÜZERİNDE)

İlaç	Geliştiren	Fonksiyonu (Tedavi Ettiği İnsan Hastalıkları)
Enbrel	Amgen & Wyeth	Romatizmal eklem iltihabı
Remicade	Johnson & Johnson	Romatizmal eklem iltihabı
Rituxan	Roche	Non-Hodgkin lenfoma
Avastin	Roche	Bağırsak kanseri
Herceptin	Roche	Meme kanseri
Humira	Abbott Labs	Romatizmal eklem iltihabı
Levenox	Sanofi-Aventis	Kan pıhtılaşması
Lantus	Sanofi-Aventis	Şeker hastalığı
Aranesp	Amgen	Kansızlık

TABLO 1.2 KLONLANMIŞ GENLERİN ÜRETTİĞİ PROTEİNLERE ÖRNEK

Ürün	Uygulama
Kan faktörü VIII (pıhtılaşma faktörü)	Hemofili tedavisi
Epidermal büyüme faktörü	Bağışıklık sistemi bozukluğu olan hastalarda antikor üretimini uyarmak
Büyüme hormonu	İnsanlarda hipofiz bezi bozukluğu ve boy kısalığını düzeltmek; bazı formları ineklerde süt üretimini arttırmak için kullanılır.
İnsülin	Şeker hastalığı tedavisi
İnterferonlar	Kanser ve viral enfeksiyon tedavileri
İnterlökinler	Kanser tedavisi ve antikor üretimini uyarmak
Monoklonal antikorlar	Eklem iltihabı ve kanser dahil çeşitli hastalıkların tanı ve tedavisi
Doku plazminojen aktivatörü	Kalp krizi ve felç tedavileri

Eğer Şekil 1.5 ile Tablo 1.1 ve Tablo 1.2'deki örnekler insan sağlığı için biyoteknolojinin ne kadar önemli olduğu konusunda yeterince inandırıcı gelmediyse, şunu düşünün; yakın bir gelecekte **gen terapisi** adı verilen bir yaklaşımla, insan hastalıklarını iyileştirmek ve tedavi etmek için belki de genler insan hücrelerine aktarılacak. Genetik ve hücre mühendisliği, alıcıların ender olarak reddedeceği nakledilebilir organların üretilmesinin yolunu açabilecektir. Suda yaşayan canlılardan üretilecek yeni biyoteknoloji ürünleri kanser, felç ve eklem iltihabını iyileştirecektir. Özel proteinler, gerektiği miktarda, hayvanlara yapılacak gen transferleriyle üretilmeye devam edecektir (transgenik keçilerden elde edilen ATryn gibi; bakınız Bölüm 7). İnsan Genom Projesi'nin sağladığı bilgiler ışığında tıptaki yenilikler, daha sağlıklı yaşam ve potansiyel insan ömrünün uzamasını sağlayacaktır.

Etik ve Biyoteknoloji

Teknolojinin herhangi bir alanında olduğu gibi, biyoteknolojinin etkili ve potansiyel uygulamaları da bazı etik kaygılara neden olabilmektedir; herkesin biyoteknoloji taraftarı olmayacağını görmek sizi şaşırtmamalı. Biyoteknolojinin etik, yasal ve sosyal alanlardaki etkileri dünya genelinde gerek bilim insanları gerekse halk, din bilginleri, politikacılar, hukukçular gibi birçok kişi arasında tartışma ve görüş ayrılıklarına neden olmaktadır (**Şekil 1.6**). Bu konuyu irdelerken etik, yasal ve sosyal sorunları sizlerin dikkatinize sunacağız. Biyoteknolojinin sizi direkt olarak etkileyecek etik sorunlarıyla gittikçe artan oranda karşı karşıya kalacaksınız.

Örneğin; koyun, sığır ve maymun gibi memelilerin klonlanmasından sonra, bazıları insan klonlanmasına da izin verilmesini önermektedir. Bu konuda ne düşünüyorsunuz? Eğer birgün siz ve yakınlarınız başka bir şekilde çocuk sahibi olamadığınızda, kendinizin bir kopyası olacak klon bir bebeğe sahip olma fırsatını değerlendirir misiniz? Diğer bir örnek; yapay genomların canlılara aktarılması ve yapay proteinlerin üretimi. Şüphesiz böyle bir durumda bu tekniklerin risk ve yararları konusunda yeni tartışmalar gündeme gelecek ve bu sorunlar hakkında karar vermesi beklenen bilgi sahibi halkın önemi daha belirgin ortaya çıkacaktır (yapay canlılar konusundaki bir tartışma için, bakınız Bölüm 5).

Eğer biyoteknoloji alanında çalışmaya karar verirseniz, takım çalışmasına yatkın yetenekler geliştirmeniz beklenir. Takım çalışmaları, birçok etik sorunu farklı bakış açılarıyla değerlendirmek için, bazı meslekdaşlarınızın desteklediği parametreler için temel bir anlayış geliştirmenizi gerektirir. Biyoteknolojinin her uygulamasıyla ilişkili tartışmalı durumların ve hem taraftar hem de karşıt grupların olduğunun farkında olmalısınız. Bizim amacımız size *ne* düşünmeniz gerektiğini söylemek değil, kendi kararlarınızı oluştururken kullanacağınız bilgiyi sağlamaktır.



ŞEKİL 1.6 Biyoteknoloji Birçok Etik İkilemler Taşıyan Tartışmalı Bir Bilimdir

1.2 Biyoteknoloji Türleri

Biyoteknolojiye katkı sağlayan pek çok bilimsel alanı öğrendikten sonra, şimdi de biyoteknolojinin birçok türü olduğunun farkına varmalıyız. Bu alt başlığı, gelecek bölümlerde ayrıntılarıyla öğreneceklerinize bir başlangıç olarak değerlendiriniz.

Mikrobiyal Biyoteknoloji

Bölüm 5'te mikrobiyal biyoteknolojinin toplumu etkilediği birçok alanı inceliyoruz. Daha önce tartıştığımız gibi, bira ve şarap yapımında mayaların kullanılması biyoteknolojinin en eski uygulamalarından biridir. Mikrobiyal biyoteknolojide bakteri ve mayalar gibi mikroorganizmaların manipülasyonuyla, pek çok gıdanın yapımında ve işlenmesinin kolaylaştırılmasında ayrıca endüstriyel atıkların daha etkin temizlenmesinde kullanılan daha iyi enzimler ve canlıların yaratılması mümkün olmuştur. Mikroorganizmalar, aşı yapımında ve klonlamada, insülin ve büyüme hormonu dahil insan sağlığı alanında kullanılan önemli proteinlerin toplu üretiminde kullanılmaktadır. Ayrıca mikroorganizmaların tanı amaçlı olarak insanlarda, gıda örneklerinde ve diğer kaynaklarda kullanılma stratejileri ile biyolojik silahlar olarak ortaya çıkmaları ve bunlarla mücadeleyi de inceleyeceğiz.

Tarımsal Biyoteknoloji

Bölüm 6 bitki biyoteknolojisi ve biyoteknolojinin tarımsal uygulamalarına ayrıldı. "Tarımsal Biyoteknoloji" içinde genetik müdahaleleri, kimyasal ilaç kullanılmasına gerek duyulmayan zararlılara-dayanıklı, daha yüksek protein veya vitamin içeriğine sahip bitkileri ve bitkisel ürün olarak geliştirilip yetiştirilen ilaçları inceleyeceğiz. Tarımsal biyoteknoloji hızla genişlemeye devam eden büyük bir işkoludur. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu, 2050'de 9.1 milyara ulaşacak dünya nüfusunu beslemenin gıda üretiminde % 70 artış gerektireceğini öngörmektedir (gelişmekte olan ülkelerde neredeyse % 100). Tarımsal biyoteknoloji günümüz çiftçilerine, dekara verimlerini artırırken, hastalık ve zararlılara dayanıklı bitkiler aracılığıyla da çevre dostu çözümler sunuyor. Bunların kullanılması üretim maliyetlerini de azaltmaktadır.

Bitkilerde genetik müdahaleler 20 yıldan fazla zamandır, genetik mühendisliği ile kurağa dayanıklılık, soğuğa tolerans ve daha fazla verim gibi özelliklerini değiştirme biçiminde uygulanmaktadır. Son 10 yılda yapılan araştırmalar da, birçok farmakolojik proteinin üretilmesi için geniş bir yelpazedeki bitki tür ve hücrelerinin tasarlanabileceğini göstermektedir. Bitkilerin farmakolojik ürünlerin kaynağı olarak kullanılması, tarımsal biyoteknolojinin **moleküler eczacılık** olarak adlandırılan bir uygulamasıdır. Örneğin tütün, uzun yıllardır tarımsal araştırma ve ıslaha konu olan gıda dışı bir üründür. Yapraklarında rekombinant proteinleri üretmek üzere tasarlanmış tütün bitkileri büyük tarlalarda moleküler eczacılık amacıyla yetiştirilebilir. Ancak hedef dışı bitkilere gen kaçışı olabilmekte, bunun sonucunda ortaya çıkan "süper yabancıotlar"ın raporlarda yer alması, biyomühendislikle geliştirilen bitkilerin kullanımlarını etkilemektedir. Bu sorunların neden olduğu biyoetik tartışmalar, GD bitkilerin geliştirilmesi ve kullanılmaya devam edilip edilmemesiyle ilgili, her iki tarafta da güçlü kanıların oluşmasına yol açmaktadır.

ABD'nin yabancı petrol "bağımlılığını" azaltmak için biyoyakıt kullanımına izin veren 2007 Başkanlık Gelişmiş Enerji Girişimi, destekleyicilerince, 2025 yılına kadar ABD'de kullanılan enerjinin % 25'inin ekili tarım alanlarından sağlanıyor olacağı şeklinde yorumlanmaktadır. Biyoetanol eldesinde kullanılan mısırın enerji için yeterince verimli olmaması nedeniyle, Girişim'in bu hedefine ulaşmak biyoteknolojide önemli atılımları gerektirecektir. Tarımsal atıklar, çayır otları ve yüksek selüloz içerikli diğer kaynaklar (mısır yan ürünleri dahil), biyoteknolojiyle yeni ayrıştırma ve fermantasyon metodlarının geliştirilmesi yoluyla yüksek verimli enerji kaynakları durumuna geçebileceklerdir. Bu zorluklar halen aşılma yolundadır.

Hayvan Biyoteknolojisi

Bölüm 7'de biyoteknolojinin en heyecanlı ve hızlı değişen alanlarından biri olan hayvan biyoteknolojisini inceleyeceğiz. Hayvanlar önemli ürünlerin üretilmesinde "biyoreaktörler" olarak kullanılabilir. Örneğin keçiler, sığırlar, koyunlar ve tavuklar **antikorlar** (vücut hüc-

KARARI SİZ VERİN

Genetiği Değiştirilmiş Gıdalar: Yemek ya da Yememek?

Birçok uzman genetiği değiştirilmiş gıdaların güvenli olduklarına ve gelecekte önemli yararlar sağlayacağına inanmaktadır. Fakat GD gıdaların kullanılması ve güvenli oldukları konusunda halkın düşünceleri farklı farklıdır. Bir ankete göre Amerikalıların yaklaşık üçte biri, bilimsel yöntemlerle – rekombinant DNA teknolojisi gibi - gıdaların tad, renk, besin değeri veya tazeliklerinin iyileştirilmelerinin yanlış olduğuna inanmakta. Diğer bir ankete göre, GD gıdaların kullanımına karşı olanların oranı % 50'ye varmakta. Kuşku duyanlar sıklıkla "GD gıdalar doğaya aykırıdır" yorumunu yaparken, bazıları da gıda alerjileri gibi olası sağlık risklerinden endişe duymaktalar.

Ancak Amerikalıların gelecekte olumlu katkılar bekledikleri de görülmektedir. ABD'de 2010 yılında yapılan bir ankette katılımcıların yüzde 45'i GD gıdaları kabul edeceğini belirtmiş; fakat tartışmaların daha fazla olduğu Avrupa ve Japonya'da bu gıdaları kabul edeceklerin oranı çok daha düşüktür. Eğer bir seçenek verilirse, birçok kişi, genetiği değiştirilmiş etiketi taşıyan gıdalar yerine diğerlerini alacaklarını belirtmişlerdir. Bu tavır, kitabın ilerleyen bölümlerinde değerlendirilen, GD gıdaların etiketlenip etiketlenmemesi konusundaki diğer bir tartışmayı gündeme getirmektedir.

Şu anki ABD yasaları, GD gıda eğer bir sağlık riski taşıyorsa veya ürünün besin değeri değişmişse etiket zorunluluğu getirmektedir. Ulusal Akademilerin 2004'teki bir raporuna göre, örneğin, "biyotek ürünü bitkiler diğer yöntemlerle geliştirilenlerden daha fazla sağlık riski taşımamakta ve gıda güvenliği değerlendirmeleri ürünün geliştirilmesinde kullanılan teknolojiye göre değil, son ürün gıdayı temel alarak yapılmalıdır."

- GD gıdaların kullanılması konusunda ne düşünüyorsunuz?



DÜŞÜK FİYATLI ÜRÜNLER İNSAN KULLANIMI İÇİN HENÜZ ONAYLANMAMIŞ GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ GIDALARI İÇERMEKTEDİR

- Eğer "doğal" gıdalardan daha az pestisit kullanımı gerektirecek şekilde genetiği değiştirilmiş olursa, GD gıdaları satın alır mıydınız?
- GD gıdaların tazeliklerini uzun süre koruması durumunda fikriniz ne olurdu?
- Eğer daha besleyici ve daha ucuz olsalar ne düşünürdünüz?
- GD gıdaların yararını görmek için tüketiciler ne kadar risk almayı göze almalıdırlar?

Bir GD gıdadan ilk ısırığı almadan önce cevaplanmasını istediğiniz soruların listesini içinizden geçirin. GD gıda ürünleri – yenmeli ya da yenmemeli; kararı siz verin.

relerinin yabancı maddeleri tanıyıp yok etmelerine yardım eden, koruyucu proteinler) gibi tıbbi değeri olan proteinlerin elde edilmesinde kullanılabilirler. Antikor tedavisi, bağışıklık sistemi bozukluğu olan hastaların bağışıklık sistemlerini güçlendirmek için uygulanmaktadır. İnsan tedavisinde kullanılan diğer birçok terapötik proteinin hayvanlardan elde edilmesi gerçekleştirilmekle birlikte, bu proteinlerin yüzlerce kilogramı geçen miktarlarda üretimine gereksinim vardır. Bu büyük ölçekli üretime ulaşmak için bilim insanları sütlerinde terapötik proteinleri içeren dişi **transgenik hayvanlar** geliştirebilirler. Transgenik hayvanlar diğer canlıların genlerini bünyelerinde bulundurur. Örneğin, kan pıhtılaşma proteinini sentezleyen insan genleri keçilere aktarılıp bu proteinlerin keçi sütünde üretilmesi sağlanabilir.

Hayvanlar ayrıca temel çalışmalar için de çok önemli **model organizmalar**dır. Örneğin, bir veya daha fazla genin işleyişinin durdurulduğu gen "silme (nakavt)" deneyleri o genlerin fonksiyonlarının öğrenilmesi açısından yararlı olabilmektedir. Gen silmenin arkasındaki fikir, bir genin işleyişini bozarak o genin yokluğunda hayvandaki hangi fonksiyonların etkilendiğini gözlemek ve sonuçta o genin rolü ve önemini belirlemektir. Hayvanlarda (fare ve sıçanlar dahil) bulunan birçok gen aynı zamanda insanlarda da olduğundan, hayvanlardaki gen fonksiyonlarının bilinmesi, insanlardaki genlerin fonksiyonlarının daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Benzer olarak, hayvanlarda uygulanan ilaç testleri ve genetik terapiler, insanlarda yeni tedavi stratejileri geliştirilmesine olanak sağlamaktadır.

1997'de İskoçya'daki Roslin Enstitüsü'nün bugün Dolly adıyla ünlü koyunu klonladıklarını duyurmasını bilim insanları ve halk şaşkınlık, heyecan ve çekinceyle karşıladı (**Şekil 1.7**). Dolly hücre çekirdeği

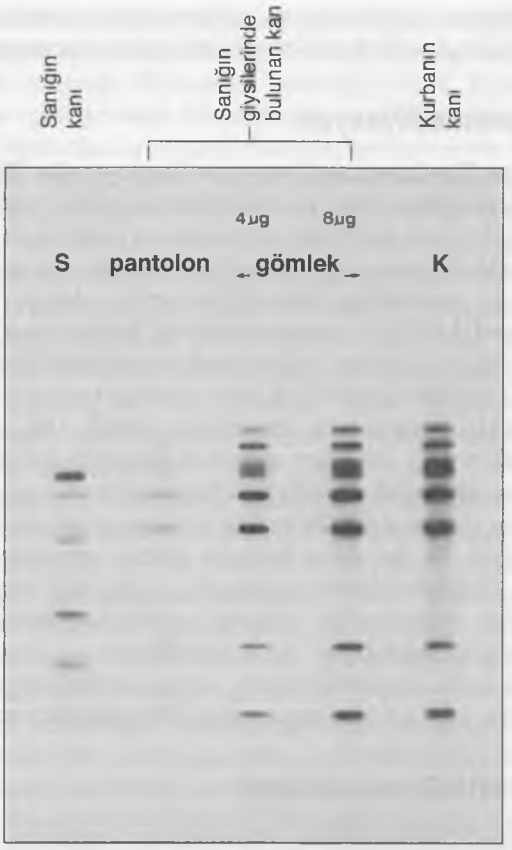


ŞEKİL 1.7 Çekirdek Transferi Klonlaması İle Üretilmiş İlk Memeli, Dolly Dolly taşıyıcı annesi ile poz veriyor. Dolly, çiftlik hayvancılığında ve insanlara nakledilecek organlara sahip ticari değeri olan hayvanların klonlanmasında ümitvar yeni teknolojilere yol açabilecek bir klonlama teknolojisi ile üretildi. Ne yazık ki, Dolly'de erken komplikasyonlar ortaya çıktı ve Şubat 2003'de ötenazi yapıldı.

transferi işlemiyle oluşturulan ilk memelidir (bakınız Bölüm 7). Dolly'den sonra diğer birçok hayvan klonlandı. 2009'da FDA hayvanlarda üretilen ilk ilacı (pıhtılaşma önleyici bir protein) onayladı. Hayvan klonlama, olası insan klonlanması korku ve kaygılarına yol açsa da, bilim insanları hayvan klonlamada kullanılan teknikler hakkında birkaç nedenle genellikle heyecan duymaktadırlar. Örneğin bu teknikler, doku uyuşmazlığı korkusu olmadan insanlara nakledilebilecek genetiği değiştirilmiş organlara sahip hayvanların klonlanmasına yol açabilir. İhtiyacı olan tüm insanlar için her türlü donör organın hazır bir kaynağının olması size göre iyi bir tasarı mıdır? Eğer öyleyse, herkes sizinle aynı fikirde değil. Hayvan klonlama ve organizmaların klonlanması konusundaki anlaşmazlıklar önemli konulardır (Bölüm 7'de tartışıldı).

Adli Biyoteknoloji

Bölüm 8'de adli biyoteknolojiyi inceliyoruz. **DNA parmakizi**— bir canlının benzersiz DNA kalıbını ortaya çıkaran yöntemler koleksiyonu— adli biyoteknolojide kullanılan en temel araçtır. (**Şekil 1.8**). Adli biyoteknoloji kolluk güçleri için etkili bir araçtır; DNA kanıtlarına dayanarak bir kişiden şüphelenilmesi veya şüphenin giderilmesi mümkün olabilir. DNA parmakizi olay yerinden alınan doku, saç, kan veya vücut sıvılarından çok küçük miktarlarda örnekler kullanılarak yapılabilir. Bu yöntem ilk kez 1987'de İngiltere'de bir tecavüzcüyü mahkûm etmek için kullanılmıştır. Ama artık rutin olarak bütün dünya mahkemelerinde, suçluların mahkûm edilmesinde olduğu kadar bir suçla yanlışlıkla itham edilenlerin serbest bırakılmasında da, kanıt olarak kullanılagelmektedir.



ŞEKİL 1.8 Bir Cinayet Davası İçin DNA Parmakizi Bu fotoğraf DNA parmakizi tekniği (Bölüm 8'de öğreneceksiniz) sonuçlarını göstermektedir. Bir sanığın elbisesindeki kan izinden ve kurbanın kanından alınan DNA parmakizleri karşılaştırılmaktadır. DNA parmakizi, her zaman, suçlanan kişinin kesinlikle bu suçu işlediğini belirlemek için kullanılamaz. Bu davada DNA parmakizi sanığın olay yeri ile bağlantısı olabileceğini kanıtlasa da, bu durum cinayeti onun işlemiş olduğu anlamına gelmez.

DNA parmakizi, bir çocuğun babasını kesin olarak saptayan babalık testleri ve insan kalıntılarından kimlik belirleme gibi durumlar dahil birçok uygulama alanına sahiptir. Bir diğer uygulama ise, nesli tükenen türlerin DNA parmakizlerinin belirlenmesidir. Bu uygulama daha şimdiden kaçak avlanmayı azaltmış ve "avladıklarının" DNA parmakizi analizlerinden suçluların yakalanmalarını sağlamıştır. Bilim insanları DNA parmakizlerini ayrıca, bozuk ette bulunan *Escherichia coli* gibi hastalık yayan canlıların izlenme ve doğrulanmasında; AIDS, menenjit, verem, laym ve Batı Nil virüsü gibi hastalıkların izlenmesinde de kullanmaktalar. Son zamanlarda bir Fransız şirketi pahalı yiyeceklerin içine katılan ucuz katkıların, kedi ve yılanbalığı gibi bilinmeyen etlerin saptanmasını sağlayacak bir gen anlatımı testi geliştirdi. Değerli türlerin DNA parmakizlerinin saptanmasını sağlayacak testlerin geliştirilmesi ihtiyacı,

bu deneme yöntemlerini geliştirebilecek küçük biyoteknoloji şirketleri için büyük bir talep yaratmıştır.

Biyoremediyasyon

Bölüm 9'da biyoremediyasyonu inceleyeceğiz. **Biyoremediyasyon**, doğal ve insan-yapımı çeşitli maddeleri, özellikle çevre kirliğine neden olanları, işleme ve ayrıştırmada biyoteknolojinin kullanılmasıdır. Biyoremediyasyon, endüstriyel işlemlerin neden olduğu birçok çevresel kirliliğin temizlenmesinde kullanılmakta. En çok reklamı yapılan biyoremediyasyon örneklerinden biri, 1989'da Alaska'da *Exxon Valdez* petrol sızıntısının ardından gerçekleşen temizliktir (**Şekil 1.9**). Alaska topraklarında bulunan petrol-indirgeyici bakterilerin çoğalması teşvik edilerek, kilometrelerce kıyı şeridi, sadece kimyasal maddeler kullanılarak yapılacak temizliğe göre üç kat daha hızlı bir sürede temizlenmiştir. İlgili bölümde öğreneceğiniz gibi, 2010'daki *Deep Water Horizon* sızıntısındaki dağınık petrol damlacıklarının mikroplar tarafından hızla parçalanması, gelecekteki sızıntılarda kullanılabilecek, doğal petrol-parçalayan canlılar üzerindeki araştırmalara hız kazandırmıştır.

Akuatik Biyoteknoloji

Gezegenimizin büyük çoğunluğunu kaplayan suyun sunduğu çok geniş biyoteknoloji olanaklarını Bölüm 10'da inceleyeceğiz. Akuatik biyoteknolojinin en eski uygulamalarından biri **akua kültür**, yani balık veya kabuklu deniz hayvanlarının kontrollu koşullarda gıda amaçlı yetiştirilmesidir. Alabalık, somon ve yayın balığı ABD'deki birçok önemli akua kültür türlerinin içindedir. Akua kültür, özellikle gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, dünya çapında artan bir popülariteye sahiptir. Son yıllarda yapılan bir değerlendirmeye göre, bugün dünya genelinde insan tüketiminde kullanılan balıkların % 50'ye yakın bölümü su kültüründe üretilmektedir.



ŞEKİL 1.9 Biyoremediyasyon Eylemde *Pseudomonas* bakterisi suşları, *Exxon Valdez* petrol sızıntısı sonrasında Alaska sahillerinin temizlenmesine yardım etmede kullanıldı. Sahildeki bilim insanları, biyoremediyasyonu hızlandıracak *Pseudomonas* bakterilerinin büyümelerini uyaracak besin maddeleri veriyorlar.



ŞEKİL 1.10 Akuatik Biyoteknoloji Yeni Gelişen Bir Bilimdir Akuatik biyoteknoloji insan gıdası olacak balık ve kabuklu deniz hayvanları yetiştirmekten, tıbbi uygulamalarda değerli biyolojik molekülleri deniz canlılarından izole etmeye kadar, su kültüründen yararlanmada inanılmaz bir potansiyel uygulama yelpazesine sahiptir. Resimde, satış büyüklüğüne normal somonun (altta) yarı zamanında ulaşacak şekilde ıslah edilmiş, genetiği değiştirilmiş somon (üstte) gösterilmektedir.

Son yıllarda akuatik biyoteknolojide geniş bir yelpazede büyüleyici yeni gelişmeler ortaya çıkmıştır. Bunlar arasında, genetik mühendisliği yöntemleriyle hastalıklara dayanıklı istiridyelerin üretilmesi ile somon ve diğer balıkları enfekte eden virüslere karşı aşıların geliştirilmesi sayılabilir. Çok büyük miktarlarda büyüme hormonu üreten transgenik somon elde edilerek, bu balıkların olağanüstü büyüme oranları sayesinde, satış büyüklüğüne erişmek için gerekli zaman ve diğer harcamalarda tasarruf sağlanmıştır. (**Şekil 1.10**).

Sucul canlıların birçoğunun benzersiz olmaları da biyoteknolojistlerin ilgisini çekmektedir. Okyanuslarımızdaki bakteriler, algler, kabuklu deniz hayvanları ve balıklar, dünyadaki en zorlu koşullardan sayılabilecek bir çevrede yaşamlarını sürdürürler. Aşırı soğuk, büyük derinliklerin getirdiği basınç, yüksek tuzluluk ve diğer zorlu çevre koşulları engel sayılmaz, çünkü buralarda yaşayan canlılar çevrelerinin bu zor koşullarına adapte olmuşlardır. Sonuç olarak, bu canlılar insanlarda yararlı olabilecek yeni genlerin, proteinlerin ve metabolik işleyişlerin, zengin ve değerli gen kaynakları olarak düşünülmektedir. Ticari amaçlı kullanıma elverişli, yeni özelliklere sahip su canlılarının belirlenmesi için yapılan **biyoaraştırma** çalışmaları dünya genelinde sürdürülmektedir. Örneğin, denizlerdeki planktonların belli türlerinin ve salyangozların tümör ve kanser önleyici moleküller bakımından zen-

gin oldukları bulunmuştur. Çevremizdeki sucul ortamın barındırdığı potansiyel biyoteknoloji uygulamalarını daha iyi anlayabilmek için yoğun araştırma çabaları devam etmektedir.

Tıbbi Biyoteknoloji

Kısım 1.1'de rekombinant proteinlerin pek çoğunun insan sağlığı alanında kullanılmak üzere üretildiği görüşünü sunduk. Ancak, bu uygulama **tıbbi biyoteknoloji** alanındaki örneklerden sadece biri. Bölüm 11 tıbbi biyoteknolojinin farklı birçok uygulamasını da anlatmaktadır. Önleyici tıptan, hastalık ve sağlık tanılarına, hastalıkların tedavisine kadar, tıbbi biyoteknoloji insan sağlığını iyileştirmek için tasarlanmış bir dizi ilginç uygulamaya yol açmıştır. Dünya üzerinde 325 milyondan fazla insan biyoteknoloji yoluyla geliştirilmiş ilaçlar ve aşılardan destek almaktadır. Şimdiye kadar birçok etkili uygulama zaten tasarlanmış ve uygulanıyor olsa da, biyoteknoloji yüzyılı tıbbi biyoteknolojinin tarihteki en büyük ilerlemelerini gösterecektir. Bir hastalığın seyrinde insan genlerinin keşfini duyuran, genetik buluş haberlerinin verilmediği bir hafta neredeyse geçmiyor. Televizyonlar, gazeteler ve popüler dergiler hep yeni genlerle ilgili önemli buluşları ve DNA içerikli haberleri başlık olarak veriyorlar (**Şekil 1.11**). Birkaç örnek vermek gerekirse; İnsan Genom Projesinden sağlanan yeni bilgiler hergün bilim insanlarının kusurlu genleri belirlemelerine, orak hücre anemisi, Tay-Sachs hastalığı, kistik fibroz ve kanser gibi genetik hastalıklarla, kısırlık gibi durumların ayrıntılarını çözmelerine yardımcı oluyor. İnsan Genom Projesi, işlevi bozuk genlerin ve genetik bozuklukların belirlenmesine yardımcı olacak yeni genetik test tekniklerinin geliştirilmesine yol açmıştır. Kitapta bu testlerin birçoğunu inceliyoruz. 1000 Genom Projesi, bugüne kadar 629 kişinin DNA'sının ortak genleri üzerinde yaptığı dizi analizlerinde, bunlar arasında 20 000'in üzerinde genetik varyasyonun varlığını gösterdi. Bu varyasyonlar, bizleri hastalıklardan koruyacak olası yararları bakımından kapsamlı olarak incelenmekteler.

Hastanın genomuna normal genler aktarılarak veya hastalık yapan genlerin normal genlerle değiştirilmesi yoluyla genetik hastalıkların tedavi edilmesini sağlayan **gen terapisi** yaklaşımı da öncü uygulamalardandır. Yakın bir gelecekte bu teknolojilerin daha da yaygınlaşacağı beklenmektedir. Tıbbi biyoteknolojide en umut verici uygulamalardan **kök hücre** teknolojileri en yenilerden olmalarına karşın, bütün bilimsel çalışmalar içinde en fazla tartışılan başlıklıklar arasında yer almaktadır. Kök hücreleri, vücudun sinir, kas, kan gibi hemen her çeşit doku tipine uygun formlara dönüşebilecek potansiyele sahip, gelişmemiş, immatür, hüc-



ŞEKİL 1.11 Genler Haber Başlıklarının Yeni Konuları Televizyon, gazete ve dergi başlıkları sıklıkla hastalıklarla ilişkili genlerin keşfi ve DNA ilişkili diğer yeni gelişmeler konusunda haberler taşımaktadır.

relerdir. Kök hücreleri bir laboratuvarda yetiştirilebilir ve farklı kimyasallarla muamele edildiklerinde, ihtiyaç duyulan bir doku formunu oluşturacak hücrelere dönüştürülebilirler. Bu şekilde, insan vücudunda hasar görmüş bir dokunun değiştirilmesinde kullanılabilecek, nakil için elverişli dokular elde edilmiş olur. Kök hücre konusunda potansiyel birçok ilginç uygulama söz konusudur, ancak gelecek kısımda ve Bölüm 11'deki açıklamalarda göreceğiniz gibi, bu konuda pek çok bilimsel, etik ve yasal karmaşa bulunmaktadır.

Biyoteknoloji Mevzuatı

Biyoteknoloji ticaretinin önemli bir yönü de, endüstriyi yöneten düzenleyici süreçleri içermesidir. Bu süreçler çoğunlukla bir ilaç şirketinin geliştirdiği ilacı, güvenlik ve etkinliğini artırmak için, piyasaya çıkarmadan önce özel kurallar çerçevesinde değerlendirmesine benzer. Biyoteknoloji ürünlerinin çoğu da kullanıma sunulmadan önce benzer şekilde dikkatlice test edilmelidir. FDA biyoteknoloji ürünleri için standartları belirlemiş olmasına rağmen, çoğu zaman ABD Tarım Bakanlığı ve Çevre Koruma Dairesi de bu süreçte yer alır. Aslında biyoteknolojinin en ağır yasaların uygulandığı sektörlerden biri olduğu söylenmektedir. Yasal süreçlerin, **kalite güvencesi (KG)** ve **kalite kontrol (KK)** olmak üzere, iki önemli yönü vardır. Kalite güvencesi, son ürün kalitesine ulaşana kadarki tüm işlemler için yapılacak düzenlemeleri kapsarken; kalite güvencesinin bir aşaması olan kalite kontrol, tutarlı ürün standardını sağlamak için yapılan laboratuvar testleri ile süreç ve uygulamaların izlenmesini içermektedir. KG ve KK, biyoteknoloji ürünlerinin saflık ve performans bakımından standartlara uygunluğunu sağlayacak sıkı kurallar getirmektedir. Bu kurallar ayrıca biyoteknoloji ürünlerine patent verilmesi ve bunların klinik deneylerde hastalar üzerinde kullanılabilmeleri için de gerekli yasal düzenlemelerdir. Bunları ve diğer biyoteknoloji ilişkili yasaları Bölüm 12'de değerlendiriyoruz.

Biyoteknoloji "Genel Çerçeve"

Biyoteknolojinin farklı türlerini bağımsız olarak tanımlamamıza rağmen, bunların ayrı ve birbirleriyle ilişkisiz disiplinler olduklarını düşünmeyin. Biyoteknolojinin hemen tüm alanları karşılıklı yakın ilişki içindedirler. Örneğin, biyoremediyasyon uygulamaları ağırlıklı olarak mikroorganizmaların (mikrobiyal biyoteknoloji) kullanılmasına dayanır. Hatta tıbbi biyoteknoloji bile, rekombinant proteinlerin üretimi için mikroorganizmalardan yararlanır. Biyoteknolojinin bütün alanları benzer düzenlemelerle sürdürülmektedir. Biyoteknolojinin gerçek değerinin bilinmesi "genel çerçeve"nin – biyoteknoloji nasıl çeşitli bilim dallarını içerir ve biyoteknolojinin farklı türleri birbirlerine nasıl bağımlıdır – anlaşılması ile olanaklıdır. Birçok bilim dalının bu karşılıklı bağımlılığı, yirmibirinci yüzyılda önemli problemleri çözmede test edilecektir.

1.3 Yirmibirinci Yüzyılın Biyolojik Sorunları

Sayısız sorun ve zorluklar biyoteknoloji kullanılarak çözülme potansiyeline sahiptir. Büyük zorlukların pek çoğunun – insanları tehdit eden ölümcül hastalıkların iyileştirilmesi gibi – üstesinden gelmek için karşılaşılan engeller aşılmaz değildir. Cevaplar, bizim biyolojik işlemleri daha iyi anlayarak, bunlardan uyarlanmış biyoteknolojik çözümler tasarlama yeteneğimizdedir. İçinde bulunduğumuz yüzyılda biyoteknolojinin toplumu etkileyebileceği bütün yollar hakkında yorum yapmanın aksine (çünkü imkânsız!), bu kısımda özellikle tıbbi biyoteknolojinin önümüzdeki yıllarda hayatımızı nasıl değiştireceği hakkında birkaç baştan çıkarıcı fikirden bahsedeceğiz. Gelecek bölümlerde bu fikirleri çok daha ayrıntılı olarak inceleyeceğiz.

Yeni Biyoteknoloji Yüzyılı Nasıl Olacak?

Tarih 2001 yılının biyoteknoloji için bir dönüm noktası olduğunu yazacak. Dünyanın en ünlü biyologlarından bazıları Şubat 2001'de bir basın toplantısıyla, İnsan Genom Projesinin büyük bir başarısı olarak, insan genomunun kaba bir taslağının yayınlandığını duyurdular. İnsan kromozomlarının DNA dizilişi – A, G, C ve T harfleriyle okunur – neredeyse tamamlanmıştı. Bu toplantının bir sürprizi de, insan genomundaki genlerin sayısının, beklenen 100 000'in çok altında olduğunun açıklanmasıdır. Diğer bölümlerde öğreneceğiniz gibi, İnsan Genom Projesi 2003 yılında tamamlanarak, biyoteknolojide ilginç yeni atılımların yolunu açmış oldu.

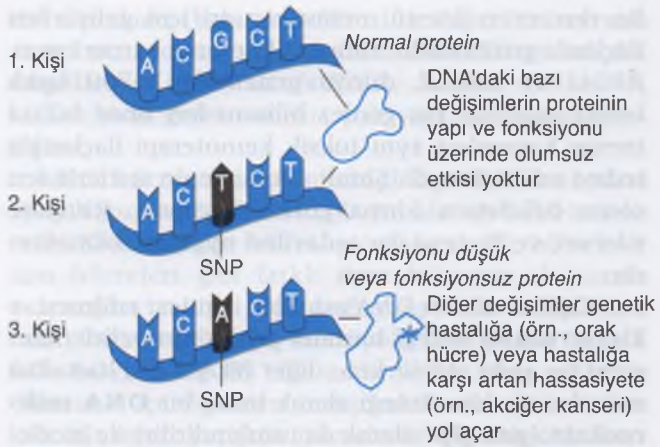
İnsan genomundaki tüm genlerin kromozomlar üzerindeki yerlerinin ve dizilişlerinin belirlenmesi, insan genetiğinin karmaşık yapısını daha iyi anlamamızı sağladı. Moleküler biyoloji ve insan genlerinin fonksiyonlarıyla bu genlerin işleyişlerini kontrol eden faktörler üzerindeki temel araştırmaların sonucunda; genlerin hücre faaliyetlerini nasıl yönettiği, normal genlerin nasıl çalıştığı ve hatalı genlerin insanlarda hastalık yapan koşulları nasıl oluşturduğu konularında tahmin edilemeyen boyutlarda öngörü kazanılmıştır. İnsan genlerini anlamak bize ayrıca diğer canlıların genleri üzerinde çalışma olanağı da sağlayacaktır. Belki, bu canlıların hastalıklarla mücadelede geliştirdikleri biyokimyasal yöntemleri keşfetmek, insan hastalıkları için de yeni uygulamaların bulunmasına neden olabilecektir.

İnsan genetik hastalık durumlarının iyi anlaşılması bugünkü tıp uygulamalarını da değiştirecektir. Tıbbın yeniçağı ufukta. Fakat İnsan Genom Projesi hatalı genleri bulup, hastalıkları hemen iyileştirmemizi sağlayacak, hızlı ve basit bir yol mudur? Eğer öyle olduğunu düşünüyorsanız, biyolojinin karmaşık yapısını hafife alıyorsunuz demektir. İnsan genomu bütün sağlık sorunlarımızı çözecek "biyolojik kristal küre" değildir. İnsan genlerinin hepsini bulmak, bu genlerin bizim hastalıklara karşı hassas veya dayanıklı olacağımızı nasıl belirlediklerini anlamamız için, buzdağının sadece ucudur. Bilim insanları insan genlerinin nasıl çalıştıklarının, genlerin ve proteinlerin hastalıklara nasıl neden olduklarının sırlarını çözmeye devam ediyorlar. İnsan hastalıklarının daha iyi anlaşılması, genlerin kodladıkları proteinlerin, **proteom**un - insan hücrelerinden sorumlu proteinlerin toplamı - yapı ve fonksiyonlarının bilinmesini gerektirir. Fakat ne genom ne de proteom sağlığımız ve hayatımızın nasıl olacağını önceden belirleyen bir yazılım programı değildir. Sadece insan genomunun ve insan proteomunun gizemlerini ortaya çıkarmak bile, bilimsel keşif sürecinin bir parçası olarak, yirmibirinci yüzyılı en ilginç zaman yapmaya yeter.

Gelecekte Bir Senaryo: İnsan Genom Projesinden Nasıl Yararlanabiliriz?

2020'li yıllarda geçen şöyle bir senaryo hayal edin. Bir adam yerel eczaneye danışıyor. Bu kişi bir süre önce eklem iltihabı için kullandığı ilacını değiştirdi, ancak şimdi kullanmaya başladığı ilaç eskisinden daha iyi değil. Eczacısına "Bu ilaç hem çok pahalı hem de son kullandığımdan daha iyi fayda vermiyor. Fakat satın almış olduğum ilacı atıp israf etmek de istemiyorum." diyor. "Doğru, bazen ilaçlar herkes için aynı derecede etkili olmuyor." diye cevap veriyor eczacı. Bu konuşma mevcut sağlık stratejilerine özgü bir zorluğu gösteriyor. Bazı ilaçlar sadece bazı insanlarda etkili oluyor. Biyoteknoloji yüzyılı bu hastaya nasıl yardımcı olacak? İnsan Genom Projesi, bu hastada gördüğümüz gibi, şimdiki sağlık uygulamalarını değiştirebilir.

Eczanedeki adamın yaşadığı problemle halen birçok kişi karşılaşıyor. Eklem iltihabı ve diğer birçok sağlık sorunu için reçetesiz satılan veya her zaman kullanılan reçeteli tedaviler, nadiren herkes için aynı faydayı gösterir. Genom bilgisi doğum öncesinden ileri yaşlara kadar birçok insan için hastalıkların hızlı, hassas ve erken tanı/tedavisini sağlamış ve sağlamaya devam edecektir. Son çalışmalar kireçlenmenin farklı genlerin sebep olduğu değişik formlarının varlığını göstermiştir. Eklem iltihabı ve benzer genetik hastalıklar hakkında bildiklerimizin artması,



ŞEKİL 1.12 Tek Nükleotid Polimorfizmleri Resimde üç farklı kişiye ait bir gen dizisinin küçük parçaları temsil edilmektedir. Basitleştirmek için DNA molekülünün sadece bir zinciri gösteriliyor. 2. kişiye ait gende protein yapısı ve fonksiyonuna etki etmeyen SNP'in varlığına dikkat edin. Hâlbuki 3. kişi aynı gende farklı bir SNP'e sahip. Buradaki küçük genetik değişiklik, bu kişinin bir ilaca göstereceği yanıtı veya bir genetik hastalığa yakalanıp yakalanmayacağını etkileyecektir.

daha sağlıklı yaşam biçimlerini getirecek önleyici tıp yaklaşımlarını ve bu hastalıkların daha güvenli, daha etkili tedavi yollarını bulmamızı sağlayacaktır.

Şimdi, yukarıda bahsedilen hastanın eklem iltihabı sorununa yardımcı olmada, bu hastalığa neden olan genlerin belirlenmesinin ne gibi yararları olacağını düşünelim. İnsan Genom Projesi başlangıcından itibaren hastalık oluşturan durumları belirleyip tanı koymamızı sağlayacak veriler üretti. Hastalık genlerinin belirlenmesi, bilim insanları ve hekimlerin birçok genetik hastalık için tarama yapabilmelerini mümkün kıldı. Bu taramalar gelecekte genişleyerek devam edecektir. Genetik hastalıklara yol açan koşulların tanısında büyük fayda sağlaması beklenen alanlardan biri, **tek nükleotid polimorfizmleri**dir (**SNP** – "snip" olarak okunur). SNP'ler, kişiden kişiye farklılık gösteren, DNA dizilerinde tek nükleotid değişimleri veya **mutasyon**larıdır (**Şekil 1.12**). Bu hafif değişiklikler insanlardaki genetik farklılıkların en yaygın örnekleridir.

SNP'ler orak hücre anemisi gibi genetik hastalıkların nedenleridir. Bilim insanlarının çoğu SNP'lerin eklem iltihabı, felç, kanser, kalp hastalıkları, şeker, duygu ve davranış bozuklukları gibi birçok tıbbi durumun nedeni olan genlerin belirlenmesine yardımcı olacağına inanmaktadır. Üzerinde çalışılan genlere bakıldığında; ortalama olarak her bireyin, fonksiyon kaybına neden olan 250-300 farklı form (varyant) taşıdığı ve bunların da 50-100 kadarının kalıtsal bozukluklara neden olduğu bulunmuştur.

Bu durumun önemi meme kanseri için geliştirilen ilaçlarda gözlenebilir. Bilinen iki meme kanseri geni, *BRCA1* ve *BRCA2*, dünya genelinde 1 700 farklı forma sahiptir. Bu genler bilinmeden önce bütün meme kanserleri aynı toksik kemoterapi ilaçlarıyla tedavi edilmekteydi. Şimdi, bu iki genin testlerinden sonra belirlenen forma göre, Herceptin, Rituxan, Gleevec ve Tarceva ilaç tedavileri uygulanabilmektedir.

Kişiden alınan DNA'nın SNP için test edilmesi, o kişinin taşıyabileceği hastalık genlerinin belirlenmesinin bir yolu olabilirken; diğer bir yol da, hastadan az miktarda kan örneği alarak bunu bir **DNA mikrodizin** (**gen çipi** olarak da isimlendirilir) ile incelemektir. Mikrodizin binlerce DNA dizisi içerir (Bölüm 3). Bilim insanları gelişmiş bilgisayar analizleriyle bir hastadaki SNP'leri, hastanın DNA'sı ve mikrodizindeki DNA'ların bağlanma biçimlerini karşılaştırarak belirleyebilir. Örneğin araştırıcılar, eklem romatizması hastalığında sentezlenen genlerin dizileri bakımından bir hastanın DNA'sını taramak için mikrodizin kullanabilirler.

DNA çipleri ayrıca, bunların DNA-tabanlı bilgisayarlar olarak potansiyelleri bakımından da araştırılmaktadır. Bilim insanları çip üzerindeki DNA moleküllerinin klasik bilgisayarlardaki silikon-tabanlı çiplere benzer biçimde işleyen, mantık geçidi olarak da çalışabileceğini varsaymaktalar. Bilgisayarda DNA? Bizi izlemeye devam edin.

SNP'lerin keşfi **farmakogenomik** adlı, halen başlangıç aşamasında olan, bir alanın da doğuşuna neden olmuştur. Farmakogenomik kişiye özel ilaç anlamı taşır. Bu uygulamada ilaç alımı ve tedaviler hastanın genetik profiline göre şekillendirilir – yani, en etkili ve özel tedaviyi belirlemek için hastanın genetik bilgileri kullanılır (Şekil 11.7'ye bakınız). Farmakogenomik sağlık sorunlarımızın bir kısmını çözebilir mi? Hekimler şimdilik tahminde bulunabiliyorlar. Ancak birgün, doğru araçlar ve insan gen bilgileriyle bu değişecek.

Farmakogenomik 2020'de eklem iltihaplı hastamıza eczanede yardımcı olabilir. Eklem iltihabının bazı kişilerde aileden kalıtsal olarak gelen bir hastalık olduğunu biliyoruz ve daha önce bahsettiğimiz gibi, birçok gen farklı biçimlerde görülen eklem iltihabına yol açabilmekte. Birçok durumda ise eklem iltihabının belirgin bir kalıtsal yolu gözlenmiyor. Bu durumlarda belki de başka genler veya kalıtsal olmayan faktörler söz konusudur. Hastamızın basit bir kan testi DNA'nın SNP ve mikrodizin analizi için kullanılabilir. SNP ve mikrodizin verileri, bu hastanın sahip olduğu eklem romatizması türünde hangi genlerin rol aldığını belirleyebilir. Bu genetik bilgiye sahip olan bir hekim, söz konusu hastada görülen eklem iltihabının tedavisine *özel* ve *daha etkili* bir ilaçlı tedavi planı – ilişkili genlere göre – hazırlayabilir. Farklı bir genetik profile sahip ikinci hastada ise, onda gözlenen eklem iltihabı türüne bağlı olarak, birinciden değişik bir tedavi uygulanabilir. Bu durum farmakogenomiğin uygulamadaki yetkinliğini göstermektedir. Özel tedavi ve yarayışlı uygulamalarda kullanılmak üzere, birgün herkesin tüm genom taramalarının yapılmış olacağı öngörülmektedir. Elbette sağlıkla ilişkili bu gen taramaları etik biçimde olmalı ve düzgün güvenlikle sağlık hizmetleri sistemiyle bütünleştirilmelidir.

Farmakogenomiğin aynı ilkeleri kanser gibi diğer hastalıklara da uygulanabilir. Büyük olasılıkla bildiğiniz gibi, **kemoterapi**de kullanılan birçok kanser ilacı kanserli hücrelere karşı etkili oldukları kadar, normal hücreleri de etkilemekteler. Saç dökülmesi, cilt kuruması, kan hücre sayımlarındaki değişimler ve bulantı gibi yan etkiler kemoterapinin normal hücrelere olan etkisinden kaynaklanmaktadır. Eğer diğer hücre ve dokulara etkisi olmayan, sadece kanser hücrelerine karşı etkili ilaçlar tasarlanabilirse ne olur? Bu, kanserin genetik esasları daha iyi anlaşıldığında mümkün olabilir ve ilaçlar farklı kanser tiplerinin genetiğine göre tasarlanabilir. Ayrıca SNP ve mikrodizin bilgileri, bir kişinin hastalığın belirtilerini göstermeden çok önce hangi tip kansere yakalanma riski bulunduğunu ortaya çıkarmakta da kullanılabilir; özellikle ailesinde bu hastalık daha önce görülmüşse. Böyle bir bilgi kişinin perhiz, egzersiz alışkanlığı gibi hastalığı önlemede önem taşıyan yaşam tarzı değişiklikleri yapmasına da yardımcı olur.

İnsan genotip farklılıklarını incelemenin yararlarına örnek bir diğer alan da **metabolomik**dir; hücre metabolizması sırasında üretilen glikoz, kolesterol, ATP ve sinyal molekülleri gibi küçük moleküllerin biyokimyasal dökümü olarak tanımlanır. Bu döküm direkt olarak fizyolojik durumu yansıtır ve ilaçların hastalığın aşamaları üzerindeki etkisini gözlemekte kullanılabilir. İnsan metabolitlerinin tam sayısı bilinmemekle birlikte, 2 000 ve 10 000 arasında tahminlerde bulunulmuştur. Bu yöntemin kullanımı, hastalık süreci ve fizyolojik adaptasyonun farkını gösterebilecek; ilaç geliştirmenin ilk aşamalarında kullanıldığında zaman ve paradan tasarruf sağlayacaktır. Örneğin, kısa süre önce büyük bir ilaç şirketinin desteklediği çalışmada, fare gruplarına kolesterolü artıran bir beslenme rejimi uygulandı. Sonra bunların plazma lipidleri, yağ dokuları ve karaciğerleri aralıklarla birkaç hafta boyunca karakterize edildi. Bu beslenme rejimine yanıt olarak sonuçta 500'ün üzerinde "olağan dışı" lipid belirlendi. Fare gruplarından birinin damar sertliğine hassas olması, bu hastalığın fizyolojisi nedeniyle farklı bir yanıtın ölçümünü de sağlamış oldu.



ŞEKİL 1.13 Nanobiyoteknoloji Görevde Kemoterapi etkin maddesi içeren nanoparçacıklar, tümöre özgü proteinlerle kaplanarak, özellikle hedef kanser hücrelerine bağlanacak şekilde bu hücrelere yönlendirilebilir. Hücre membranını geçemeyen kemoterapi etkin maddeleri bu yolla membranı geçip hedef kanser hücresi içine bırakılmış olur.

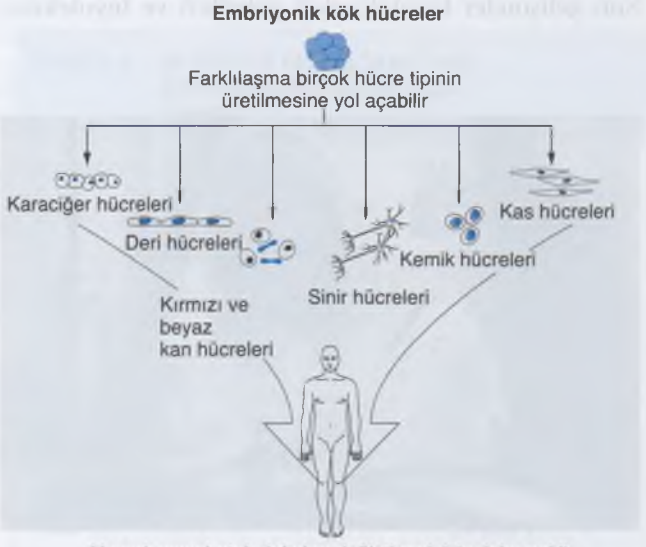
Bölüm 11'de **nanoteknoloji**yi, çok küçük ("nano" ölçekte) aparatlar içeren uygulamaları, tartışıyoruz. Nanoteknoloji, önemli bir araştırma sahası olarak hızla ortaya çıkan, tamamen yeni bir alan. Nanoteknolojinin geleceği parlak uygulamalarından biri, ilaçları hedef hücrelere taşıyacak küçük parçacıkların geliştirilmesidir (**Şekil 1.13**).

İlaç tedavilerindeki ilerlemelere ek olarak, genetik hastalıklarla mücadelede gen terapisi en son yöntemlerden birini temsil etmektedir. Gen terapisi teknolojileri hatalı gen bölgesine normal kopyalarının eklenmesi veya değiştirilmesi temeline dayanır. Bu yaklaşımın potansiyel etkinliğini düşünün. Bilim insanları sağlıklı genlerin insanlara aktarılması için, bu genlerin insan hücrelerine taşınmasında virüslerin kullanılması gibi, çeşitli yöntemler üzerinde çalışmaktalar. Bazı kan hastalıkları ve Parkinson gibi sinir sistemi hastalıklarının iyileştirilmesi için ümitvar teknikler geliştirildi (Şekil 1.13). Ancak gen terapisinin hastalıkların tedavisinde güvenli, pratik, etkin ve iyi yapılandırılmış bir yöntem olabilmesi için, halen aşılması gereken birçok engel bulunmaktadır.

Bugün karşılaşılan bazı sakıncalar gen terapisinin insanlarda yaygın olarak kullanılmasını engellemektedir. Örneğin, normal genler vücuttaki tüm hücrelere nasıl ulaştırılacak? İnsanlara dışarıdan fazladan gen verilmesinin uzun dönemde ne gibi etkileri olacak? Bu ilave genler vücuda verildikten sonra, normal proteinin düzgün bir şekilde sentezleneceğinden emin olmak için ne yapılmalı? Gen terapisi uygulamaları, birçok hastanın trajik ölümüyle sonuçlanan komplikasyonlar nedeniyle, sıkı denetim altındadır (bakınız Bölüm 11). Diğer bir heyecan verici yeni teknoloji, genetik bozuklukların **küçük engelleyici RNA**'lar **(siRNA**; bakınız Bölüm 3) kullanılarak gen susturma yoluyla modifiye edilmesidir.

Kök hücre teknolojilerinin de hastalıkların tedavi ve iyileştirilmesinde etkili bir yol olacağı beklenmektedir. Kök hücreler, bölünüp çoğalarak cilt, böbrek ve kan hücreleri gibi farklı tipte hücreler oluşturma yeteneğine sahip, olgunlaşmamış hücrelerdir. Kök hücrelerin çoğunluğu embriyolardan **(embriyonik kök hücre – EKH)** elde edilir ve bu işlem embriyo ölümünü içerdiğinden tartışmalıdır. Bilim insanları kök hücreleri yetişkin hücrelerden **(yetişkin kaynaklı kök hücreler – YKH)** de başarıyla izole ettiler. YKH, sinir dokularının yenilenmesindeki ve diğer dokularda hastalıklar nedeniyle oluşan hasar ve kayıpların giderilmesindeki potansiyelleri bakımından, embriyonik emsalleriyle karşılaştırılmaktadır. Ayrıca, embriyolara hasar vermeden kök hücre elde etmede büyük bir kaynak olabilecek **indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPKH** veya **iPSCs)** hakkında da bilgi sahibi olacaksınız.

Kök hücreler, nasıl işlendiklerine bağlı olarak, hemen hemen her dokuya uygun hücre üretebilecek biçime getirilebilirler. Kök hücreleri kullanarak laboratuvarda deri hücreleri, kan hücreleri hatta bütün bir



ŞEKİL 1.14 Embriyonik Kök Hücre Birçok Farklılaşmış Hücre Tipine Kaynak Olabilir Embriyonik kök hücreler (EKH) embriyolardan veya erken dönem fetustan alınır; değişik hücre tiplerine dönüştürülebilecek olgunlaşmamış hücrelerdir.

organı yetiştirdiğinizi; bunları hasarlı dokuların, işlevini kaybetmiş karaciğer, pankreas ve retina gibi organların yerine naklettiğinizi düşünün (**Şekil 1.14**). Bu yaklaşımı tanımlamak için **rejeneratif tıp** deyimi kullanılır. Gelecekte bilim insanları genetik düzensizliği olan hastalardan kök hücreleri toplayıp, gen terapisi yoluyla bunları düzenledikten sonra aldıkları hastaya tekrar vererek, genetik hastalıkları tedavi edebilirler.

Tıbbi biyoteknolojideki olağanüstü ilerlemeler bakımından geleceğin aslında nasıl aydınlık olduğunu, bu kısımdaki örneklerle gösterebildiğimizi umuyoruz. Farmakogenomik, gen terapisi ve kök hücre teknolojileri bizim genetik sorunlarımızın hepsinin çözümünü vermemekte; ancak genetik teknolojilerde hızla devam eden gelişmelerle, bugün için çözümsüz görünen sorunlar, yakın zamanda o kadar da üstesinden gelinemez olmayabilir. Biyoteknoloji yüzyılında tıptaki uygulamaların belli başlı örneklerini sunduk burada. Fakat gelecek bölümlerde biyoteknolojinin yaşamımızı daha iyiye doğru değiştirecek diğer alanlarının heyecan verici uygulamalarını öğreneceksiniz. Biyoteknoloji dünyası tanıtımını bu endüstrideki kariyer olanaklarını tartışarak tamamlayacağız.

1.4 Biyoteknoloji İşgücü

Dünya biyoteknoloji yüzyılına nasıl hazırlanacak? Son gelişmeler biyoteknoloji şirketleri ve biyoteknoloji endüstrisinde iş arayan kişiler için bir dizi yeni fırsat yarattı (**Şekil 1.15**).



ŞEKİL 1.15 Biyoteknoloji Endüstrisi Birçok Alandan Bilim İnsanlarına İlginç Fırsatlar Sunuyor Biyoteknoloji endüstrisi biyolog ve kimyagerlerden mühendislere, bilgi teknolojistlerine ve satış elemanlarına kadar geniş bir yelpazede ileri teknoloji iş olanakları sunmaktadır. Resimde son sınıftaki bir lisans öğrencisi biyoteknoloji araştırma projesinde çalışırken görülmekte. Lisans eğitimi yaparken araştırma deneyimi kazanmak, biyoteknolojide kariyer yapmaya hazırlık için mükemmel bir yoldur.

Sonuçta biyoteknoloji şirketleri karmaşık verileri rahatlıkla analiz edebilecek ve deneyimlerini takım ruhuyla, sorun-çözen bir çalışma ortamında paylaşacak insanlar arıyorlar. Biyoteknoloji işgücü, bilimin birçok alanındaki yetenekli insanların önemli katkılarına güvenmektedir.

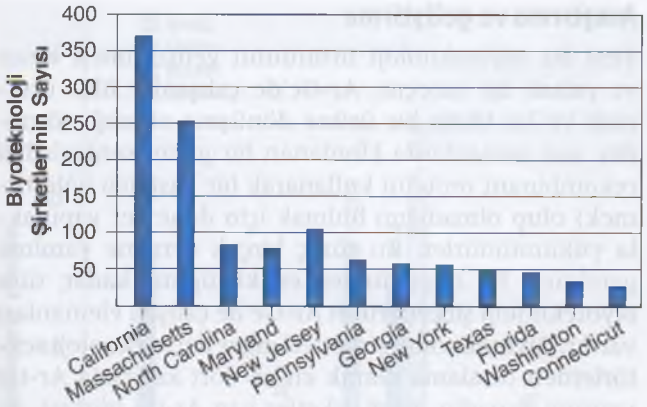
Biyoteknoloji İşletmesi

1976'da, San Francisco/Kaliforniya yakınlarında Genentech A.Ş. adlı küçük bir şirket kuruldu. İlk biyoteknoloji şirketi olarak bilinen Genentech'in, şeker hastaları için insan insülinini üretmedeki başarısı, bu heyecan verici endüstrinin doğmasına yol açtı. Bugün biyoteknoloji, satışa sunduğu yüzlerce üründen sağladığı 63 milyar dolardan fazla gelirle dünya çapında bir endüstridir. ABD'deki rakamları ifade eden bu gelirin 40 milyar doları biyolojik ilaçları (enzimler, antikorlar, büyüme faktörleri, aşılar ve hormonlar gibi) kapsamaktadır. Sadece ABD'de, insanların yaklaşık % 40'ı kanser teşhisi ile yüzyüze geldiklerinden, birçok biyoteknoloji şirketi kanser tedavisi üzerinde çalışmaktadır. Kanser ABD'de kalp hastalıklarından sonra ikinci önemli ölüm nedenidir. Hâlen kanser, şeker, kalp hastalıkları, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları, eklem iltihabı, AIDS ve diğer birçok hastalığın tedavisini hedefleyen 350'nin üzerinde biyoteknoloji ürünü geliştirilme aşamasındadır.

Dünyada 54 ülkede sayıları 4 900'ü aşan biyoteknoloji şirketlerinin yaklaşık % 95'i Kuzey Amerika, Avrupa ve Japonya'dadır. **Araştırma ve geliştirme (Ar-Ge)** geçmişleri olmayan ülkeler bile, yüksek-teknoloji buluşları için yönlerini biyoteknolojiye çevirmekteler. Örneğin, biyoteknoloji Çin ve Hindistan'da hızla gelişen bir endüstridir. Ancak dünya lideri biyoteknoloji şirketleri hala ABD'de yerleşiktir (bakınız **Şekil 1.16**). ABD'de halen 1 500 dolayında biyoteknoloji şirketi var ve bunların pek çoğu üniversitelerle ilişkili veya biyoteknoloji uygulamaları için temel bilimlerde fikirlerin üretildiği büyük üniversitelerin yakınında yer almaktalar. Biotechnology Industry Organization internet sitesine girip ABD'deki biyoteknoloji şirketleri hakkında bilgi edinebilirsiniz. Bu sitede ayrıca bulunduğunuz bölgedeki (çevirenin notu: ABD'de) biyoteknoloji şirketlerini ve ürünlerini de bulabilirsiniz.

Biyoteknoloji Şirketi Nedir?

Şimdiye kadar belki "biyoteknoloji şirketi ile ecza şirketi arasındaki fark nedir?" diye merak ettiniz. Birçok kişi Merck, Johnson & Johnson veya Pfizer gibi ecza şirketlerinin isimlerini bilir, çünkü kendileri veya



ŞEKİL 1.16 ABD Biyoteknoloji Şirketlerinin Dağılımı ABD genelindeki devlet ve özel sektör biyoteknoloji şirketleri.

yakınları bu şirketlerin ürünlerinin kullanmışlardır. Ancak pek çoğu biyoteknoloji şirketlerinin isimlerini veya bunların ecza şirketlerinden ne farkı olduğunu bilmez (Tablo 1.3). Bu büyük ecza şirketleri genellikle "dev ecza" olarak bilinirler. Genel bir anlatımla, **ecza şirketleri** kimyasal sentezleme veya bileşiklerin saflaştırılması yoluyla, soğuk algınlığı ilaçları, aspirin, antasit gibi ilaçları geliştirme işiyle uğraşırlar. Ecza şirketleri bir ürün (rekombinant protein gibi) geliştirmek ve üretmek için biyoteknoloji şirketlerinde kullanılan canlı organizmaları kullanmazlar. Fakat günümüzde bu ikisi arasındaki fark çok da belirgin değildir; çünkü birçok büyük ecza şirketi, ya kendileri ya da bir biyoteknoloji şirketiyle ortak olarak, biyoteknoloji-ilişkili araştırma ve ürün geliştirmeyle ilgilenmekteler. Aynı zamanda, biyoteknolojinin ilaç geliştirmekten daha fazlasını içerdiğini de unutmayalım. Çalışmalarını biyoteknolojinin belirli alanlarına yoğunlaştırmış irili ufaklı birçok şirket vardır.

Biyoteknoloji şirketlerinin büyüklüğü, 50'den az kişinin çalıştığı küçük şirketlerden, 300'ün üzerinde çalışanı bulunan büyük şirketlere kadar değişiklik gösterir. Tarihsel olarak birçok biyoteknoloji şirketi, küçük bir **kurucu şirket** olarak, geleceği parlak bir ürüne (hastalık tedavisi için bir rekombinant protein gibi) sahip olduklarına inanan bir grup bilim insanının bir araya gelmesiyle başlamıştır. Bu grup daha sonra, laboratuvarlarını araştırmalarına devam etmede ve ürünü geliştirmede gerekli alet ve donanımlarını satın almalarını finanse edecek yatırımcılar arar. Ancak bir biyoteknoloji şirketini başlatmak riskli iştir; kurucu şirketlerin ortalama % 40'ı yatırımcılarına hiçbir getiri sağlamadan kapanmaktadır.

Biyoteknoloji kurucu şirketleri, başlangıçtaki potansiyel başarılarına bağlı olarak sağladıkları, **risk sermayesi (RS)** fonları gibi şirket mali yatırımlarına dayanırlar. RS fonlarının kaynağı kişiler, finans kurumları ve diğer şirketler olabilir. RS fonları, geliştirilecek umut verici bir teknolojiye sahip kurucu şirketlerde, özkaynak edinilmesiyle para kazanırlar. **Melek yatırımcılar** – şirkete sahip olma karşılığında başlangıçtaki yatırım sermayesi parasını veren varlıklı kişiler – kurucu biyoteknoloji şirketinin ürününü geliştirmek için gerekli araştırma ve testlerin yapılmasında kullanılacak fonları sağlamada anahtar rol oynarlar.

RS yatırımları biyoteknoloji şirketlerinin desteklenmesini sağlayan önemli fon gelirleridir. 2007-2008 arasında biyoteknoloji RS yatırımlarında % 46'lık azalma olduğundan, son global finans krizi süresince birçok biyoteknoloji şirketi sadece 12 ay ya da daha az süre için yeterli nakit akışına sahip olabilmiştir.

Sonuç olarak, eğer bir kurucu biyoteknoloji şirketi pazara bir ürün sunmada başarılı olursa (bir ilaç için 10 yıl dolayında bir süre ve ABD'de ortalama 1 milyar doların üzerinde maliyet gerektirmekte), çoğunlukla birçok kurucu şirket daha büyük ve köklü şirketler tarafından satın alınır. Gelecek için umut veren bir ürünü pazara sunulmaya hazır hale getirmek, sonuçta şirketi değerli kılar. Bu durumdaki şirket ilk kez **halka arz (HA)** için başvurabilir,

TABLO 1.3 EN YÜKSEK GELİRE SAHİP BEŞ BİYOTEKNOLOJİ VE BEŞ ECZA ŞİRKETİ

Biyoteknoloji Şirketleri	Gelir (Milyon)
Amgen	14 268 $
Genentech (şimdi Roche'a ait)	11 724 $
Genzyme	3 187 $
UCB	3 169 $
Gilead	3 026 $
Ecza Şirketleri	
Johnson & Johnson	61 897 $
Pfizer	50 009 $
Roche	49 051 $
GlaxoSmithKline	45 830 $
Novartis	44 267 $

Ernst and Young, *Beyond Borders: Global Biotechnology Report 2010* (www.ey.com/beyondborders)'dan uyarlanmıştır. Gelirler şirketlerin bildirdikleri ön değerlendirmelere dayandırılmıştır.

yani şirketin hisse payları satılmak üzere halka sunulur.

Biyoteknoloji şirketleri ve ecza şirketlerinin organizasyon yapıları birbirine benzer (**Şekil 1.17**). Bu konunun birçok yönünü, her alandaki biyoteknoloji şirketinin iş olanaklarını tanımladığımız gelecek kısımda tartışacağız.

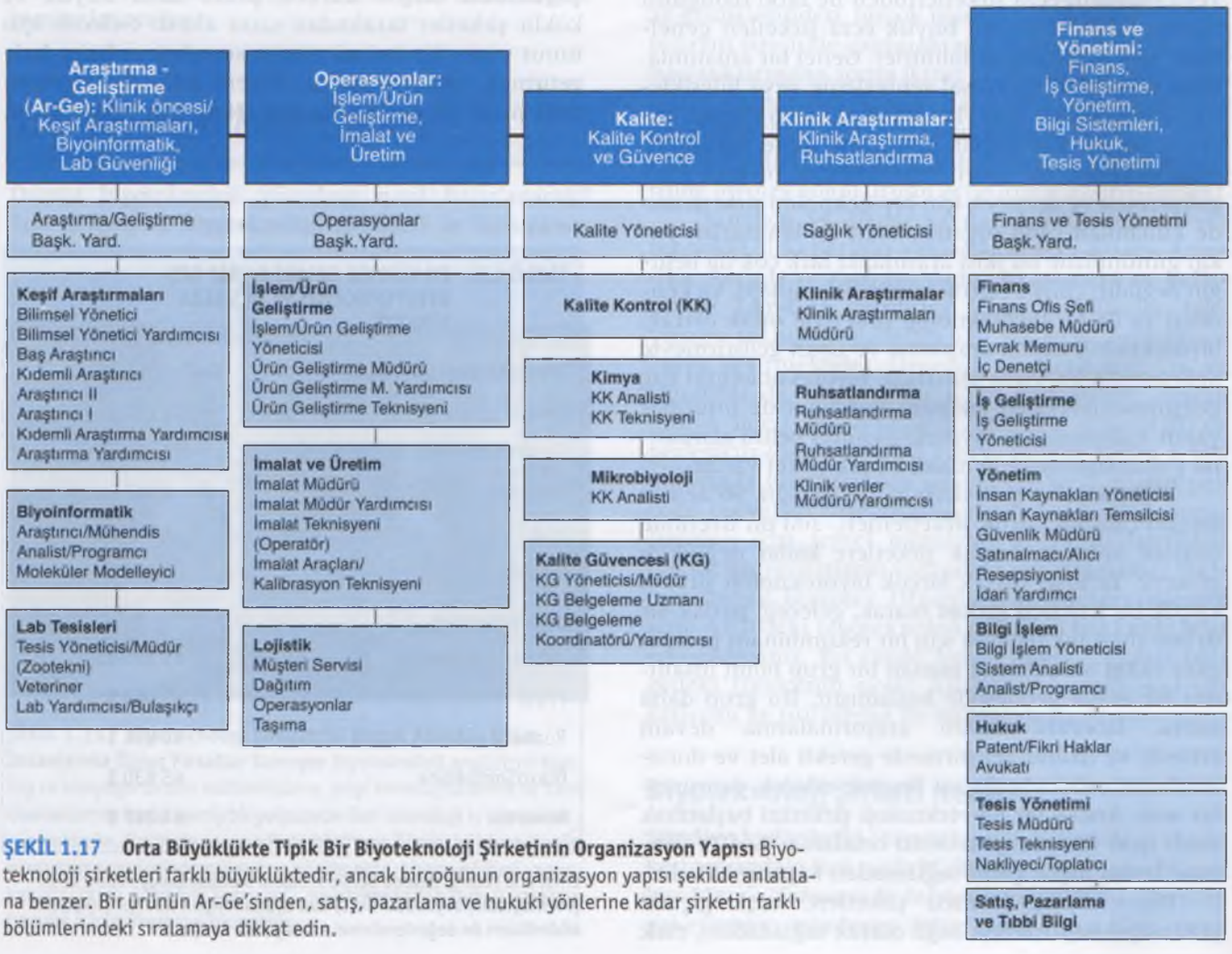
Biyoteknolojide İş Olanakları

ABD'de biyoteknoloji sektörü 200 000'den fazla insana iş sağlamaktadır. Biyoteknoloji temel araştırma ve geliştirmede teknisyenlik, bilgisayar programcılığı, laboratuvar yöneticiliği, satış ve pazarlamacılık gibi sayısız iş seçeneği sunmaktadır. Bu mesleklerin hepsi de biyoteknoloji endüstrisi için gereklidir. Bu kısımda biyoteknolojide geçerli meslek gruplarından bazılarını değerlendireceğiz.

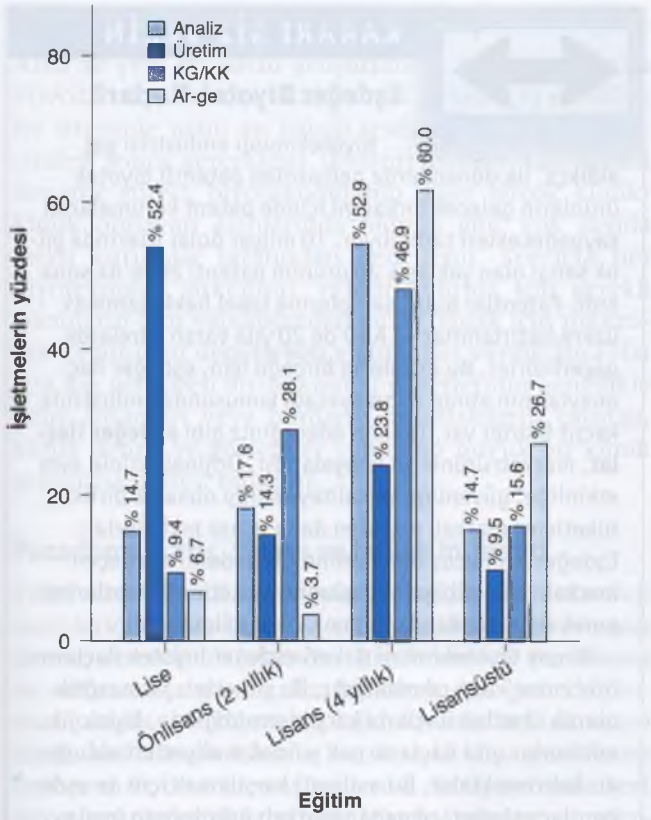
Araştırma ve geliştirme

Yeni bir biyoteknoloji ürününün geliştirilmesi uzun ve pahalı bir süreçtir. Ar-Ge'de çalışanlar fikir üretmek ve bu fikrin bir ürüne dönüşme olasılığı (örneğin, son zamanlarda klonlanan bir genin sentezlediği rekombinant proteini kullanarak bir hastalığı iyileştirmek) olup olmadığını bulmak için deneyler yapmakla yükümlüdürler. Bu süreç birçok deneme yanılma gerektirir. En büyüğünden en küçüğüne kadar, tüm biyoteknoloji şirketlerinin Ar-Ge'de çalışan elemanları vardır. Biyoteknoloji şirketleri diğer ileri-teknoloji sektörlerden ortalama olarak en az dört kat fazla Ar-Ge yatırımı yaparlar. Bazı şirketler için Ar-Ge bütçesi, işletme bütçesinin % 50'sine yakındır. Ar-Ge birçok şirketin can damarıdır – yeni buluşlar olmadan şirketler yeni ürünler yapamazlar.

Ar-Ge kadrolarının çoğunluğu kimya, biyoloji veya biyokimya alanlarında lisans veya önlisans eğitimi istemektedir (**Şekil 1.18**). **Laboratuvar teknis-**



ŞEKİL 1.17 Orta Büyüklükte Tipik Bir Biyoteknoloji Şirketinin Organizasyon Yapısı Biyoteknoloji şirketleri farklı büyüklüktedir, ancak birçoğunun organizasyon yapısı şekilde anlatılana benzer. Bir ürünün Ar-Ge'sinden, satış, pazarlama ve hukuki yönlerine kadar şirketin farklı bölümlerindeki sıralamaya dikkat edin.



ŞEKİL 1.18 **Teknisyenlik İçin Gerekli En Az Eğitim Düzeyi** Resource Grubu, California'nın kıyı şeridinde yer alan üç şehirdeki 69 biyoteknoloji şirketinde, işe başlama eğitim düzeyi hakkında bir sürvey gerçekleştirdi. Sonuçlar ABD'deki diğer bölgelere benzer şekilde, Ar-Ge'nin diğer iş alanlarına göre daha fazla eğitim gerektirdiğini göstermektedir.

yenleri araştırıcıların kullandıkları donanımın temizlik ve düzeni sağlamak, malzeme stoklarını tedarik etmek gibi işlerle yükümlüdürler. Teknisyen kadroları genellikle fen bilgisi önlisans veya biyoloji, kimya lisans eğitimi gerektirir. **Araştırma görevlileri** veya **araştırma yardımcıları** kıdemli ve deneyimli bilim insanlarının denetiminde deneyleri yürütürler. Bu kadrolar biyoloji veya kimya lisans veya yüksek lisans eğitimi ister. Araştırma görevli ve yardımcıları "tezgâh" araştırmacısı olarak bilinirler ve deneyleri bir veya daha fazla kıdemli/baş araştırıcı gözetiminde yürüten kişi olarak değerlendirilirler. Yardımcı ve görevliler araştırmaları diğerleriyle işbirliği yaparak gerçekleştirirler. Deneylerin tasarımı ve uygulanmasıyla sonuçlarının yorumlanmasında yer aldıklarında, literatür taramaları, teknik rapor, lab protokolleri ve veri özetleri hazırlamaları da istenebilir.

Baş veya **kıdemli araştırıcıların** genellikle doktora eğitimi, diğer araştırıcıları yönlendirmek için belli bir araştırma deneyimi ve yönetim yeteneğine sahip olmaları beklenir. Bu kişiler şirketin araştırma liderleri olarak değerlendirilir. Sorumlulukları; şirketin araştırma önceliklerini planlama ve yürütmeyi, konferanslarda şirket araştırma ve geliştirme faaliyetlerinin sözcülüğünü, patent uygulamalarında yer almayı, ilerleme raporlarını yazmayı, hibe başvuruları ve şirketin finans üst yönetimine danışmanlık yapmayı içermektedir. Verdiğimiz bu iş kadroları ve tanımlamaları şirketten şirkete değişebilir; bununla birlikte, eğer yeni bilimsel buluşlar yapmakla ilgiliyseniz, Ar-Ge sizin için heyecan verici bir kariyer seçeneği olabilir.

Biyoinformatiğin hızla gelişen bir diğer alanı da DNA ve protein verilerinin analiz edilip veri tabanında biriktirilmesinde bilgisayarların kullanımıdır ve bilgisayar programlama, istatistik ve biyolojiden anlamayı gerektirir. Son zamanlara kadar birçok biyoinformatik uzmanı, kendilerini moleküler biyolojide yetiştirmiş bilgisayar bilimcileri veya kendilerini bilgisayar, veri analizi ve matematikte yetiştiren moleküler biyologlardı. Bugün bilgisayar bilimleri ile ilgilenenlerin biyoteknoloji dersleri, biyoteknoloji öğrencilerinin ise bilgisayar dersleri almaları özendirilmektedir. Ayrıca, öğrencileri **biyoinformatikçi** olarak eğitmek üzere dört yıllık kolej ve üniversitelerde, teknik ve meslek yüksekokullarında biyoinformatik özel programları geliştirilmiştir.

Birçok kişi İnsan Genom Projesi ile üretilen büyük miktardaki verilerin bilgi teknolojisi ile biyoteknolojinin birleşmesine neden olacağı yorumunu yapmaktadır. DNA-protein dizi bilgilerinin analizi, organize edilmesi ve paylaşılması için biyoinformatikçilere ihtiyaç vardır. Sadece insan genomunun 3 milyarın üzerinde baz çifti içerdiği veri tabanlarına, tüm dünyadan her gün, diğer türlere ait yüzbinlerce baz dizisi verileri eklenmektedir. Bu bilgiyi analiz etmek için gelişmiş programlara gerek vardır. Biyoteknoloji şirketleri, biyoloji ve kimyayı kaplayan bu her an yükselen veri denizinde boğulmaktan nasıl kurtulacaklar? Güçlü veri ayıklama ve veri depolama sistemleri daha yeni yeni biyoinformatik pazarına girmeye başlıyor. Bir karşılaştırma yapmamız gerekirse; büyük bir bankanın finans veri tabanı, farklı tip müşterilerileri temsilen 1 milyon satırlı 100 sütundan oluşabilir. Halbuki bir ilaç şirketinin veri tabanı genleri temsilen 30 000 sütun ve sadece 40 satırlık bir hasta sayısı içerebilir. Biyoinformatikçiler SNP markör bağlantıları ve hastalık aşamalarını belirlerken sinir ağları ve karar ağaçları gibi bilgisayar modelleme araçlarını sıklıkla kullanırlar. Eğer bilgisayar bilimlerindeki becerilerin biyolojik kavramları anlamayla birleştirilmesi ilginizi çekiyorsa, biyoinformatik sizin için güzel bir kariyer seçeneği olabilir.

İşletmeler, biyoimalat ve üretim

İşletme, biyoimalat ve *üretim* terimleri, biyoteknoloji şirketinin bir ürünün üretilmesindeki donanımlar ve laboratuvar uygulamaları gibi, ürün geliştirmeye özgü ayrıntıları denetleyen bölümlerini tanımlamakta kullanılır. Bu durum sıklıkla **ölçek büyütme işlemleri** denen, ürünün yapılmasında kültüre alınan hücrelerin geniş ölçekte yetiştirilmesi, işlemlerini içerir. Bu önemsiz bir iş değildir. Basit bir karşılaştırmayla açıklarsak, ölçek büyütme, kendiniz için yemek pişirmeye karşın 50 kişilik bir ziyafet sofrası hazırlamak gibidir. Biyoimalat ve üretim üniteleri, üretim süresince geniş ölçekli ve hacimli ekipmanların bakımını yapıp denetlerler. Böylece şirket ürünün en uygun üretim aşamalarından geçerek üretildiğinden ve uygun kayıtların tutulduğundan emin olur. Biyoimalatın işinin detayları şirketin imal ettiği ürüne özgüdür. Giriş düzeyindeki işler materyalin ambalaj-sevk, imalat sorumlusu ve yardımcısı kadrolarıdır. Denetmen ve yönetici düzeyindeki işler genellikle biyoloji veya kimya lisans veya yüksek lisans eğitimi ve o şirkette üretilecek ürünlerin imalatında çok yıllık deneyime sahip olmayı gerektirir. İmalat ve üretimde ayrıca kimya, elektrik, çevre ve endüstri gibi değişik alanlardan mühendisler de çalışır. Mühendis kadroları genellikle mühendislik lisans/yükseklisans veya biyoloji yükseklisans derecelerini ister.

Kalite güvencesi ve kalite kontrol

Biyoteknolojiyle geliştirilen ürünlerin pek çoğu ABD'de Gıda ve İlaç Dairesi (FDA), Çevre Koruma Dairesi (EPA) ve Tarım Bakanlığı (USDA) gibi ulusal kurumlarca çok sıkı denetlenir (bakınız Bölüm 12). Bu kurumlar imalatın denetleyicilerin onayladığı yöntemlerin harfiyen izlenerek yapılmasını isterler. Daha önce bahsedildiği gibi, kalite güvencesinin genel amacı, bütün ürünler için son ürün kalitesinin garanti edilmesidir. Kalite kontrol denetimleri, ulusal kurumların zorunlu kıldığı bağlayıcı kurallara ürünlerin uygunluğundan emin olacak biçimde düzenlenmiştir. Ayrıca, ürünün imalat aşamalarındaki her bileşenin istenen özelliklere uygunluğunun da garantisi verilir. KG ve KK çalışanları diğer sorumluluklar yanında, donanımın, tesislerin ve personelin denetlenmesinden, belgelerin doğruluğundan, ürün örneklerinin test edilmesinden ve tüketici istek ve şikâyetlerinin seslendirilmesinden de sorumludurlar. KG ve KK alanında giriş düzeyindeki işler; doğrulama teknisyenliği, evrak memurluğu ve KK denetçiliğidir. Bu işler genellikle en azından biyoloji lisans eğitimi, yönetsel veya denetsel kadrolar için ise daha yüksek bir eğitim gerektirir. **Müşteri ilişkileri uzmanları** veya **ürün şikâyet uzmanları** şirketin KG biriminde çalışırlar. Bu uzmanların diğer bir görevi de ürünle ilgili bir sorunda tüketici şikâyetlerini araştırıp, bu sorunun giderilmesi veya uygun bir karşılık için tüketicilerin izlenmesidir.



KARARI SİZ VERİN

Eşdeğer Biyotek İlaçlar?

Biyoteknoloji endüstrisi yaş aldıkça, ilk dönemlerde geliştirilen patentli biyotek ürünlerin gelecek birkaç yıl içinde patent korumalarını kaybedecekleri tartışılıyor. 10 milyar dolar üzerinde yıllık satışı olan yaklaşık 20 ürünün patenti 2006'da sona erdi. Patentler buluş sahiplerine tekel hakkı tanımak üzere hazırlanırlar ve ABD'de 20 yıla varan sürelerde geçerlidirler. Bu ürünlerin birçoğu için, eşdeğer ilaç onaylarının alınıp alınmayacağı konusunda endüstride karşıt fikirler var. Tahmin edeceğiniz gibi **eşdeğer ilaçlar**, markalı ürünlerin kopyalarıdır. Orijinal ürünle aynı etkinliğe, güvenliğe ve kaliteye sahip olmakla birlikte, tüketiciye markalı üründen daha ucuza mal olurlar. Eşdeğerlerin ucuz olmalarının bir nedeni, adı geçen markalı ürün gibi pahalı güvenlik ve etkinlik testlerine gerek duyulmadan kullanım izni alabilmeleridir.

Birçok biyoteknoloji şirketi eşdeğer biyotek ilaçların üretimine karşı çıkmaktadır. Bu şirketler, farmasötik olarak üretilen ilaçlarla karşılaştırıldığında, biyolojik antikorlar gibi ilaçların çok yüksek maliyetleri olduğunu belirtmekteler. Bu maliyeti karşılamak için de eşdeğer ilaç rekabeti olmadan markalı ürünlerinin imalatından kar etme hakları olduğunu iddia etmektedirler. Bazı şirketler ayrıca - antikor veya tedavide kullanılan rekombinant proteinler söz konusu olduğunda **biyobenzer ilaç** olarak da isimlendirilen - bu eşdeğerlerin çok düşük bir maliyetle yapılıp yapılamayacağını da sorgulamaktalar. Çünkü biyobenzer ilaçların orjinalinin sahip olduğu özelliklerde üretilmesi, farmasötik eşdeğerlerle karşılaştırıldığında, çok zor ve maliyetleri de daha yüksektir. Bu karşı çıkışlara rağmen, kar amacı gütmeyen bir kuruluş olan One World Health Enstitüsü, bir biyoimalatçı şirketle anlaşma yaparak gelişmekte olan ülkeler için ilaç geliştirmek üzere, Bill ve Melinda Gates Vakfı'ndan yakın zamanda kaynak sağladı. Gelişmiş ülkelerde yüksek fiyatla sattıkları ilaçlardan elde ettikleri karı, gelişmekte olan ülkelerde düşük ya da hiç kar etmeden ilaç satmak için kullanan birçok şirket olmasına karşın; ihtiyaç duydukları ilaçları alma güçleri olmayan çok sayıda insanın yaşadığı gelişmekte olan ülkelerdeki ilaç fiyatlarından elde edilen kar konusunda hala sorunlar yaşanmaktadır. Biyoteknoloji şirketleri eşdeğer ilaç üretmeye zorlanmalı mıdır? Kararı siz verin.

Klinik araştırmalar ve ruhsatlandırma

ABD'de yeni bir ilacın geliştirilmesi, bu ilaç adayının FDA'dan ilaç olarak kullanım izni alması için gönüllüler üzerinde uzun ve pahalı testlerin yapılması sürecinden sonra gerçekleşir (bakınız Bölüm 12). Klinik deneme süreci, biyoteknolojinin diğer birçok klinik/klinik olmayan alanlarında olduğu gibi, çok sayıda farklı kurumlar tarafından denetlenir. Sonuçta her biyoteknoloji şirketinin, ruhsatlandırma için gerekli işlemlerin tam yapıldığından emin olmak için mevzuata uygunluğu denetleyen elemanları vardır. İnsanlar için ilaç geliştiren biyoteknoloji şirketlerinin genellikle bilim insanları veya bunların dışındakilerin çalıştığı, klinik deney ve gözlemler yaptıkları büyük bir klinik araştırma ünitesi bulunur.

Pazarlama, satış, finans ve hukuk birimleri

Tıbbi aletlerden ilaçlara kadar, değişik biyoteknoloji ürünlerinin pazarlama ve satışı biyoteknolojinin son derece önemli bir alanıdır. Biyoteknoloji pazarlama ve satışında çalışanlar, fen bilimlerinden lisans diploması sahibi ve biyoteknolojideki bilimsel süreçleri bilen, hatta bunu işletme kurslarıyla veya pazarlama önlisansı ile desteklemiş kişilerdir. **Satış temsilcileri** şirketin ürünlerini tanıtmak için hastane ve tıp merkezlerinde hekimlerle çalışırlar. **Pazarlama uzmanları** şirketin sattığı ürünleri kullanacak tüketiciler için reklam kampanyaları ve özendirici malzemeler hazırlar. Bu temsilci ve uzmanlar sıklıkla fuar ve konferanslara katılırlar. Pazarlama ve satış elemanlarının bilimsel anlayışa sahip olmaları, son kullanıcının ürün hakkındaki sorularını doğru cevaplayabilmeleri için önemlidir. Biyoteknoloji şirketinin **finans birimleri** tipik olarak, şirket sermayesini yöneten başkan yardımcısı veya finans ofis şefi tarafından yönetilir. Bu birim, şirket ortaklarından veya teknoloji şirketlerine yatırım yapmak isteyen risk yatırımcılarından kaynak yaratma işini üstlenir. Biyoteknoloji şirketlerindeki **hukuk uzmanları**, telif-isim hakları gibi ürün geliştirme ve pazarlamayla ilişkili yasal konularda ve patent alma işlemleriyle ilgili çalışırlar. Bunlar, biyoteknoloji şirketinin zorlu bir çalışma süreci sonucunda geliştirdiği ürün ve fikirlerin korunması açısından büyük önem taşıyan konulardır (daha fazla tartışma için bakınız Bölüm 12). Bu alanda çalışan elemanlar ayrıca, bir ürünle ilgili yasal sorun veya tüketicinin açtığı bir dava varsa bunların yasal çözümlerini sunarlar

Biyoteknolojide Ücretler

Biyoteknoloji endüstrisi çalışanları hastalıklarla mücadelede, gıda üretiminin iyileştirilmesinde, çevre kirliliğinin temizlenmesinde çığır açan buluşlar yapmakta ve üretimi daha etkili ve karlı hale getirmekteler. Yaşam koşullarını iyileştirmede canlı organizmaların kullanılması çok eski bir uygulama olmasına rağmen, biyoteknoloji endüstrisi sadece yaklaşık 25 yıllık bir geçmişe sahiptir. Biyoteknoloji yeni bir sektör olarak rekabet edebilir ücret ve sosyal yardımlar sunmakta, hemen her düzeydeki çalışanları yüksek iş memnuniyeti bildirmektedirler.

Ticaret sektöründe çalışan yaşam bilimcilerin ücretleri genellikle akademik alanda (kolej ve üniversiteler) çalışanlardan daha yüksektir. Biyoteknoloji sektöründe çalışan bilim insanlarına, bilimin diğer alanlarında çalışanlara göre, en yüksek ücretler ödenir. 2006 yılında sadece California'da, biyoteknoloji endüstrisinde kişisel ücret ve maaşlar 20 milyar $ dolayında gerçekleşti. Aynı yıl dünyadaki ilk beş biyoteknoloji şirketi, her çalışanı için ortalama 93 400 $ harcadı.

Son zamanlarda 400 biyoteknoloji şirketinde Radford Division of AON Danışmanlık tarafından yapılan ankete göre; biyoloji, kimya ve moleküler biyoloji alanında doktoralı biri hiçbir iş deneyimi olmadan 55 700 $ yıllık ücretle işe başlamakta, kıdemli bilim insanları ise yıllık 120 000 $'ı aşan ücret almaktadır. Aynı alanlarda yükseklisanslı biri için yıllık ortalama ücret 40 600 $, araştırma yardımcılarında bu rakam 60 000-70 000 $ arasında; lisans eğitimi olan biri için yıllık 32 500 $, araştırma yardımcılarında bu 52 000-62 000 $ arasındadır. Bu kısımda bahsedilen ücretlerle ilgili sözü edilen raporu ve anket güncellemelerini internette Radford Biyoteknoloji Ücret Raporu (Radford Biotechnology Compensation Report), Bilim ve Teknolojide Profesyoneller Komisyonu (Comission on Professionals in Science and Technology) ve ABD Personel Dairesi (The US Office of Personel Management) sitelerinde bulabilirsiniz. Biyoteknolojide ücret raporları web adresleri, destek materyalinin verildiği Rehber İnternet Sitesinde, Keeping Current: Web Links olarak listelenmiştir.

Ulusal bir anketin verilerine göre, biyoteknoloji eğitimine giriş yapan lise öğrencilerinin yüzde 56'sı çok az veya hiçbir bilimsel eğitim temeline sahip değiller. Şimdiye kadar eğer iyi bir biyoloji eğitimi almışsanız ve laboratuvar konusunda da yeteneğiniz varsa, sizin için biyoteknoloji sektöründe değişik düzeylerde pek çok iyi kadro bulunabilmesine rağmen; artık lise, meslek yüksekokulları ve fakültelerde bu yönde yoğun eğitim almak biyoteknolojide iş bulmak için zorunlu hale gelmektedir.

Biyoteknoloji Endüstrisinde İşe Alma Eğilimleri

Biyoteknolojide kariyer olasılıkları çok iyidir. 1992'den beri endüstrinin boyutları üç katına ulaştı ve dünya genelinde şirket gelirleri 1992'deki 8 milyar dolardan, 2001'de neredeyse 28 milyar dolara ulaştı. Fakat bu endüstri de ekonomik durum değişikliklerine bağışık değildir. 2006'daki global ekonomik gerilemeden buyana şirket alımları ve birleşmeler arttı. Küçük biyoteknoloji şirketlerinde ve büyük ecza şirketlerinin biyotek birimlerinde toplu işten çıkarmalar gerçekleşti. Sadece ABD'de biyoteknoloji şirketlerinin işgücü yaklaşık yüzde 38 azaldı. 1995-1999 arasındaki dört yılda, ABD biyoteknoloji endüstrisi çalışan işgücünü yüzde 48,5 artırmıştı. Eşdeğer ilaçların yol açtığı rekabet, büyük ecza şirketlerinin 2006'dan buyana 110 milyar $'dan fazla parayı bir düzinenin üstünde biyoteknoloji şirketine ödemesine neden oldu. Genetik mühendisliği ürünü ilaçların eşdeğerlerini üretmek zor olduğundan, büyük ecza şirketlerinin (Roche, Sanofi-Aventis ve diğerleri gibi) bunları biyoteknoloji şirketlerine (Genentech ve Genzyme gibi) yaptırmaları daha karlı olmaktadır. Bazı biyoteknoloji firma ve laboratuvarları işlerini özel eğitim almış yetenekli teknisyen-düzeyinde kişilerle yürütmeyi, şimdiye kadar yapageldikleri üzere yükseklisans ve doktora eğitimlilerle çalışmaya göre daha avantajlı görmekteler. Birçok insan kaynakları birimi ve iş bulma kurumunun belirttiğine göre, biyoinformatik, proteomik ve genom çalışmalarında yer alacak deneyimli teknisyen ihtiyacında büyük bir artış var.

Halen, ilaç buluşlarında çalışacak bilim insanları için hareketli bir iş piyasası var. Hangi bölgede olursa olsunlar, dev biyoteknoloji şirketleri büyümeye devam ettiklerini ve her çeşit kadroları için talepleri olduğunu bildirmekteler. En çok rağbet görenler, özellikle şirket içi ve dışında takım çalışmasını gerektiren işlerdir. Ortaklık, ilaç geliştirme sektörünün manzarası haline gelmiş ve kişilerin bu alandaki yeteneklerini geliştirmeleri bu endüstride kariyer yapmak için zorunlu olmuştur.

Son derece önemli diğer bir yönelim de, birçok alanda yeteneği olan kişilere duyulan ihtiyaçtır. Örneğin, bir kişinin moleküler biyoloji veya biyokimya diploması olup aynı zamanda bilgi teknolojilerinde yandal eğitimi alıp, matematikte kurs görmesi, iş pazarında, başta özgün yetenek birleşimlerine sahip



KARİYER PROFİLİ

Biyoteknolojide İlginizi Çeken Bir İş Bulmak

Kitabın her bölümünde kariyer profili başlığı altında, olası kariyer seçenekleri için gerekli eğitimler, iş tanımları, ücretler ve ilgili bilgileri vurgulayacağız. Biyoteknolojide kariyer için bilgi veren birçok web sitesi bulunmaktadır. Rehber İnternet Sitesinde bu sitelerin bağlantı adreslerini bulabilirsiniz:

- Biyoteknoloji Endüstrisi Organizasyonu (Biotechnology Industry Organization) web adresini ziyaret edin ve buradaki bir biyoteknoloji şirketinin sitesine girin.
- Biyoteknolojide iş tanımları ve kariyer kaynakları için bağlantıların yer aldığı Biyoteknolojide Mükemmel Kariyerlere Erişim (Access Excellence Careers in Biotechnology) web adresini ziyaret edin.
- Yararlanabileceğiniz biyoteknoloji işgücü kaynaklarını bulmak için Bio-Link websitesini ziyaret edin. Bu sitede birçok kariyer bilgisi, iş tanımları ve eğitim koşulları, iş ilanları ve her eyalette bulunan biyoteknoloji şirketlerinin bir listesi yer almaktadır. Bu siteden Gina Frierman-Hunt ve Julie Solberg 'in hazırladığı "Biyoteknolojide Kariyerler: ABD'de En İyi İşler İçin Kılavuz" ("Careers in Biotechnology: A Counselor's Guide to the Best Jobs in the United States") sitesine erişebilirsiniz.
- California State Üniversitesi, Biyoteknolojide Eğitim ve Araştırma Programı (CSUPERB) biyoteknolojide eğitsel ve kariyer materyali açısından çok güzel bir kaynak. Bu sitede özellikle "career site" ve "job links" sayfalarını ziyaret edin.
- Massachusetts Biotechnology Industry Organization sitesini ziyaret edin ve "careers" bağlantısını kullanarak biyoteknoloji endüstrisinde en kapsamlı iş tanımlarına ulaşın. Burada araştırma ve geliştirmede yöneticilikten, bulaşıkçı kadrosuna (evet, bu kişi kadro tanımındaki işi yapmakta!) kadar birçok iş tanımlanmaktadır.

Biyoteknolojide ilginizi çeken bir iş için bu siteleri araştırın. Sonra, bulduğunuz bu iş tanımına uyacak şekilde özgeçmişinizi tekrar yazın veya bu kadroya başvuru yapmak için hangi kursları almanız, nasıl bir iş deneyimine sahip olmanız gerektiğini belirleyin.

çalışanlar arayan şirketler olmak üzere, kendisi için büyük bir avantaj sağlayacaktır.

Şirketler teknik yetenek, işletme bilgisi ve finans deneyimlerine ek olarak, "sosyal beceriler"in önemini de vurgulamakta, bunların teknik beceriler kadar önemli olduğunu belirtmekteler. Bu beceriler, yazma ve iletişim, farklı alanlarda dinleyicilere bilgi sunma ve takım çalışmasıdır. Biyoteknolojdeki istihdam olasılıkları aslında oldukça ilginçtir. Esaslı bir bilimsel eğitimle, sözlü ve yazılı iletişim yeteneklerini, işbirliğini özendiren bir çalışma ortamında takım çalışması yeteneğiyle birleştirebilenler için mükemmel seçenekler bulunmaktadır.

BİR FARK YARATMAK

Her bölümün sonundaki Bir Fark Yaratmak altbaşlıklarında inceleyeceğimiz gibi, biyoteknolojinin bir parçası olmanın ve başkalarının hayatını etkilemenin pek çok yolu var. Gelecek bölümlerde neler olacağına bir göz atalım. Parkinson hastalarının beyinlerine kimyasal levodopa ilacını taşıyan hücre-temelli taneciklerin kullanılmasındaki başarı, diğer hücre temelli tedaviler için zemin hazırladı (Bölüm 2). İnsülin gibi tedavi edici rekombinant proteinler birçok kişinin yaşam kalitesini iyileştirdi (Bölüm 3). Bir hastalığın varlığını işaret eden biyomarkör proteinleri bulmak, saflaştırılmış proteinleri kullanarak uygulanacak kişiye özel ilaç uygulamalarına bir adım daha yaklaştırıp, diğer tedavileri hızlandırabilir (Bölüm 4). Bakterilerden izole edilen antibiyotikler biyoteknoloji ürünlerinin en başarılı örnekleri arasındadır (Bölüm 5). En çok petrolü üretebilecek bakterileri seçme olanağı veren biyoteknoloji yöntemleri sayesinde "Yeşil Devrim" daha hızlı gerçekleşebilir; benzer yöntemler geçmişte canlıların istenen karakterler için doğal kapasitelerinin artırılması için kullanılmıştır (Bölüm 6). Fare genomundaki genlerin fonksiyonları üzerindeki çalışmalar, insan genomunu daha iyi anlamamıza yardımcı olacak ve yeni ilaçların geliştirilmesini sağlayacak (Bölüm 7). 1000 Genom Projesiyle 1000 kişinin DNA dizileri karşılaştırılacak ve İnsan Genom Projesinde gözden kaçan 2300'den fazla gen açığa çıkmış olacak; bu yeni genom projesi yeni ve daha kişiselleşmiş tedavi olanaklarına yol açacaktır (Bölüm 8). Yeraltı su kaynaklarının temizlenmesi, biyoremediyasyonun başarılı örneklerinden biridir (Bölüm 9). Atnalı yengeci kanından geliştirilen bir test, tıbbi cihazların sterilite kontrolü için önemli bir teknik olmuştur (Bölüm 10). Kemik iliği nakilleri kök hücre teknolojisinin başarılı örneklerindendir (Bölüm 11). Şirketler ve çalışanlarını koruyan yönetmeliklere uyum, biyoteknolojinin bir gerekliliğidir ve güvenli ürünler, güvenli bir çalışma ortamı için sürekli olmalıdır (Bölüm 12). Son olarak, Genetik Bilgi Ayrımcılık Yasasının amacını inceleyeceğiz (Bölüm 13). Gelecek bölümlerde sizi gerçekten bir fark yaratacak, bilimin bir parçası olma fırsatı bekliyor!

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Biyoteknolojinin tarihsel ve şimdiki uygulamalarına iki örnek veriniz.
2. Bir biyoteknoloji uygulamasını ele alıp, bunun sizin günlük yaşantınızı nasıl etkilediğini açıklayınız.
3. Biyoteknolojinin hangi alanı çevrenin temizlenmesinde canlı organizmalardan yararlanır?
4. Farmakogenomiğin insan hastalıklarının tedavisini nasıl etkileyeceğini açıklayınız.
5. KK ve KG arasındaki farkı belirtiniz ve biyoteknoloji şirketleri için her ikisinin de niçin önemli olduklarını açıklayınız.
6. Biyolojik Danışma Ulusal Merkezi kütüphanesine erişin (www.ncbinlm.nih.org) ve yetişkinden-türetilmiş kök hücreler hakkındaki yeni bilgileri araştırın. Bu ücretsiz kaynak, diğer kütüphanelerde bulabileceğiniz, başlık, özet ve tam metin makaleleri sunmaktadır.
7. www.accessexcellence.org/AB adresindeki Mükemmele Erişim sitesinde "Biyotek Hakkında (About Biotech)" bölümüne girin. Bu bölüm biyoteknolojinin tarihsel ve güncel uygulamalarının seçkin bir değerlendirmesini sunuyor. Sitedeki değişik başlıkları tarayın. Biyoteknolojinin birçok ilginç örnek ve uygulamaları öğrencinin kolay anlayabileceği terimlerle tanımlanmaktadır. Sizi heyecanlandıran bir başlık seçin, bununla ilgili bilgilerin yazıcı çıktılarını alıp, yeni öğrendiğiniz bu bilgileri biyoteknolojiye yabancı bir arkadaşınız veya ailenizle paylaşın.
8. Bilimin birçok alanında, grup çalışmalarında yer alıp, başkalarıyla etkileşimde olmak gerekli bir yetenek. Bu bölümde öğrendiğiniz üzere biyoteknoloji fen, matematik ve bilgisayar uzmanlığı gibi değişik eğitimler almış kişilerin, bir problemi çözmek veya ortak bir amaca ulaşmak için işbirliği yaptığı grupları içermektedir. Bir şirkette aynı problem üzerinde çalışan başka insanlarla biyoloji tartışmak herkes için eğlenceli ve yararlıdır. Diğer öğrencilerle çalışmak da, sizlerin biyoteknoloji çalışmalarınızdan daha fazla zevk almanız ve daha iyi öğrenmenizin en mükemmel yoludur. Bir başkasına öğretmek ise bilgilerinizi test etmenin en iyi yöntemidir. Bir sonraki test için bir çalışma grubu oluşturarak, grup çalışması yapabilme yeteneğinizi analiz edin. Toplantıları orga-

nize edecek ve gruptaki herkesi birbirine yardımcı olmaya odaklayacak bir grup lideri seçin. Herbirinizin gruba sunacağı bir başlık belirleyin ve hepiniz getirilen önerilere yapıcı eleştirilerle yaklaşın. Eğer sınıf arkadaşlarınızla bir oda içinde bir araya gelemiyorsanız, düşüncelerinizi e-posta aracılığıyla paylaşın veya öğretmeninizden elektronik ortamda tartışma zemini ayarlamasını isteyin.

9. Ulusal Sağlık Kütüphanesi, bilimsel degilerde yayınlanan biyoloji araştırmalarının yer aldığı, dünya çapında bir veri tabanıdır ve http://www.ncbi.nlm.nih.gov sitesinden ücretsiz erişilebilir. PubMed'e girin, biyoteknolojinin ilginizi çeken herhangi bir başlığındaki yayınları ve biyoteknolojideki en son yenilikleri bulmak için tarama yapın.
10. Canlıların klonlanması insanların da klonlanabileceği konusunda kaygılara yol açtı. En azından bir grup bunu zaten yaptıklarını ileri sürdü. *Raelians* ve *klonlama* terimlerini kullanarak bir Google taraması yapın. Bu kitap yayınlandığında insan klonlaması hakkındaki hiçbir iddia doğrulanmamıştı ve bilim insanlarının çoğunluğu insan klonlamaya katı bir biçimde karşılar. Siz ne düşünüyorsunuz? İnsanlar klonlanmalı mı?
11. Biyoteknoloji şirketlerinin nasıl işe başladığını açıklayınız. Cevabınıza yeni başlayan bir şirketin nasıl finanse edildiği açıklamasını da ekleyin.
12. İlaç endüstrisi ile biyoteknoloji endüstrisi arasındaki farkları ve benzerlikleri tanımlayınız.
13. Ücretsiz, günlük biyotek endüstrisi haber başlıklarını öğrenmek için FierceBiotech websitesine (http://www.fiercebiotech.com) girin ve üye olun. Bu şekilde biyoteknolojide ilginç yeni buluşları, biyoteknoloji şirketlerinin güncellemelerini, kariyer bilgileri ve daha fazlasını öğrenmiş olacaksınız.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

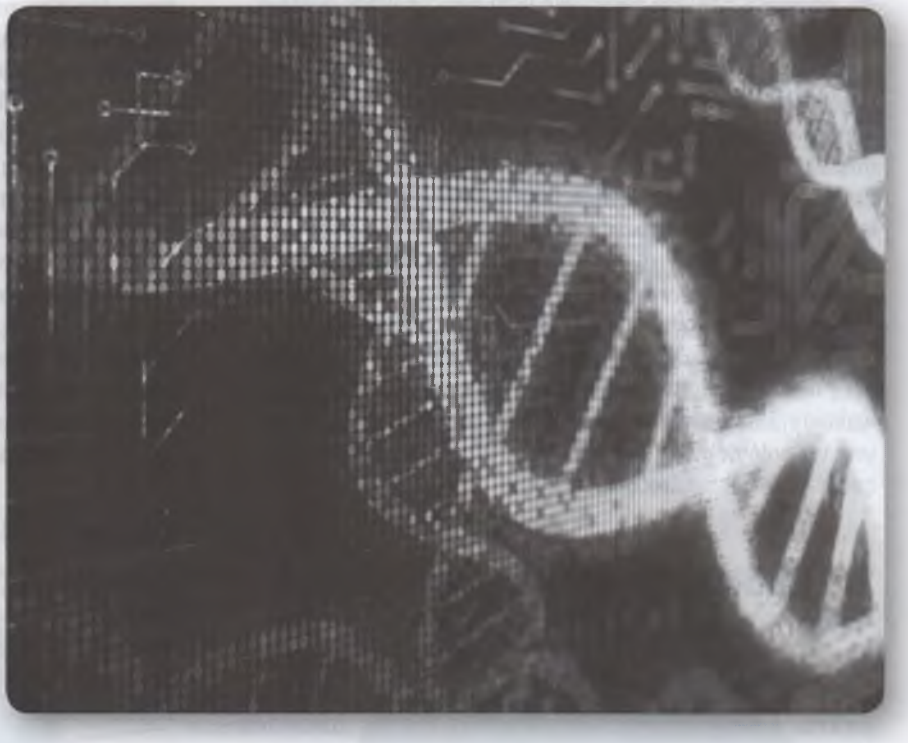
2

Genler ve Genomlara Giriş

Çeviren: Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Prokaryotik ve ökaryotik hücreleri karşılaştırabilmeli ve farklılıklarını gösterebilmelisiniz.
- Canlı organizmalarda kalıtsal genetik materyalin DNA olduğunu gösteren deneyleri tartışabilmelisiniz.
- Bir nükleotidin yapısını tanımlayabilmeli ve çift sarmal DNA moleküllerini nasıl oluşturduklarını açıklayabilmelisiniz.
- DNA replikasyonunu anlatabilmeli ve gerekli temel proteinlerin görevlerini tartışabilmelisiniz.
- Genomların ne olduğunu anlayabilmeli ve biyologların bunları neden incelediğini anlatabilmelisiniz.
- Transkripsiyon işlemini tanımlayabilmeli ve mRNA'nın fonksiyonel bir mRNA molekülünü nasıl oluşturduğunu anlayabilmelisiniz.
- Translasyon işlemini ve mRNA, tRNA ve rRNA'nın görevlerini tanımlayabilmelisiniz.
- Gen ekspresyonu regülasyonunun niçin önemli olduğunu açıklayabilmelisiniz.
- Epigenomun ne olduğunu açıklayabilmeli ve epigenetiğin niçin önemli olduğunu anlayabilmelisiniz.
- Operonların bakterilerde gen ekspresyonu regülasyonundaki görevlerini tartışabilmelisiniz.
- Farklı mutasyon tiplerini belirtebilmeli ve mutasyonların sonuçlarıyla ilgili örnekler verebilmelisiniz.



DNA içinde kodlanan genler tüm hücresel aktiviteleri kontrol eden komutları sağlamaktadır. Genler davranışlarımızı etkiler; cilt, saç ve göz rengi gibi fiziksel görünüşümüzü belirler; genetik hastalıklara yatkınlığımızı etkiler.

Biyoteknolojik çalışmaların merkezi, kalıtsal genetik materyal ve yaşamsal molekül olan DNA'nın yapısının anlaşılmasıdır. Moleküler biyolojideki olağanüstü tekniklerin biyologlara DNA mühendisliği, klonlama ve biyoteknolojideki pek çok uygulama için (Bölüm 3) sunduğu olanakları daha sonra değerlendireceğiz. Bu bölümde, DNA yapısını ve replikasyonu inceleyeceğiz, genlerin proteinleri nasıl kodladığını tartışacağız, genomiğe giriş yapacağız ve mutasyonların nedenlerini ve önemlerini inceleyeceğiz.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Bu bölümde bilim insanlarının hücre yapıları ve genler hakkındaki son on yıldır bildiği temel bilgileri tartışıyor olsak da, gelecekte özellikle genomikle ilgili pek çok ilginç potansiyel gelişme olacaktır. Aktif bir diğer araştırma alanı, yapay genomların bir laboratuvarda bir araya getirilmesi ve yeni özellikli hücrelerin genoma sokulmasına dayalı olarak, "yapay hücrelerin" oluşturulmasıdır. Benzer şekilde, bir diğer yoğun inceleme alanı DNA dizilerinin birleştirilerek yeni proteinlerin yapılmasıdır. Bu yaklaşımlar değerli uygulamaları üretmek için henüz yeterince gelişmemiştir. Fakat yeni özellikli hücreleri yaratan yapay genom stratejilerinin çalışabileceğine dair işaretler vardır. Hücreler, gen ekspresyonu ve genomlar hakkındaki temel bilgiler, tıpkı doku ve organ yaratmak için kök hücrelerin kullanılması gibi (Bölüm 11'de anlatılan) hücre bazlı uygulama stratejilerinin geliştirilmesinde ana rol oynamaktadır. İnsan genleri için tasarlanmış genetik testlerdeki ve yeni tedavilerdeki ilerlemeler biyoteknoloji şirketlerinin odak noktası olmayı sürdürecektir.

2.1 Hücre Yapısının İncelenmesi

İnsanlar görünüşleri ve fonksiyonları değişen 200'ün üzerinde farklı tipte yaklaşık 75 trilyon hücreden oluşurken, bakteriler gibi organizmalar tek bir hücreden oluşur. Hücreler yapısal ve fonksiyonel yaşam birimleridir. Küçük bakteri hücrelerinden omuriliğe, ayak parmaklarındaki kaslardan 90 cm'den daha fazla alana yayılan insan sinir hücrelerine kadar, hücreler büyüklük ve karmaşıklık açısından büyük ölçüde çeşitlilik gösterir. Hemen hemen tüm hücreler **deoksiribonükleik asit (DNA)** biçimindeki genetik bilgi olan ortak bir bileşeni paylaşırlar. Genler, protein sentezini yöneterek hücrelerdeki çok sayıdaki faaliyeti kontrol ederler. Genler, davranışımızı etkiler; ten, saç ve göz rengi gibi fiziksel görünüşümüzü belirler ve genetik hastalıklara yatkınlığımızı etkilerler. Genler ve genomlar hakkındaki çalışmamıza başlamadan önce, hücre yapı ve fonksiyonlarının temel durumlarını gözden geçireceğiz ve farklı hücre tiplerini kısaca karşılaştıracağız.

Prokaryotik Hücreler

Hücreler, hücre fonksiyonlarını belirleyen özelleşmiş yapılarıyla karmaşık birimlerdir. Genellikle her hücre, yüzeyini kaplayan öncelikle lipid ve proteinlerden oluşan çift katlı bir **plazma (hücre) zarına**, çekirdek ve plazma zarı arasında hücrenin iç bölümü olan **sitoplazma**ya ve hücrelerdeki belirli fonksiyonları yerine getiren yapılar olan **organelle**re ("küçük organlar") sahiptir. Bu kitap boyunca, bitki ve hayvan hücrelerinin biyoteknolojide nasıl önemli rol oynadığının yanı sıra bakteriler, mayalar ve diğer mikroorganizmaları kapsayan pek çok biyoteknolojik uygulama da anlatılacaktır. Bakteriler, hayvan ve bitki hücrelerindeki gibi, DNA içeren bir organel olan **nükleus**a (çekirdeğe) sahip olmadıklarından, Yunanca kelime anlamı "nükleusdan önce" olan **prokaryotik hücreler** veya basitçe prokaryotlar olarak adlandırılır. Prokaryotlar gerçek bakterileri (öbakteriler) ve mavi-yeşil bir alg tipi olan siyanobakterileri ve arkebakterileri (bazı ökaryotik özelliklere sahip çok eski bakteriler) kapsamaktadır (Tablo 2.1).

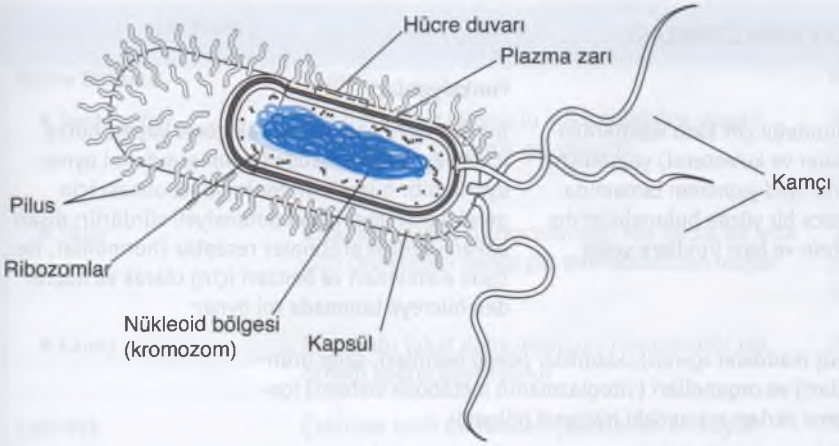
Bakteriler, nispeten basit bir yapıya sahiptir (**Şekil 2.1**). Dış sınırları hücreyi koruyan sert bir hücre duvarı tarafından çevrilen bir plazma zarı ile belirlenmiştir. Bakteriler, protein sentezinde kullanılan ribozomlar dışında birkaç organele sahiptir. Genellikle tek bir dairesel molekül formundaki DNA'yı içeren sitoplazma plazma zarına bağlanmıştır ve çekirdeğe benzeyen bölge olarak adlandırılan bir alanda bulunmaktadır (Şekil 2.1). Ayrıca bazı bakteriler hareket etmek için kullanılan kamçı adlı kuyruğa benzeyen bir yapıya da sahiptir.

Ökaryotik Hücreler

Çekirdeğe bitişik bir zar ve pek çok organel içerdiklerinden Yunanca kelime anlamı "gerçek çekirdek" olan ***ökaryotik hücreler*** *bitki ve hayvan hücrelerini kapsamaktadırlar.* Ayrıca ökaryotlar, mantarlar ve çoğunluğunu alglerin oluşturduğu protistler olarak adlandı-

TABLO 2.1 PROKARYOTİK VE ÖKARYOTİK HÜCRELER

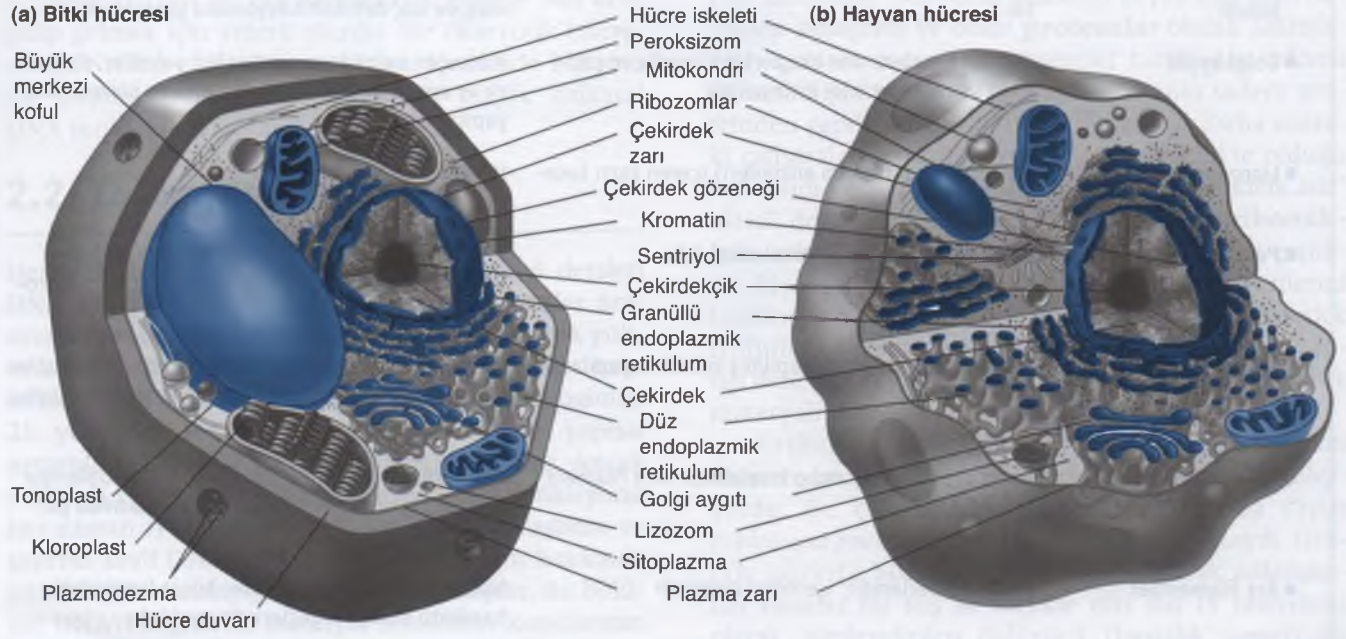
	Prokaryotik Hücreler	Ökaryotik Hücreler
Hücre Tipleri	Gerçek bakteriler (öbakteriler) Arkebakteriler	Protistler, mantarlar, bitki ve hayvan hücreleri
Büyüklük	100 nm–10 μm	10–100 μm
Yapı	Çekirdek yoktur; DNA sitoplazmada bulunmaktadır. Organeller yoktur.	DNA zarla çevrili bir sitoplazmada bulunmaktadır. Çekirdek. Birçok organel.



ŞEKİL 2.1 Prokaryotik Hücre Yapısı Bakteriler prokaryotlardır. Burada tipik bir çubuk şeklindeki bakteride bulunan yapı taslağı görülmektedir.

rılan tek hücreli organizmaları da kapsamaktadır. Bitki ve hayvan hücrelerinin şekilleri **Şekil 2.2**'de gösterilmiştir. Plazma zarı akıcı, yüksek düzeyde dinamik, lipid, protein ve karbonhidratlardan oluşan karmaşık çift tabakalı bir yapıdır. Bu zar hücre adezyonunda, hücreden hücreye iletişimde ve hücre paylaşımında gerekli görevleri yerine getirir ve moleküllerin hücre içine ve dışına taşınması için gereklidir. Ayrıca bu zar, moleküllerin hücreye giriş ve çıkışını kontrol eden karışık taşıma işlemleriyle ilişkili proteinleri içerdiği için seçici-geçirgen bir bariyer olarak da önemli bir rol oynar. Örneğin, insülin gibi hormonlar salgılama adlı bir işlemle hücreden serbest bırakılır; glukoz gibi diğer moleküller hücreye alınabilir ve mitokondride **adenozin trifosfat (ATP)** olarak adlandırılan bir molekül formunda enerjiye dönüştürülür. Zarlar ayrıca pek çok organelle bitişiktir ya da onları kaplamaktadır.

Ökaryotların sitoplazması besince zengin, jel gibi akışkan ve çok organelli **sitozol**den oluşmaktadır. Prokaryotlarm sitoplazması da sitozol içermektedir, ancak birkaç organellidir. Organelleri kimyasal reaksiyonların ve hücresel işlemlerin gerçekleştiği bölümler olarak düşünelim. Organeller, hücrelerin binlerce farklı karmaşık reaksiyonunun eşzamanlı olarak yürütülmesini sağlar. Her bir organel belirli biyokimyasal reaksiyonlardan sorumludur. Örneğin, lizozomlar yabancı parçaları ve eski organelleri parçalar; endoplazmik retikulum ve Golgi aygıtları protein, lipid ve karbonhidratları (şekerler) sentezler. Reaksiyonların bölümlere ayrılmasıyla, hücreler çok sayıda reaksiyonu aynı anda koordineli ve yüksek derecede düzenli bir biçimde yürütebilir. Şekil 2.2 ve Tablo 2.2'de verilen organellerin görevlerini bildiğinizden emin olun.



ŞEKİL 2.2 Ökaryotik Hücre Yapısı Bitki (a) ve hayvan (b) hücrelerinde bulunan yaygın yapı taslakları.

TABLO 2.2 ÖKARYOTİK HÜCRELERİN YAPISI VE FONKSİYONLARI

Hücre Bölümü	Yapısı	Fonksiyonları
Plazma zarı	Zar, proteinlerin bulunduğu çift katlı lipidlerden (asıl olarak fosfolipidler ve kolesterol) yapılmıştır; proteinler iki katmanlı lipid yapısının tamamına yayılabilir veya yalnızca bir yüzde bulunabilir; dış yüzeyi kaplayan protein ve bazı lipidlere şeker grupları eklenir	Bir dış hücre bariyeri olarak görev yapar; hücre içine veya dışına madde taşınmasında rol oynar; uyarılabilir hücrelerin fonksiyonel olması için gerekli olan geri kalan potansiyeli sürdürür; dışarı bakan yüzdeki proteinler reseptör (hormonlar, iletişim elemenları ve benzeri için) olarak ve hücreden hücreye tanımada rol oynar
Sitoplazma	Sıvı sitozol (çözünmüş maddeler içeren), kalıntılar (depo besinleri, salgı ürünleri, pigment granülleri) ve organelleri (sitoplazmanın metabolik sistemi) içeren; çekirdek ve plazma zarları arasındaki hücresel bölgedir	
Sitoplazmik organeller		
■ Mitokondriler	Çubuk benzeri çift zarlı yapıdadır; iç zar krista adı verilen çıkıntılar halinde katlanmıştır	Adenozin trifosfat (ATP) sentezi alanıdır; hücrenin enerji merkezidir
■ Kloroplastlar (bitki hücreleri)	Bir iç sıvı (stroma) tarafından çevrili, tilakoid denilen klorofil içeren zar keselerinden oluşan kümeleşmiş yapılar (granül) içeren, zarla çevrili organellerdir	Fotosentez alanıdır
■ Ribozomlar	Her biri ribozomal RNA ve proteinden oluşan iki alt ünite şeklinde yoğun parçacıklardır; serbest halde ya da granüllü endoplazmik retikuluma bitişik halde bulunurlar	Protein sentezi bölgesidir
■ Granüllü endoplazmik retikulum	Bir oyuğun (sisterna) etrafını çeviren ve sitoplazma boyunca kıvrılan zar sistemidir; üzerinde ribozomları taşır	Sisterna içindeki proteinler şeker gruplarına bağlanır; proteinler Golgi aygıtına ve diğer alanlara taşınmak için keseciklere bağlanmıştır; dış yüz fosfolipidleri ve kolesterolü sentezler
■ Düz endoplazmik retikulum	Keseli ve tüplü zarsı sistemlerdir; ribozomlar yoktur	Yağ ve steroid sentezi alanıdır; lipid metabolizması ve ilaç detoksifikasyonunu gerçekleştirir
■ Golgi aygıtı	Düz zar keselerinden oluşan bir kümedir ve çekirdeğe yakın kesecikler birleşmiştir	Hücreden salgılanan proteinleri paketler, değiştirir ve ayırır; lizozomlarda bulunur ve plazma zarı yapısıyla birleşir
■ Lizozomlar	Hidrolazları (sindirim enzimleri) içeren zarsı keseler	Hücre içi sindirim alanıdır
■ Peroksizomlar	Oksidaz enzimlerinin zarsı keseleridir	Birçok toksik maddenin zehir etkisini gideren enzimlerdir; en önemli enzim olan katalaz, hidrojen peroksidi parçalar
■ Mikrotübüller	Tübülin proteinlerden yapılmış silindirik yapılardır	Hücreleri destekler ve şekillerini verir; hücre içi ve hücresel hareketlerle ilgilidir; sentriyolleri oluşturur
■ Mikro filamentler	Aktin proteininin kasılıp kısalabilen ince filamentleridir	Kas kasılması ve diğer hücre içi hareket tipleriyle ilgilidir; hücre iskeletinin oluşturulmasında yardımcı olur
■ Ara filamentler	Protein fiberleridir; içerikleri çeşitlidir	Stabil iskelet elementleridir; hücre üzerindeki hareketli mekanik güçlere dayanıklıdır

TABLO 2.2 (*DEVAMI*)

Hücre Bölümü	Yapısı	Fonksiyonları
■ Sentriyoller	Her biri dokuz tane üçlü mikrotübülden oluşan, eşleştirilmiş silindirik gövdelerdir	Mitoz sırasında iğ iplikçiklerini oluşturmak için bir mikrotübül ağ kurar; siller ve kamçıların temellerini oluşturur
■ Siller	Kısa, hücre yüzeyi çıkıntılarıdır; her bir sil bir orta çifti çevreleyen dokuz çift mikrotübülden oluşur	Tek yönlü bir akım oluşturarak maddelerin hücre yüzeyleri boyunca uyum içinde hareket etmesini ve ilerlemesini sağlar
■ Kamçı	Sil gibidir fakat daha uzundur; insanlardaki tek örneği sperm kuyruğudur	Hücreleri ileriye doğru hareket ettirir
Çekirdek	Çekirdek kılıfı tarafından çevrelenen en büyük organeldir; sıvı nükleoplazma, çekirdekçik ve kromatin içerir	Hücre merkezini kontrol eder; genetik bilginin iletiminden ve protein sentezi komutlarından sorumludur
■ Çekirdek kılıfı	Çift zar yapısı gözeneklerle delinmiştir; dış zar sitoplazmik endoplazmik retikulumun devamıdır	Nükleoplazmayı stoplazmadan ayırır ve çekirdekten içe ve dışa doğru madde akışlarını düzenler
■ Çekirdekçik	Ribozomal RNA ve proteinlerden oluşan, yoğun küre biçiminde (zara bağlı değil) yapılardır	Ribozom alt ünitelerinin yapım yeridir
■ Kromatin	DNA ve histon proteinlerinden oluşan granüllü ve ipliksi yapılardır	DNA genleri içerir
Merkezi koful (bitki hücreleri)	Tek katlı büyük zarla çevrili keselerdir.	İyonları, artık ürünleri, pigmentleri ve koruyucu bileşikleri depolamada kullanılır

Çekirdek DNA içerir. Bu organel **çekirdek kılıfı** denen çift katlı bir zarla çevrili küre biçiminde bir yapıdadır ve bir ökaryot hücredeki en büyük yapıdır. Her insan hücresi çekirdeğinde neredeyse 183 cm uzunluğunda DNA sarılıdır. Eğer insan hücrelerinin hepsindeki DNA uç uca bağlansaydı güneşe 500 kere gidip gelmek için yeterli olurdu. Bir ökaryotik hücredeki DNA'nın çoğunluğu çekirdek içerisinde bulunsa da, mitokondri ve kloroplastlar da küçük halkasal DNA molekülleri içermektedir.

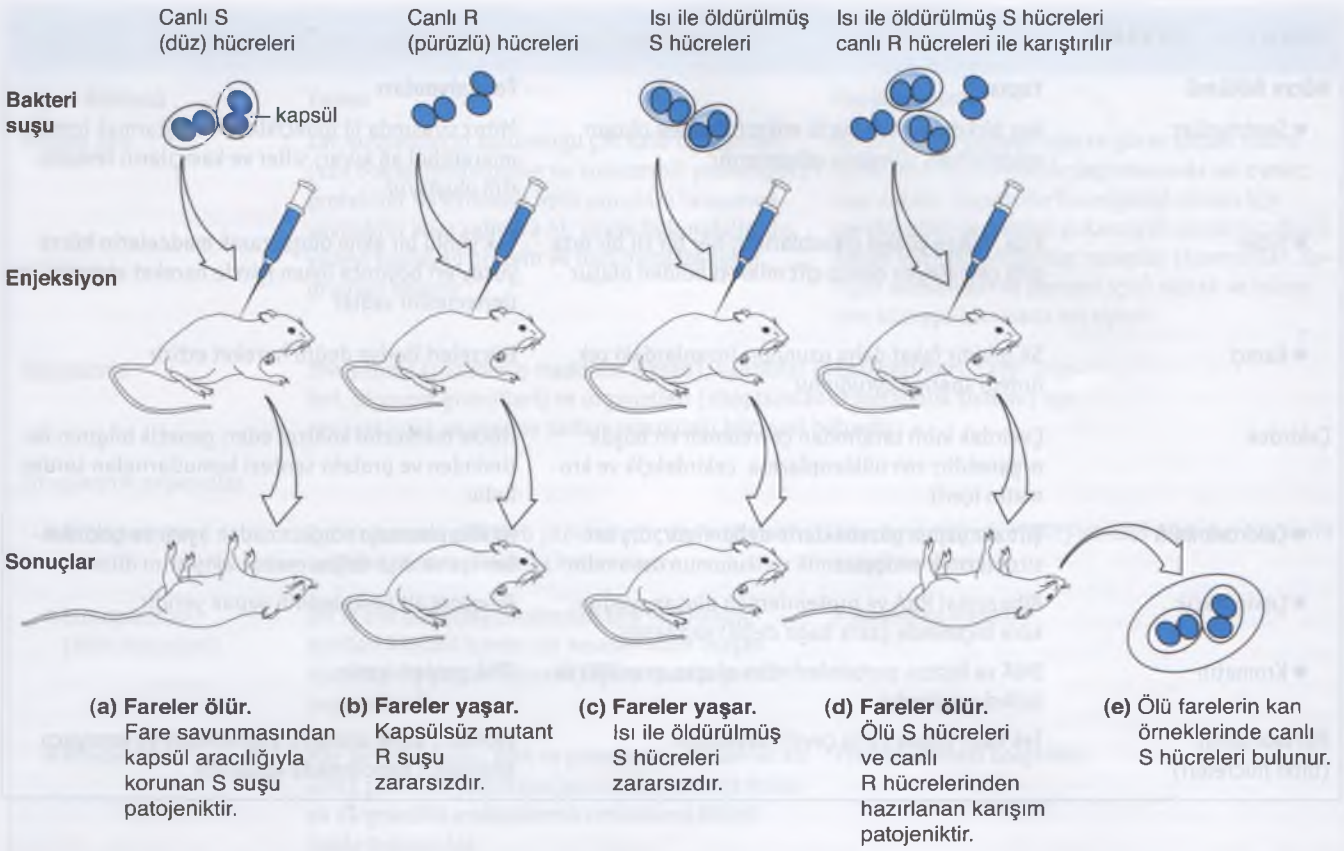
2.2 Yaşam Molekülü

Her yüksekokul ya da üniversitede biyoloji dersleri DNA hakkında bazı konuları içerir ve öğrenciler üniversitedeki biyoloji laboratuvarlarında ve pek çok yüksekokul sınıfında DNA ile uğraşır. DNA ve genler hakkmdaki, pek çok açıdan, detaylı mevcut bilgi zenginliği 21. yüzyıldaki biyoloji öğrencilerine DNA'nm yapısal ayrıntılarının daima anlaşıldığı izlenimini verir. Ancak DNA'nın yapısı ve genetik materyal olarak fonksiyonu her zaman iyi bilinmez. Pek çok sıradışı araştırıcı ve şaşırtıcı keşif DNA'nın yapısı ve fonksiyonu hakkında günümüzdeki anlayışa katkıda bulunmuştur. Bu bölüme DNA'nın genetik materyal olmasının kanıtlarının belirtildiği bir özetle başlayacağız, daha sonra DNA'nm yapısını anlatacağız.

DNA'nın Genetik Kalıtım Materyali Olduğunun Kanıtlanması

1869 yılında İsviçreli biyolog Friedrich Miescher çekirdekte bulunan ve "nüklein" adını verdiği bir hücresel yapı tanımladı. Miescher nükleini beyaz kan hücrelerinden saflaştırdı ve onun **proteazlar** olarak adlandırılan protein parçalayıcı enzimler tarafından yıkıma uğramadığını belirledi. Bu keşif nükleinin sadece proteinden yapılmadığı izlenimini uyandırdı. Daha sonraki çalışmalarda bu materyalin asidik özellikte olduğu belirlendi ve bu özellik nükleinin adının "nükleik asit" olarak değiştirilmesine neden oldu. DNA ve **ribonükleik asit (RNA)**, **nükleik asitler**in iki temel çeşididir. Biyokimyacılar nükleik asitlerin farklı bileşenlerini belirlemeye çalışırken, İngiliz mikrobiyolog Frederick Griffith'in *Streptococcus pneumoniae*'nin iki suşuyla yaptığı deneyler (1928) DNA'nın hücrenin kalıtsal genetik materyali olduğu konusunda kanıtlar sağladı.

Griffith, zatürreye neden olan bir mikrop olan *Streptococcuc pneumoniae* bakterisinin iki suşuyla çalışıyordu. Bu çalışmaların yapıldığı zamanlarda suşlar *Diplococcuc pneumoniae* olarak adlandırılmaktaydı. Griffith, pürüzlü hücreler (R hücreleri) olarak adlandırılan zararsız bir suş ile birlikte düz suş (S hücreleri) olarak isimlendirilen öldürücü (hastalık yapıcı) bir diğer suşla çalıştı. S hücreleri protein ve şekerlerden oluşan bir kapsül ile çevriliyken, R hücrelerinde bu



ŞEKİL 2.3 Griffith'in Transformasyon Deneyi *S. pneumoniae*'nin S suşu fareleri öldürür (a). R suşu zararsızdır (b). Isı ile öldürülmüş S hücreleri zararsızdır (c). Isı ile öldürülmüş S hücrelerinin canlı R hücrelerine karıştırılarak enjekte edildiği fareler öldü (d) ve ölü farelerin kanlarında canlı S hücreleri saptandı (e). Bu sonuç transformasyonun bir kanıtıdır. R hücrelerinin S hücrelerine transformasyonuyla, canlı R hücreleri ölü S hücrelerinden DNA aldı.

kapsül yoktur. Griffith farelere canlı S hücrelerini enjekte ettiğinde fareler öldü ve ölü farelerin kanında canlı S hücreleri buldu (**Şekil 2.3**). Canlı R hücreleri farelere enjekte edildiğinde fareler yaşadı ve kanlarında hiçbir canlı R hücresine rastlanmadı. Bu deneylerin sonuçlarına göre, farelerin ölümünden protein kapsül tabakasının sorumlu olduğu ileri sürüldü. Bu iddiayı test etmek için Griffith daha sonra S hücrelerini ısıtarak öldürdü, böylece kapsüldeki proteinleri tahrip etti. Isı ile öldürülmüş S hücrelerinin enjekte edildiği farelerin yaşaması ve kanlarında canlı S hücrelerinin hiçbir işaretinin olmaması şaşırtıcı değildi. Fakat, Griffith ısı ile öldürülen S hücrelerini bir tüpte canlı R hücreleri ile karıştırıp bu karışımı farelere enjekte ettiğinde, fareler öldü ve ölü farelerin kanında canlı S hücreleri bulundu. Canlı S hücreleri nereden gelmişti?

Bu deney, ısı ile öldürülen S hücrelerindeki genetik materyalin R hücrelerini S hücrelerine transforme ettiğini (dönüştürdüğünü) veya çevirdiğini kanıtlamıştır. Griffith'in deneyleri bakterilerin DNA alımını, **transformasyonu** gösterdi. Isı uygulaması ile R hücreleri S hücrelerinin DNA'sını alarak transforme oldular ve S hücreleri gibi virülent forma dönüştüler. Öğreneceğiniz gibi transformasyon moleküler biyolojide çok güçlü bir tekniktir ve DNA klonlaması, protein üretimi ve diğer önemli amaçlar için bakterilerin içine genlerin sokulmasında rutin bir şekilde kullanılmaktadır. Griffith gördüğü transformasyon sonuçlarından bazı genetik faktörlerin sorumlu olduğunu varsaydığı halde, DNA'yı gerçek bir şekilde aktarım yapan (transformasyon yapan) faktör olarak tanımlayamadı. Ancak onun deneyleri bu faktörün araştırıldığı diğer öncü çalışmalarda yararlı oldu.

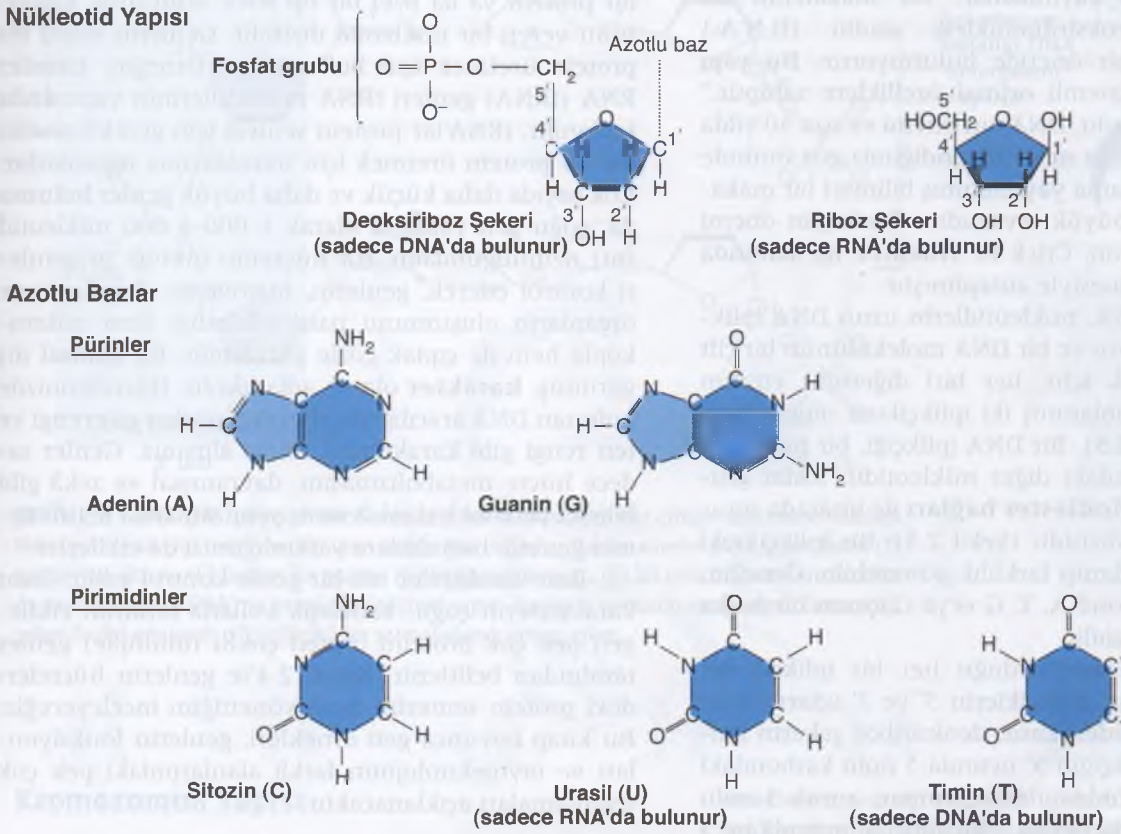
1944 yılında Oswald Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty sıvı kültürdeki geniş *S. pneumoniae* yığınından DNA saflaştırdı. Deneyleri DNA'nın genetik materyal olduğu konusunda kesin deliller sağladı ve Griffith'in deneylerindeki aktarımı yapılan faktörün DNA olduğunu kanıtladı. Avery, MacLeod ve McCarty, şu an meşhur olan deneylerinde, *S. pneumoniae* bakteri hücreleri karışımlarını homojenize ettiler ve bu ekstraktı proteazlar, RNA parçalayıcı enzimler **(RNase)** veya DNA parçalayıcı enzimlerle **(DNase)** muamele

ettiler. Sonuçta transformasyon deneylerini bu işlem görmüş ekstraktları kullanarak gerçekleştirdiler. Ölü S hücreleri ekstraktları canlı R hücreleriyle karıştırıldı ve farelere enjekte edildi. Bu deney, DNase uygulaması yapılan ekstraktlarda DNA bozulduğu için, R hücrelerinin S hücrelerine dönüşmediğini gösterdi. Proteaz ya da RNase ile muamele edilen ekstraktlar, bu karışımlardaki DNA sağlam kaldığı için transformasyon yeteneklerini hala sürdürmekteydi. DNA'nın görevlerinin belirlenmesi için virüslerle başka çalışmaların yapılması gerekli olsa da Avery, MacLeod ve McCarty'nin çalışması DNA'nın transformasyona neden olan genetik materyal olduğu konusunda kesin deliller sundu.

DNA'nın Yapısı

DNA'nın kalıtım materyali olduğunu destekleyen deliller bulunmasına rağmen, önemli bir soru hala duruyordu: DNA'nın yapısı nasıldı? Erwin Chargaff bu soruya dair, birçok farklı türden DNA izole ederek adenin isimli DNA bazlarının miktarının timin adlı bazların miktarıyla orantılı olduğunu ve bir organizmanın DNA'sındaki sitozin bazlarının miktarının guanin miktarına yaklaşık olarak orantılı olduğunu gösteren, bazı görüşler sundu. Bu değerli gözlem adenin, timin, sitozin ve guanin bazlarının DNA yapısıyla karmaşık bir şekilde bağlantılı bileşenler olduğunu ve hatırlanması önemli bir ilke olduğunu gösterdi. Çünkü daha sonra da açıklayacağımız gibi bu bazlar temel DNA bileşenleridir.

DNA'nın yapı bloğu **nükleotid**dir (**Şekil 2.4**). Her nükleotid deoksiriboz olarak isimlendirilen (5 karbonlu) bir **pentoz şeker**inden, bir fosfat molekülünden ve bir **azotlu baz**dan oluşur. Bu bazlar birbiriyle yer değiştirebilen birer nükleotid bileşenleridir. Her bir nükleotid – DNA'nın A'ları, T'leri, G'leri ve C'leri de denilen – **adenin (A), timin (T), guanin (G)** veya **sitozin (S)** bazlarından birini içerir.



ŞEKİL 2.4 **Nükleotid Yapısı** Tüm DNA nükleotidleri bir azotlu baz (A, C, G veya T), bir şeker ve bir fosfat grubundan oluşur. DNA'daki şeker deoksiribozdur. RNA molekülleri riboz adlı bir pentoz şekeri içerir. DNA'daki pentoz şekeri deoksiriboz olarak adlandırılır, çünkü RNA'daki riboz şekeriyle karşılaştırıldığında, bu şekerin 2 nolu karbonunda (2') oksijen yoktur. Şekerin 1 nolu karbonuna (1') bir azotlu baz; 5 nolu karbonuna (5') ise fosfat grubu eklenir. Bu yapıdan dolayı adenin ve guaninin bulunduğu baz grubu pürinler; sitozin, timin ve urasilin bulunduğu baz grubu primidinler olarak adlandırılır.

Nükleotidler DNA yapı bloklarıdır, fakat bu yapılar bir DNA molekülünü oluşturmak için nasıl düzenlenmiştir? Pek çok bilim insanı bu sorunun cevabına katkıda bulunmuş, ancak sonunda DNA'nın kesin yapısı İngiltere Cambridge Cavendish Laboratuvarında çalışan James Watson ve Francis Crick tarafından ortaya çıkarılmıştır. Londra'daki College Üniversitesindeki kimyagerler Rosalind Franklin ve Maurice Wilkins x-ışını kristalografisini kullanarak Watson ve Crick'e DNA yapısı hakkında çok değerli veriler sağladılar. Franklin ve Wilkins, DNA kristalleri üzerine x-ışınları göndererek, DNA yapısının sarmal şekilde olduğunu gösteren bir model ortaya çıkardılar. Watson ve Crick bu verilerden, Chardaff'ın bulgularından ve diğer çalışmalardan yola çıkarak bir tel yardımıyla DNA modelini ortaya koydular.

Watson ve Crick, 25 Nisan 1953'de ünlü dergi *Nature*'da "Nükleik Asitlerin Moleküler Yapısı: Deoksiribonükleik Asidin Yapısı – The Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid" makalesini yayınladılar. Bu makalenin ilk paragrafında "Deoksiribonükleik asidin (D.N.A.) yapısı hakkında bir öneride bulunuyoruz. Bu yapı biyolojik açıdan önemli orjinal özelliklere sahiptir." ibaresi bulunmaktadır. DNA'nın önemi ve son 50 yılda DNA yapısı hakkında neler öğrendiğimiz göz önünde tutulursa, bu açıklama yayınlanmış bilimsel bir makalede yapılmış en büyük tevazudur. Bu keşfin önemi 1962 yılında Watson, Crick ve Wilkins'e tıp alanında Nobel Ödülü verilmesiyle anlaşılmıştır.

Watson ve Crick, nükleotidlerin uzun DNA iplikçiklerini oluşturduğunu ve bir DNA molekülünün bir çift sarmal oluşturmak için, her biri diğerinin etrafını sararak birbirine dolanmış iki iplikçikten oluştuğunu saptadılar (**Şekil 2.5**). Bir DNA iplikçiği, bir nükleotidin şekerini yanındaki diğer nükleotidin fosfat grubuna bağlayan **fosfodiester bağları** ile birarada tutulan bir nükleotid dizisidir (Şekil 2.5). Bir iplikçikteki baz dizilerinin sıralanışı farklılık gösterebilir. Örneğin, C içeren bir nükleotid A, T, G veya C içeren bir başka nükleotide bağlanabilir.

Nükleotidlerin oluşturduğu her bir iplikçik bir **polarite**ye sahiptir; iplikçiklerin 5′ ve 3′ *u*çları vardır (Şekil 2.5). *Polarite*den kasıt, deoksiriboz şekerin karbonlarıdır. Bir iplikçiğin 5′ ucunda 5 nolu karbondaki fosfat başka bir nükleotide bağlanmaz, ancak 3 nolu karbonla bir fosfodiester bağı kurulur. 3′ ucunda ise 5 nolu karbondaki fosfat bir diğer nükleotide bağlanır, ancak 3 nolu karbon diğer bir nükleotidle birleşmez. Nükleotid yapısının bu durumu önemsiz gibi görünse de, DNA'nın polaritesi laboratuvardaki rutin DNA manipulasyonları ve replikasyonu için önemlidir.

Watson ve Crick, belki de tüm biyolojideki en ünlü moleküler model olan, DNA moleküllerinin sağa doğru dönen bir çift sarmalı oluşturmak için birbirlerinin etrafında paketlenen, birbirine bağlı iki iplikçikten oluştuğunu buldular (Şekil 2.5). İki iplik karşı iplikteki **komplementer (tamamlayıcı) baz çiftleri** arasındaki hidrojen bağlarıyla birleşir (Şekil 2.5). Adenin timinle, guanin sitozinle baz çifti oluşturur. Bu modelden Chargaff'ın gözlemleri kolaylıkla anlaşılmaktadır. Bir organizmanın DNA'sındaki adenin oranı timine, guanin oranı ise sitozin oranına eşittir. Çünkü bu bazlar bir DNA molekülünde birbirleriyle eşleşirler.

Bir çift sarmaldaki iki nükleotid ipliği **antiparalel**dir – her bir ipliğin polaritesi diğerinin tersidir. Bu oryantasyon, tamamlayıcı baz çiftlerini hizalamak ve hidrojen bağlarını bir diğeriyle sıralamak için gereklidir. Bu çift sarmal bir çeşit kıvrımlı merdivene benzemektedir. Bu merdivenin basamakları tamamlayıcı baz çiftlerinden, merdivenin yanları ise DNA omurgasını oluşturan şeker ve fosfat moleküllerinden oluşmaktadır.

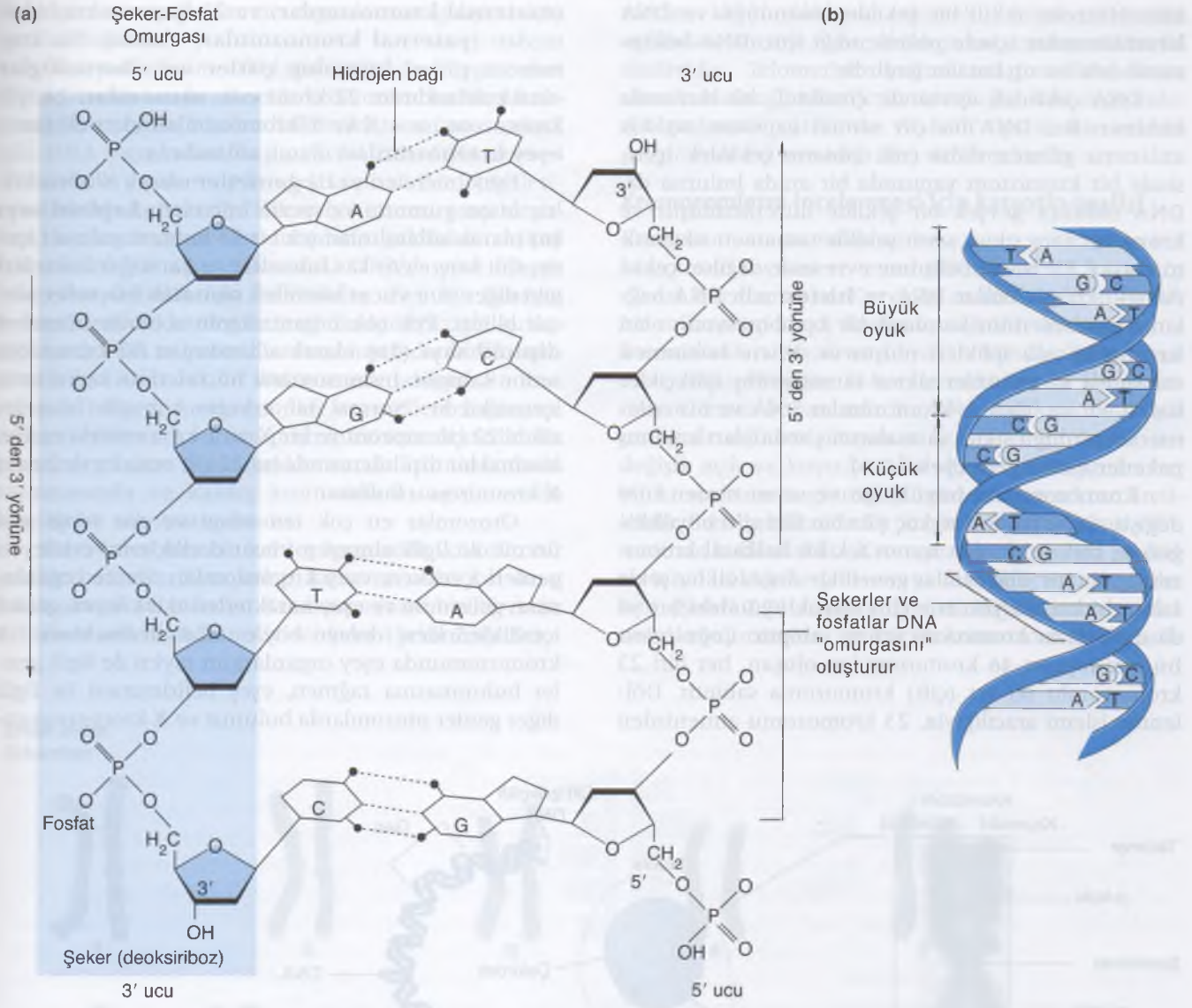
Gen Nedir?

Genler çoğunlukla kalıtım birimleri olarak tanımlanır, ancak tam olarak gen nedir? **Gen,** hücreye özgü bir protein ya da özel bir tip RNA sentezinin komutunu veren bir nükleotid dizisidir. Genlerin tümü bir protein üretmek için kullanılmaz. Örneğin, transfer RNA (tRNA) genleri tRNA moleküllerinin yapımında kullanılır. tRNA'lar protein sentezi için gerekli olsalar da, bir protein üretmek için translasyona uğramazlar. Çok sayıda daha küçük ve daha büyük genler bulunsa da, çoğu gen yaklaşık olarak 1 000-4 000 nükleotid (nt) uzunluğundadır. Bir hücrenin ürettiği proteinleri kontrol ederek, genlerin, hücrelerin, dokuların ve organların oluşumunu nasıl etkilediği hem mikroskopla hem de çıplak gözle görülebilir. Bu kalıtsal dış görünüş, **karakter** olarak adlandırılır. Hücrelerinizde bulunan DNA aracılığıyla ebeveyninizden göz rengi ve ten rengi gibi karakterleri miras alırsınız. Genler sadece hücre metabolizmasını, davranışsal ve zekâ gibi bilişsel yetenekleri etkilemez, aynı zamanda belirli tipteki genetik hastalıklara yatkınlığımızı da etkilerler.

Bazı karakterler tek bir genle kontrol edilir, fakat karakterlerin çoğu, karmaşık yollarla birbirini etkileyen pek çok proteini üreten çoklu (multiple) genler tarafından belirlenir. Kısım 2.4'te genlerin hücrelerdeki protein sentezini nasıl yönettiğini inceleyeceğiz. Bu kitap boyunca gen örnekleri, genlerin fonksiyonları ve biyoteknolojinin farklı alanlarındaki pek çok uygulamaları açıklanacaktır.

2.3 Kromozom Yapısı, DNA Replikasyonu ve Genomlar

Genlerin görevlerini nasıl yaptıklarını anlatmadan önce, DNA'nın kromozomlarda nasıl ve niçin organize olduğunu ve hücrelerde DNA'nın kopyasının nasıl çıkarıldığını anlamanız önemlidir.



ŞEKİL 2.5 DNA Çift İplikçikli Bir Sarmaldır (a) Tamamlayıcı baz çiftleri arasındaki nükleotidlerin iki iplikçiği birbirine hidrojen bağlarıyla bağlıdır. Daima adenin (A) bazları timin (T) bazlarıyla, sitozin (C) bazları ise guanin (G) bazlarıyla eşleşir. (b) İki iplik birbirlerinin etrafında sarılır; böylece DNA'nın genel görünüşteki yapısı, bazların sarmalın merkezinde sıralandığı şeker-fosfat omurgalı çift iplikçikli bir sarmal olarak ortaya çıkar.

Kromozomun Yapısı

Bir sorunla karşılaştığınızı varsayın. Eğer onu çözerseniz, geri kalan lisans öğreniminizin bedava olacağı ifade edilmektedir. Size tümü sökülmüş ya da dağıtılmış farklı renklerde 46 paket iplik içeren bir sepet verilse ve iplikleri 46 eşit top şeklinde düzenlemeniz istense, bu sorunu nasıl çözersiniz? Karmakarışık iplikleri rastgele kesmeye başlarsanız muhtemelen başaramazsınız. Eğer iplikleri özenle birbirinden ayırırsanız ve farklı renkteki iplikleri bir top şeklinde sararsanız, sonuçta elbette iplikleri 46 eşit top halinde sınıflandırabilirsiniz. Bu benzetim, bir insan hücresi DNA'sının eşit paketler halinde bölünmesi ve sınıflandırılmasıyla ilgili soruna oldukça basit bir çözüm sağlamaktadır.

Her insan hücresinde bulunan 3 milyar baz çiftlik (bç – bp) DNA çözüldüğünde yaklaşık 183 cm uzunluğunda olacaktır – her bir hücrenin küçücük çekirdeğinde şaşırtıcı miktarda materyal paketlenmiştir. Bu DNA, hücre bölündüğünde eşit bir şekilde bölünmelidir. Aksi halde kayıp DNA yıkıcı sonuçlara neden ola-

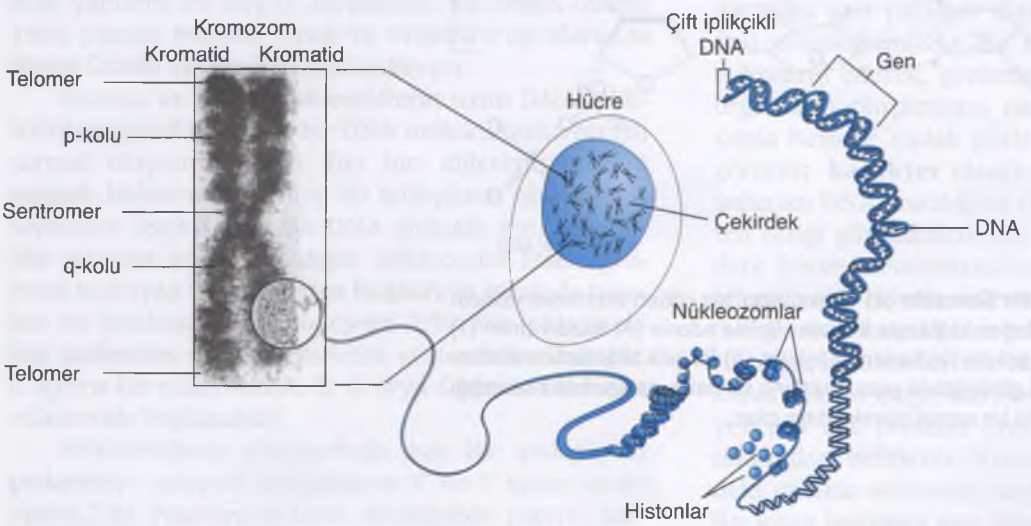
bilir. Hücreler etkili bir şekilde bölündüğü ve DNA **kromozomlar** içinde paketlendiği için, DNA bölünmesindeki bu tip hatalar nadirdir.

DNA çekirdek içerisinde çözülmüş bir durumda bulunur. Bu, DNA'nın çift sarmal yapısının açıldığı anlamına gelmez; daha çok, tamamı çekirdek içerisinde bir kromozom yapısında bir arada bulunsa da, DNA oldukça gevşek bir şekilde düzenlenmiştir ve kromozomlara sıkıca sarılı şekilde tamamen sıkıştırılmamıştır. Bir hücre bölünme evresinde değilse, çekirdekteki kromozomlar DNA ve **histon** adlı DNA bağlama proteinlerinin karmaşık bir kombinasyonu olan **kromatin** adlı iplikleri oluşturur. Hücre bölünmesi esnasında kromatinler sıkıca sarmalanmış iplikçikler halini alır ve böylece kromozomlar DNA ve histonların oluşturduğu sıkıca sarmalanmış ve boyları kısalmış paketler haline gelir (**Şekil 2.6**).

Kromozomların büyüklüğü ve sayısı türden türe değişir. Çoğu bakteri birkaç yüz bin baz çifti büyüklüğünde, birkaç bin gen içeren tek bir halkasal kromozoma sahiptir. Ökaryotlar genellikle doğrusal bir şekle sahip, birkaç milyon baz çifti büyüklüğündeki bir ya da daha fazla kromozom setine sahiptir. Çoğu insan hücresi toplam 46 kromozomdan oluşan, her biri 23 kromozomlu iki set (çift) kromozoma sahiptir. Döllenme işlemi aracılığıyla, 23 kromozomu annenizden (**maternal kromozomlar**) ve 23 kromozomu babanızdan (**paternal kromozomlar**) alırsınız. Bu kromozom çiftleri **homolog çiftler** veya **homologlar** olarak adlandırılır. 22 kromozom **otozomlar**; 23. çift kromozom ise – X ve Y kromozomlarından oluşan – **eşey kromozomları** olarak adlandırılır.

Eşey hücreleri ya da **gametler** olarak isimlendirilen insan yumurta ve sperm hücreleri, **haploid sayı (*n*)** olarak adlandırılan tek bir 23 kromozomlu set içerir. Cilt hücreleri, kas hücreleri ve karaciğer hücreleri gibi diğer tüm vücut hücreleri **somatik hücreler** olarak bilinir. Pek çok organizmanın somatik hücreleri **diploid sayı (2*n*)** olarak adlandırılan iki kromozom setine sahiptir. İnsan somatik hücreleri 46 kromozom içermektedir. Normal bir erkeğin somatik hücrelerinde 22 çift otozom ve bir X ve Y kromozomu vardır. Normal bir dişi hücresinde ise 22 çift otozom ve 2 adet X kromozomu bulunur.

Otozomlar en çok ten rengi ve göz rengi gibi üreme ile ilgili olmayan vücut özelliklerini etkileyen genleri içerirken; eşey kromozomları üreme organlarının gelişimini ve eşey karakterlerini etkileyen genler içerdiklerinden dolayı böyle adlandırılmaktadır. Y kromozomunda eşey organlarının tayini ile ilgili genler bulunmasına rağmen, eşey belirlenmesi ile ilgili diğer genler otozomlarda bulunur ve X kromozomun-



ŞEKİL 2.6 Kromozom Organizasyonu Bölünmemiş bir hücrede kromozomal DNA kromatin olarak isimlendirilen çözülmüş bir görünümdedir. Elektron mikroskobuyla gözlendiğinde, histon proteinlerinin bir ipteki tespih tanesi görünümünü verecek şekilde DNA'nın sıkı bir şekilde sarıldığı parçacıklar olarak görev yaptıkları anlaşılır. Hücre bölündüğünde kromatin sıkı iplikler ve sıkı kıvrımlı ilmikli yapılar halinde yoğunlaşır. Sonuçta bu sıkı kıvrımlı ilmikler, oldukça yoğun DNA demetinden oluşan tam bir kromozom oluşturmak için, diğer proteinlerin yardımıyla birlikte sıkı bir şekilde paketlenir. Her bir kromozom bir sentromer aracılığıyla birleşen iki kardeş kromatidden oluşur. Kromozom kolları sentromerin bir tarafındaki kromatidin oranına göre *p* ve *q kolları* olarak belirlenir. Kromozomun uçları telomerler olarak adlandırılır.

daki genlerin çoğu üreme organlarının gelişimi için gerekli değildir.

Ökaryotik kromozomların çoğunda yaygın olan birkaç özellik vardır. Her bir kromozom **kardeş kromatidler** olarak isimlendirilen iki tane ince, çubuk gibi DNA yapısından oluşur (Şekil 2.6). DNA sentezi sırasında kopyalanmış kardeş kromatidler birbirlerinin tam bir kopyasıdır. Hücre bölünmesi gerçekleşirken kardeş kromatidler meydana geldikleri orjinal hücrelerinkiyle aynı miktardaki DNA'yı yeni oluşan hücrelere vermek için bölünürler. Her bir ökaryot kromozomu iki kardeş kromatidin birbirleriyle birleştiği, sarılı DNA ve proteinlerden oluşan dar bir kromozom bölgesi olan tek bir **sentromer**e sahiptir. Bu kromozom bölgesi, kromozomları organellere bağlayan, mikrotübüller adı verilen proteinleri içermektedir. Bu proteinler, hücre bölünmesi sırasında kromozomların taşınmasında ve kardeş kromatidlerin ayrılmasında önemli bir rol oynamaktadır.

Sentromer, her bir kardeş kromatidi iki kollu bir şekilde betimler. Kısa kol **p kolu** ve uzun kol da **q kolu** olarak adlandırılır. Kromozomların her bir kolu **telomer** adlı bir bölüm ile sonlanır (Şekil 2.6). Telomerler, kromozomların çekirdek kılıfına tutunması açısından önemli olan, oldukça korunmuş nükleotid dizileridir. Telomerler, yoğun araştırmalara konu olmaktadırlar. Telomerlerin uzunluğundaki değişimlerin yaşlanma sürecinde ve belli tipteki kanserlerin gelişiminde rol oynadığı ileri sürülmektedir.

Kromozomların incelenmesi için karyotip analizi

Kromozom araştırmalarının en yaygın yollarından biri kromozom sayısını ve temel görünümlerini **karyotip** olarak hazırlamaktır. Karyotip analizlerinde, hücreler bir mikroskop slaytı üzerinde dağıtılır ve daha sonra kromozomları yayan ve boyayan kimyasallarla muamele edilir. Örneğin, G-bantlamada her bir kromozomun Giemsa boyası adlı bir DNA bağlama boyasıyla muamele edilmesi, boyanan kromozomlarda bir seri değişik açık ve koyu bantlar oluşturur. Boyanan her bir kromozomun gösterdiği benzersiz ve tekrar üretilebilir bant şekilleri farklı kromozomların tespit edilmesinde kullanılabilir. Kromozomlar boyanma şekline ve büyüklüklerine göre sıraya dizilebilir ve eşleştirilebilir (**Şekil 2.7**). İnsanlardaki en büyük kromozom 1 nolu kromozomdur, en küçük kromozom ise 21 nolu



ŞEKİL 2.7 Karyotip Analizi Bir karyotipte, kromozomları serbest bırakmak için bölünen hücreler bir cam mikroskop slaytı üzerinde dağıtılır. Kromozomlar boyanır ve toplam büyüklüklerine, sentromerin pozisyonuna ve bir karyotip oluşturmak için boyanmış modellerine göre sıraya dizilir.

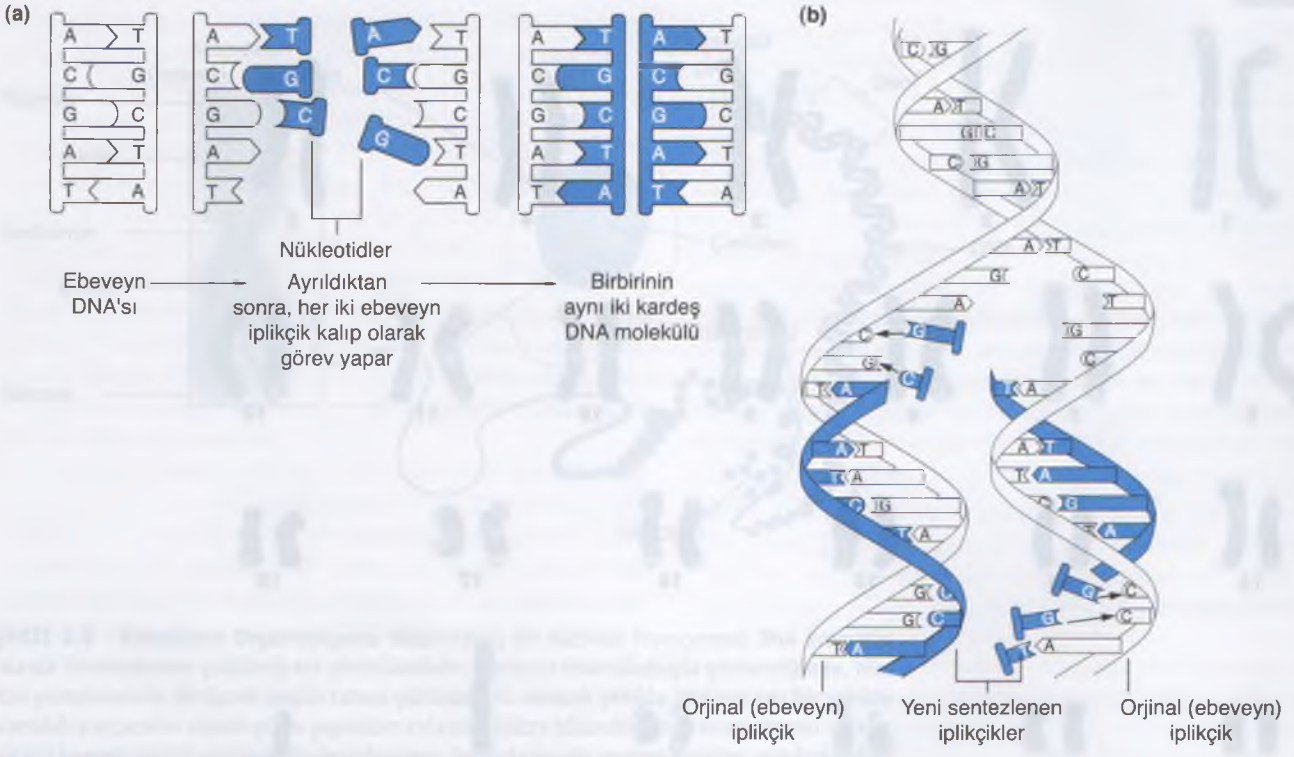
kromozomdur. Karyotipler, kromozom yapılarını çalışmak ve karşılaştırmak için çok önemlidir. Kromozomları renklendirmek için belli probların ve tekniklerin birleştirildiği daha modern bir karyotip analizi (**spektral karyotipleme**), Şekil 2.7'de gösterilen klasik karyotiplemeden daha detaylı bir kromozom yapısı analizi sağlar. Karyotip analizleri kromozom yapı ve sayısındaki anormalliklerle ilişkili insan genetik hastalıklarının teşhisinde de kullanılabilir.

DNA Replikasyonu

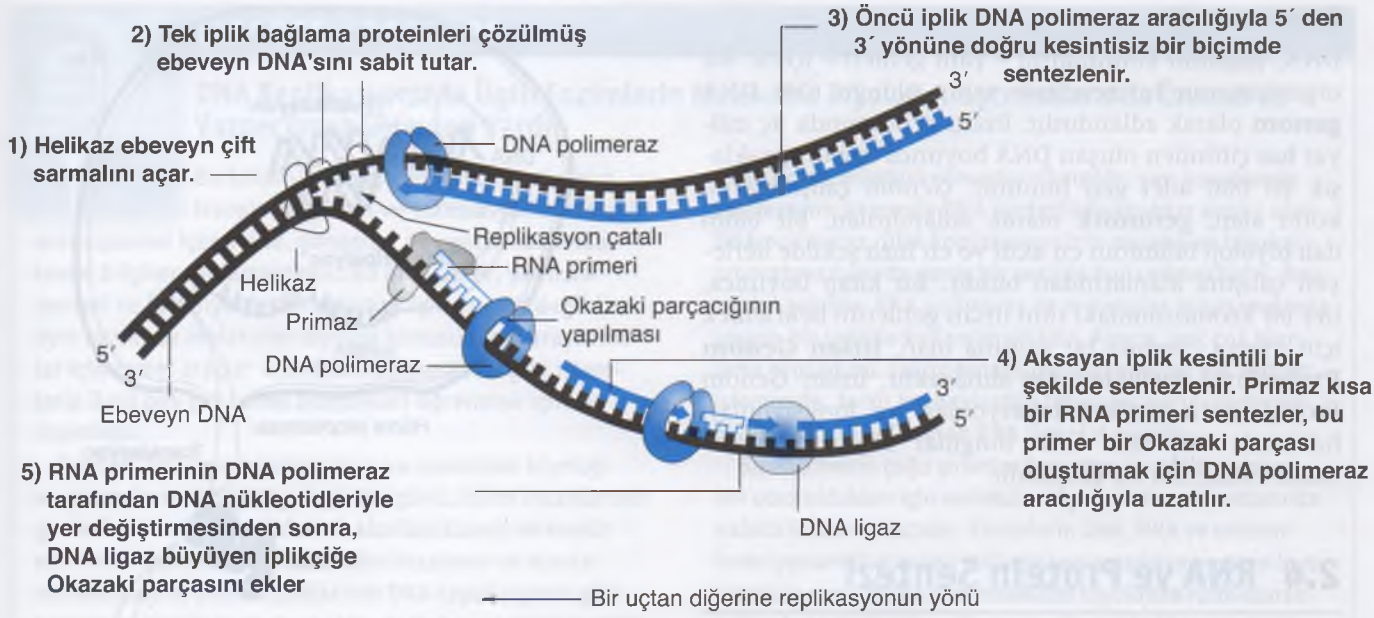
Bir hücre bölündüğünde, kopyalanan DNA'nın eşit miktarını içeren yeni hücrelerin oluşturulması gerekmektedir. Somatik hücreler **mitoz** adlı bir işlemle bölünür. Mitozda bir hücre, her biri orijinal (ebeveyn) hücrenin DNA'sının aynısı olan kopyayı içeren kardeş hücreler üretmek amacıyla bölünür. Örneğin, bir insan cilt hücresi her biri 23 çift kromozom içeren iki kardeş hücre üretmek için bölünür. Gametler, **mayoz** adlı bir süreçte oluşturulur. Mayozda bir ebeveyn hücresi sperm ya da yumurta hücresi olabilen dört kardeş hücre oluşturmak için bölünür. Mayoz sırasında kardeş hücrelerin kromozom sayısı haploid sayıya yani yarıya iner. Yumurta ve sperm hücrelerinin her biri 23 kromozomlu tek bir set içerir. Eşeyli üreme yoluyla **zigot** adlı döllenmiş bir yumurta oluşur. Zigot, bir embriyo ve devamında tam anlamıyla bir insan oluşturmak için, mitozla bölünür ve 23'ü babadan 23'ü anneden gelen kromozom olmak üzere 46 kromozom içerir.

Mitozla veya mayozla hücre bölünmesinden önce, DNA hücrede kopyalanmalıdır (replike olmalıdır). Replikasyon, **yarı korunumlu replikasyon** adlı bir işlemle meydana gelmektedir. Bu replikasyon işlemi **Şekil 2.8**'de gösterilmiştir. Replikasyon başlamadan önce çift sarmalın tamamlayıcı iki iplikçiği tek iplikler halinde ayrılmalıdır. Ayrılan bu iplikler iki yeni DNA ipliğini kopyalamak için kalıp olarak görev yapar. Bu işlemin sonunda iki yeni çift sarmal oluşturulur. Her bir sarmal bir orijinal (ebeveyn) DNA iplikçiği ve bir de yeni sentezlenen iplikçikten oluşur. Bu nedenle *yarı korunumlu* terimi kullanılır.

DNA replikasyonu birkaç farklı proteini gerektiren bir dizi aşamadan oluşur. Prokaryotlar halkasal kromozomlar içerdiğinden, prokaryotlardaki DNA replikasyonu ökaryotlarınkinden kısmen farklıdır.



ŞEKİL 2.8 DNA Replikasyonuna Genel Bir Bakış İlk olarak bir DNA molekülündeki nükleotid iplikçikleri ayrılmalıdır (a). Bu iplikçiklerin her biri yeni sentezlenecek iplik için kalıp görevi yapar, sonuçta her biri bir orijinal bir de yeni sentezlenen ipliği içeren iki DNA molekülü üretilir (b).



ŞEKİL 2.9 **Yarı Korunumlu DNA Replikasyonu.**

Burada DNA replikasyonunun tamamındaki asıl görevli bileşenlere ve anahtar kavramlara değinilecektir. Ancak prokaryotlardaki replikasyon işlemini ökaryotlarınkinden ayırt edici ince farklılıkların olduğu da unutulmamalıdır. Replikasyon, komplementer baz çiftleri arasındaki hidrojen bağlarını kırarak genel anlamıyla DNA fermuarını açan ve iki nükleotid iplikçiğini birbirinden ayıran **DNA helikaz** enzimi aracılığıyla başlatılır (Şekil 2.9). Ayrılan iplikler bir replikasyon çatalı oluşturur. Helikaz, DNA'yı çözerken **tek ipliği bağlayan proteinler** her bir ipliğe bağlanarak, baz eşleşmelerini ve yeniden bir çift sarmal oluşumunu engeller. DNA replikasyonu esnasında DNA ipliklerinin birbirinden ayrı tutulması gerektiği için bu adım önemlidir. İplikçiklerin ayrılması, **replikasyon orijinleri** adı verilen yerlerde meydana gelir. Bakteri kromozomları tek bir orijine sahiptir. Boyutlarının büyük olmaları nedeniyle, ökaryot kromozomları çok sayıda orijine sahiptir. DNA replikasyonunun çok sayıda orijinde başlaması ökaryotik kromozomların hızlı bir şekilde kopyalanmasını sağlar.

DNA replikasyonundaki bir sonraki adım yaklaşık 10-15 nükleotid uzunluğundaki kısa RNA parçalarının eklenmesidir. **RNA primerleri** olarak adlandırılan bu diziler **primaz** (ökaryotlarda α [alpha] adlı bir DNA polimeraz formu primaz gibi görev yapar) adlı bir enzim tarafından sentezlenir. Primerler, yeni DNA ipliklerinin sentezlenmesinde temel enzimler olan **DNA polimerazlar** için bağlanma alanları olarak görev yaptıklarından, DNA replikasyonu işlemini başlatırlar. DNA kopyalanmasında birkaç farklı DNA polimeraz yer alır. Bakterilerde, **DNA polimeraz III** enzimi (ökaryotlarda DNA polimeraz δ [delta] olarak adlandırılır) her bir tek iplikçiğe bağlanır ve iplik boyunca hareket ederek yeni bir DNA ipliğinin kopyalanması için bir kalıp olarak kullanılır. Bu işlem sırasında DNA polimeraz komplementer DNA iplikçiklerinin sentezlenmesi için hücrede bulunan nükleotidleri kullanır. DNA polimeraz yeni iplikleri sentezlerken 5′den 3′ yönüne doğru, daima bir yönde, çalışır ve bir nükleotidin fosfatı ile bir önceki nükleotidin şekeri arasında fosfodiester bağı oluşturarak nükleotidleri yeni sentezlenen ipliğin 3′ ucuna ekler (Şekil 2.9).

DNA polimeraz yalnızca 5′den 3′ yönüne doğru işlem yaptığı için, replikasyon **öncü iplik** denilen bir iplik boyunca kesintisiz bir biçimde gerçekleşir (Şekil 2.9). DNA polimeraz replikasyon çatalının açılmasını beklemek zorunda olduğu için, **aksayan iplik** olarak adlandırılan karşı iplikçikteki sentez kesintili bir şekilde olur. Aksayan (kesintili) iplikteki Okazaki Fragmentleri (bu fragmentleri keşfeden bilim insanları olan Reiji ve Tuneko Okazaki'nin isimleriyle anılır), DNA polimeraz replikasyon çatalı çıkışında çalışırken sentezlenir. Kesintili iplikteki Okazaki fragmentleri arasındaki kovalent bağlar fosfodiester omurgasında herhangi bir boşluğun kalmamasını sağlamak için **DNA ligaz** tarafından birleştirilirler. Sonuçta, RNA primerleri uzaklaştırılır ve bu boşluklar DNA polimeraz tarafından doldurulur.

DNA senteziyle ilgili enzimlerin fonksiyonlarını hatırlayalım. İlerde de tartışacağımız gibi, DNA polimeraz ve DNA ligaz klonlanmış DNA ile çalışan laboratuvarlarda rutin bir şekilde kullanılmaktadır (Bölüm 3).

Genom nedir?

DNA, yaşamın komutlarını – yani genleri – içerir. Bir organizmanın hücrelerinde sahip olduğu tüm DNA **genom** olarak adlandırılır. İnsan genomunda üç milyar baz çiftinden oluşan DNA boyunca dağılmış yaklaşık 20 000 adet gen bulunur. Genom çalışmalarını konu alan, **genomik** olarak adlandırılan, bir bilim dalı biyoloji biliminin en aktif ve en hızlı şekilde ilerleyen çalışma alanlarından biridir. Bu kitap boyunca, her bir kromozomdaki tüm insan genlerini belirlemek için dünya çapında bir çalışma olan, **İnsan Genom Projesi**'nin özellikleri ele alınacaktır. İnsan Genom Projesi insan genleri, lokasyonları ve fonksiyonları hakkında heyecan verici bulgular sağlayan, genomikte muazzam bir girişimdir.

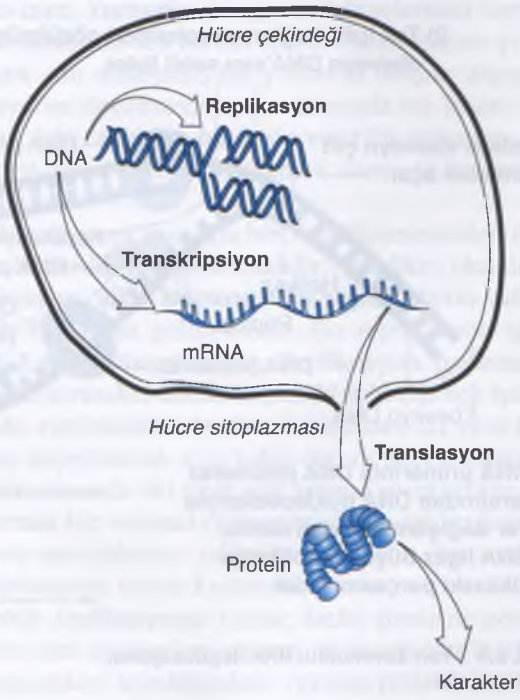
2.4 RNA ve Protein Sentezi

Genler, protein sentezini yöneterek bir hücredeki faaliyetleri ve işlevleri yönlendirirler. Bu önemli moleküllerin sayısız fonksiyonlarından bazıları aşağıda verilmiştir;

- Proteinler zarların, organellerin ve sitoplazmanın önemli bileşenleri olduğu için hücre yapısı için gereklidir.
- Proteinler, enzim olarak hücrelerdeki önemli reaksiyonları gerçekleştirirler.
- Proteinler, hücrelerin bir diğeriyle iletişim kurmak için kullandıkları hormonlar ve diğer sinyal verici moleküller olarak kritik roller oynar.
- Reseptör proteinler, moleküllerin hücreye giriş ve çıkışını sağlayan taşıyıcı proteinler ve hormonlar gibi diğer moleküllere bağlanır.
- Proteinler, antikorlar gibi vücuttaki yabancı maddeleri teşhis eder ve imha ederler.

Çok basit şekilde hücreler, proteinler olmadan işlevlerini yerine getiremezler. DNA proteinleri nasıl yapıyor? Gerçekte DNA doğrudan protein yapmaz. Genler, protein sentezlemek için ilk olarak **mesajcı RNA (mRNA)** olarak adlandırılan moleküller halinde kopyalanırlar (**Şekil 2.10**). Genel anlamıyla genler bir DNA kodundan bir RNA kodu halinde kopyalandıkları için RNA sentezi **transkripsiyon** olarak adlandırılır. Genlerin tam anlamıyla kopyası olan mRNA molekülleri, **translasyon** olarak bilinen bir işlem aracılığıyla bir proteinin üretimi için gerekli talimatların kodlarını çözen bilgileri içerir.

RNA molekülleri DNA gibi çift iplikçikli değil, tek ipliklidir, ancak RNA'nın kimyasal bileşimi DNA'nınkiyle çok benzerdir. RNA bazları da DNA bazlarıyla çok benzerdir. RNA'nın timin (T) yerine urasil (U) adlı bir baz içermesi önemli bir farklılıktır (bakınız



ŞEKİL 2.10 Hücrelerdeki Genetik Bilgi Akışı DNA transkripsiyon sırasında RNA halinde kopyalanır. RNA trasnlasyon sırasında protein sentezini yönetir. Genler, proteinler aracılığıyla bir organizmanın metabolik ve fiziksel özelliklerini ve karakterlerini kontrol eder.

Şekil 2.4). Bir diğer temel farklılık ise RNA'nın DNA'da bulunan deoksiriboz şekerinden kısmen farklı bir yapıya sahip riboz adlı bir pentoz şekeri içermesidir.

Transkripsiyon ve translasyon arasındaki farklılığı hatırlamanın kolay bir yolu, translasyonun bir dilden diğer bir dile çevrim yapar gibi RNA'dan protein kodlarına şeklinde bir değişimi kapsamasıdır. Proteinlerin sentezlenmesi ve mRNA üretimi aracılığıyla, DNA bir hücrenin özelliklerini ve kendi karakterlerini yönetir (**Şekil 2.11**). Transkripsiyon ve translasyonun bu işlevleri hücre faaliyetleri ve özelliklerini kontrol ederek, hücrelerdeki genetik bilgi akışını yönetir. Bu bölümde transkripsiyon ve translasyonun temel ilkeleri ve gen ekspresyonunun hücreler tarafından nasıl kontrol edilebildiği açıklanacaktır.

Kodu Kopyalama: Transkripsiyon

DNA, RNA yapımı için nasıl kalıp olarak kullanılır? **RNA polimeraz,** transkripsiyon için anahtar rolündeki bir enzimdir. Çekirdek içerisinde RNA polimeraz, DNA sarmalını açar ve daha sonra DNA'nın bir ipliği RNA halinde kopyalanır. DNA'nın tamamının kopyalandığı DNA replikasyonundan farklı olarak, transkripsiyon bir kromozomun sadece genleri içeren kısımla-



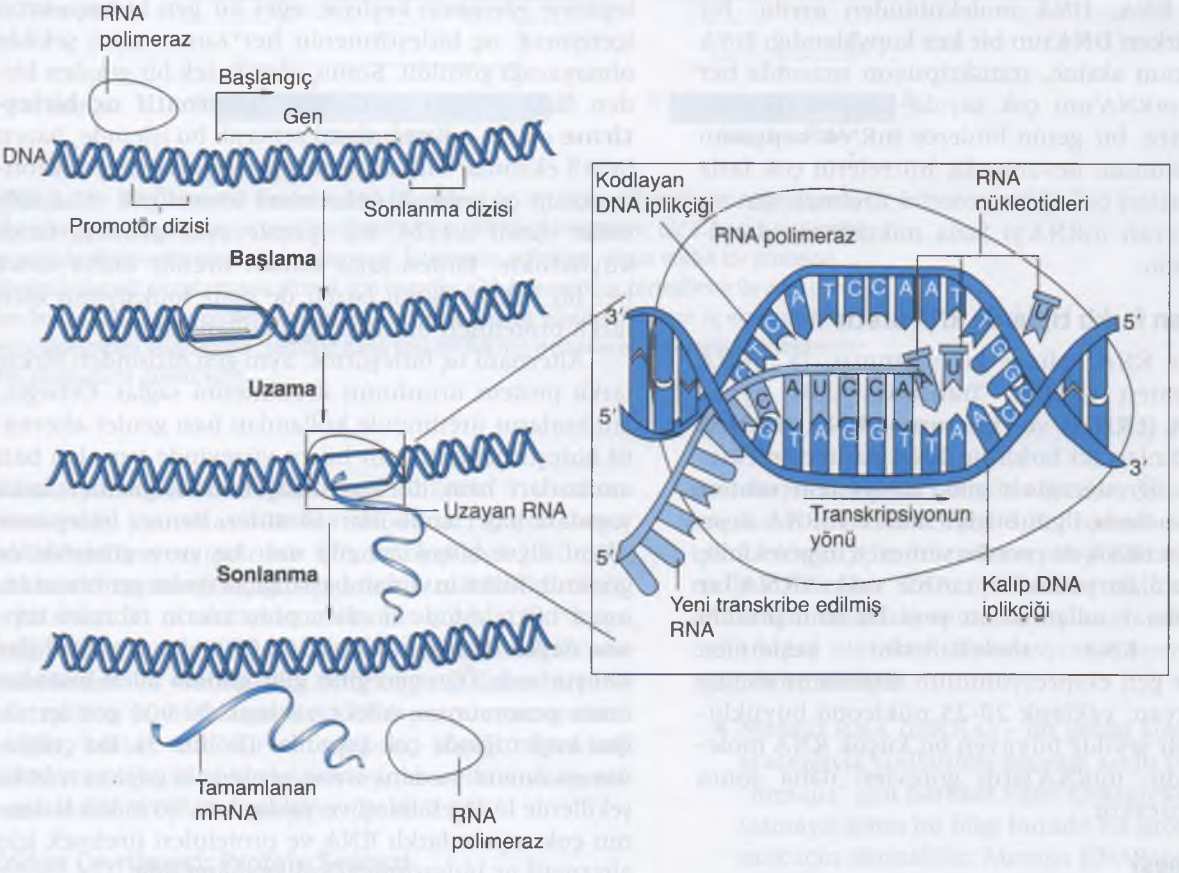
TİCARET ARAÇLARI

DNA Replikasyonuyla İlgili Enzimlerin Moleküler Biyoloji Araştırmalarında Önemli ve Vazgeçilmez Görevleri Vardır

Bu bölüm DNA yapısının, replikasyonun, transkripsiyonun ve translasyonun önemli prensiplerini içermekte, genomlar ve genler hakkında temel bilgiler sağlamaktadır. Bu prensipler, yalnızca genleri ve fonksiyonlarını anlamak için önemli değildir, aynı zamanda moleküler biyoloji konusundaki araştırmalar için temel araçlar olan DNA replikasyonu gibi işlemlerle ilgili pek çok temel bileşenleri öğrenmek için de önemlidir.

Gelecek bölümde biyoteknoloji ve moleküler biyoloji araştırmalarının büyüleyici görünüşünü, bilim insanlarının genleri nasıl tespit ettiklerini, klonladıklarını ve analiz ettiklerini öğreneceksiniz. Genleri inceleme ve klonlama teknolojisi, bilim insanlarının DNA replikasyonu gibi işlemlerle ilişkili enzimler hakkında daha çok bilgiye sahip olmalarıyla mümkün olmuştur. Örneğin, yarı korunumlu replikasyon sırasında DNA sentezinde anahtar enzim olan DNA polimeraz, DNA kopyalaması için moleküler biyoloji laboratuvarlarında geniş bir şekilde kullanılmaktadır. Benzer bir şekilde, RNA polimeraz da moleküler araştırmalarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ayrıca, pek çok klonlama prosedürü, rekombinant DNA teknolojisi adı verilen işlemlerde, farklı kaynaklardan DNA parçalarını birbirine bağlamak için kullanılan DNA ligaza dayalıdır.

Bu enzimlerin çoğu şirketlerden satın alınabilir ve nispeten ucuz oldukları için moleküler biyoloji laboratuvarlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Enzimlerin DNA, RNA ve onların fonksiyonları üzerindeki etkilerini anlamadıkça modern biyoteknoloji uygulamaları ve moleküler biyolojide rutin olarak kullanılan tekniklerin çoğunu uygulamak imkânsızdır.



ŞEKİL 2.11 **Transkripsiyon** Transkripsiyon sırasında RNA polimeraz bir gen dizisinin hemen yanındaki promotör bölgesindeki DNA'ya bağlanır ve DNA sarmalını açar. RNA polimeraz bir iplikçiği bir RNA molekülü halinde kopyalayarak kalıp DNA boyunca hareket eder. RNA polimeraz bir sonlandırıcı diziyle karşılaşınca DNA'dan ayrılır ve transkripsiyon sona erer.

rında meydana gelir. RNA polimeraz transkripsiyonun başlayacağı yeri nasıl bilmektedir? Çoğu genin çok yakınında, RNA polimerazın genlerin belirli bölgelerine bağlanmasını sağlayan, **promotör** adı verilen, özel bir nükleotid dizisi vardır. **Transkripsiyon faktörleri** olarak isimlendirilen proteinler, RNA polimerazın promotörü bulmasına ve DNA'ya bağlanmasına yardımcı olur. Ayrıca, **hızlandırıcı (enhancer)** adlı diziler de transkripsiyonda önemli roller oynayabilir.

RNA polimeraz bir promotöre bağlandıktan sonra DNA'nın bir bölgesini açarak iki iplikçiği ayırır. **Kalıp dizi** adlı yalnızca tek bir iplikçikteki dizi (karşısındaki *kodlayan dizi* olarak adlandırılmıştır) RNA polimeraz aracılığıyla kopyalanır. Bir promotörün varlığı hangi DNA ipliğinden transkripsiyon yapılacağını belirler. RNA polimeraz düzgün bir şekilde yönelir yönelmez, komplementer bir RNA ipliği kopyalamak için 5′ yönünden 3′ yönüne doğru ribonükleotidler arasında fosfodiester bağları oluşturarak, kalıp DNA ipliği boyunca işlem yapar (Şekil 2.11). RNA polimeraz bir genin sonuna ulaştığında sonlandırıcı bir diziyle karşılaşır. Bu diziler RNA'nın sonunda bir düğüm oluşturmak için ya belli proteinlere bağlanır ya da baz çiftleri meydana getirirler. Sonuç olarak RNA polimeraz ve yeni oluşan RNA, DNA molekülünden ayrılır. Bir hücre bölünürken DNA'nın bir kez kopyalandığı DNA replikasyonunun aksine, transkripsiyon sırasında her bir gen için mRNA'nın çok sayıda kopyası çıkarılır. Bazen bir hücre, bir genin binlerce mRNA kopyasını çıkarır. Bu bölümün devamında, hücrelerin çok fazla ihtiyaç duydukları belirli bir proteini üretmek için bu proteini kodlayan mRNA'yı fazla miktarlarda ürettiğini göreceksiniz.

Transkripsiyon farklı tiplerde RNA üretir

Pek çok genin RNA halinde kopyalanmasıyla mRNA üretildiğini zaten gördük. Transkripsiyonla ayrıca **taşıyıcı RNA (tRNA)** ve **ribozomal RNA (rRNA)** olarak adlandırılan iki farklı tip RNA da üretilmektedir. Birazdan öğreneceğiniz gibi, bir protein sentezi için gerekli kodlarla ilgili bilgiyi sadece mRNA taşır, ancak tRNA ve rRNA da protein sentezi için gereklidir.

Bilim insanları yakın bir tarihte **mikroRNA'lar (miRNAs)** olarak adlandırılan yeni bir sınıf protein kodlamayan RNA moleküllerini keşfettiler. mikroRNA'lar gen ekspresyonunun düzenlenmesinde özel rol oynayan, yaklaşık 20-25 nükleotid büyüklüğünde, hızlı bir şekilde büyüyen bir küçük RNA molekülleri ailesidir. miRNA'ların görevleri daha sonra kısaca açıklanacaktır.

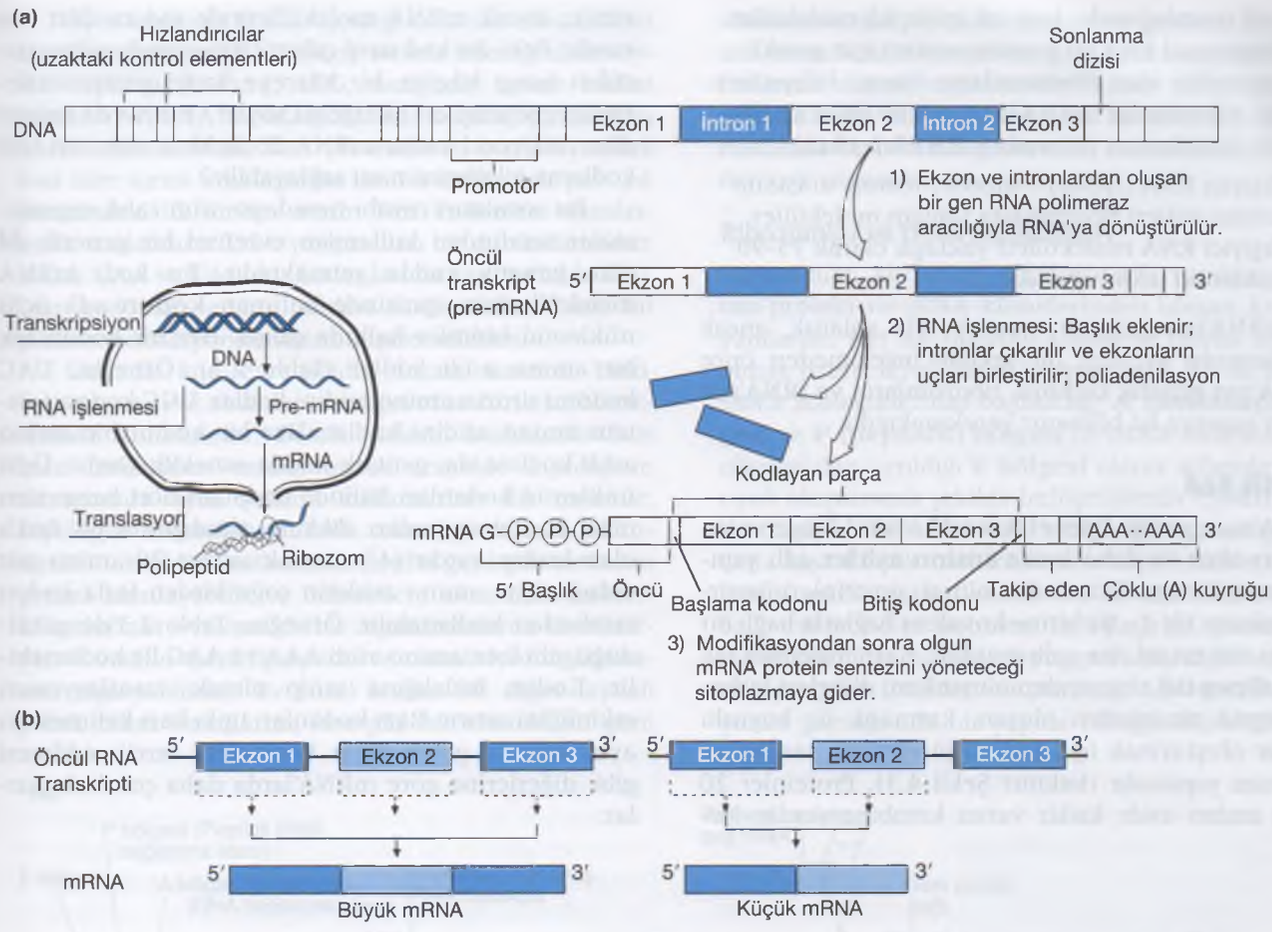
mRNA işlenmesi

Ökaryotik hücrelerde bir genden kopyalanan ilk mRNA **öncül transkript (pre-mRNA)** olarak adlandırılır. Bu mRNA olgunlaşmamıştır ve tam olarak fonksiyonel değildir. Öncül transkriptler protein sentezi için hazır olmadan önce, tamamı mRNA işlenmesi olarak adlandırılan, bir dizi modifikasyon geçirirler. Modifikasyonlardan biri **RNA uç birleştirme (splicing)** işlemini içerir (**Şekil 2.12**). Transkripsiyonun ilk detaylı incelenmesi sonucunda, bilim insanları genlerin **intron** adlı protein kodlama bilgisi içermeyen DNA parçaları aracılığıyla kesintili olduğunu öğrendiklerinde çok şaşırdılar. İntronlar, **ekzonlar**ın veya bir genin protein kodlayan dizilerinin arasında bulunmaktadır. İntron ve ekzonlar mRNA'nın transkripsiyonu sırasında kopyalanırlar. mRNA'nın bir proteinin yapımında kullanılabilmesinden önce, mutlaka ekzonlar birbirine eklenmelidir. Basit bir benzetimle, intronları cümlenin anlam kazanabilmesi için uzaklaştırılması gereken, cümle içine rastgele eklenmiş harfler olarak düşünebilirsiniz. Uç birleştirmede intronlar öncül transkriptten kesilip çıkarılır ve yan yana bulunan ekzonlar, intronsuz tam bir fonksiyonel mRNA oluşturmak için, birbirine eklenir.

Uç birleştirme işlemi sonuçta tek bir genden üretilebilen protein tiplerinde esneklik sağlar. Genler ilk keşfedildiklerinde, bilim insanları tek bir genin sadece bir protein üretebildiğini düşünmüşlerdi. Ancak, birleştirme işleminin keşfiyle, eğer bir gen birkaç ekzon içeriyorsa, uç birleştirmenin her zaman aynı şekilde olmayacağı görüldü. Sonuç olarak, tek bir genden birden fazla protein üretilebilir. **Alternatif uç birleştirme** olarak adlandırılan karmaşık bu işlemde, bazen belirli ekzonlar birbiriyle birleştirebilir ve diğer ekzonlar kesip çıkarılır. Bu ekzonlara intron gibi muamele edilir (Şekil 2.12b). Bu işlemle aynı genden, farklı büyüklükte, birden fazla mRNA üretilir. Daha sonra her bir mRNA farklı bazen de eşsiz fonksiyonu olan farklı proteinleri üretmek için kullanılabilir.

Alternatif uç birleştirme, aynı gen dizisinden birkaç farklı protein ürününün üretilmesini sağlar. Örneğin, antikorların üretiminde kullanılan bazı genler alternatif birleştirmelerle hem hücre yüzeyinde yer alan bazı antikorları hem de kan dolaşımına salgılanan farklı yapıdaki diğer antikorları üretirler. Benzer birleştirme işlemi diğer birçokları gibi sinir taşıyıcısı genlerde de gözlenir. Bilim insanları başlangıçta insan genomunun, insan hücrelerinde üretilen proteinlerin tahmini sayısına dayalı olarak, yaklaşık 100 000 adet gen içerdiğini sanıyorlardı. Öğreneceğiniz gibi, genom bilim insanları insan genomunun sadece yaklaşık 20 000 gen içerdiğini keşfettiğinde çok şaşırdılar (Bölüm 3). Bu çelişkinin en önemli nedeni, insan genlerinin çoğunun farklı şekillerde birleşebilmesi ve yaklaşık % 90'ından fazlasının çok sayıda farklı RNA ve proteinleri üretmek için alternatif uç birleştirmeyi kullanabilmesidir.

Bir diğer işlenme tipi, mRNA'nın 5′ ucuna bir metil grubu içeren bir guanin bazının eklenmesidir (Şekil 2.12). 5′ başlık (cap) olarak bilinen bu yapı



ŞEKİL 2.12 Bir Ökaryotik Gen ve mRNA İşlenmesi (a) Bir ökaryotik genin transkripsiyonunun ürettiği öncül transkript veya öncül mRNA'nın, RNA uç birleştirme, bir 5′ başlık eklenmesi ve poliadenilasyonlar aracılığıyla işlenmesi. İşlemenin ardından, olgun mRNA bir proteine dönüştürüleceği sitoplazmaya gitmek için hazırdır. (b) Alternatif uç birleştirme ile aynı genden farklı mRNA'lar ve proteinler üretilebilir. Soldaki daha büyük mRNA'nın üç ekzonun birleştirilmesinden oluştuğuna, sağdaki daha kısa mRNA'nın ise sadece iki ekzonun birleşmesinden oluştuğuna dikkat edin.

translasyon sırasında mRNA molekülünün 5′ ucunun ribozomda tanınmasında bir rol oynar. Daha sonra **poliadenilasyon** adlı bir işlemle, yaklaşık 100-300 nükleotid uzunluğundaki bir adenin nükleotidi dizisi mRNA'nın 3′ ucuna eklenerek, bir çoklu (A) "kuyruğu" oluşturur (Şekil 2.12). Bu kuyruk mRNA'nın stabilitesini ve translasyon için uygunluğunu artırarak, mRNA'yı, sitoplazmadaki RNA parçalayan enzimlerden korur. Bu süreci takiben, olgun, işlenmiş mRNA molekülü çekirdekten ayrılır ve translasyona hazır halde sitoplazmaya girer (Şekil 2.12).

Kodun Çevrilmesi: Protein Sentezi

Protein kodlayan bir genin esas fonksiyonu bir protein üretmektir. Bu kısımda, amino asitlerden bir proteinin sentezlenmesi için mRNA'daki bilginin kullanıldığı translasyona kısaca bir göz atacağız. Translasyon birkaç farklı RNA molekülü tipini içeren çok adımlı bir işlem olduğu için, hücrelerin sitoplazmasmda meydana gelir. Her bir RNA tipinin önemli fonksiyonlarını bilirseniz, translasyonun detaylarını anlamanız çok daha kolay olacaktır. Translasyonun temel bileşenleri aşağıda verilmiştir.

- Mesajcı RNA (mRNA) – bir genin kopyası. DNA aracılığıyla kodlanmış genetik kodu taşıyan bir "mesajcı" gibi hareket eder. Çekirdekten sitoplazmaya gelen bu bilgi burada bir protein üretmek için okunabilir. Mesajcı RNA'lar uzunluk bakımından yaklaşık 1000 nükleotidle birkaç bin nükleotid arasında değişiklik gösterir.
- Ribozomal RNA (rRNA) – 1500 ilâ 4700 nükle-

otid uzunluğunda, kısa tek iplikçikli moleküller. Ribozomal RNA'lar protein sentezi için gerekli organeller olan **ribozomların** önemli bileşenleridir. Ribozomlar mRNA'ları tanır ve onlara bağlanır, translasyon sırasında mRNA'ları okur.

- Taşıyıcı RNA (tRNA) – protein sentezi sırasında amino asitleri ribozomlara taşıyan moleküller. Taşıyıcı RNA molekülleri yaklaşık olarak 75-90 nükleotid uzunluğundadır.

mRNA'nın yapısını ayrıntılarıyla anlattık, ancak translasyonu ayrıntılı bir şekilde incelemeden önce mRNA'nın genetik kodunu, ribozomların ve tRNA'nın özgün yapısını iyi bilmeniz gerekmektedir.

Genetik Kod

mRNA'nın içerdiği **"genetik kod"** nedir? Ribozomlar, kodları okur ve daha sonra **amino asitler** adlı yapıtaşlarının birleştirilmesinden oluşan proteinleri üretirler (bakınız Ek 2). Birbirine kovalent bağlarla bağlı bir amino asit zinciri, bir polipeptiddir. Bazı proteinler tek bir **polipeptid** zincirinden oluşurken; diğerleri birkaç polipeptid zincirinden oluşan, karmaşık üç boyutlu yapılar oluşturmak için birbirinin etrafına sarılan ve katlanan yapılardır (bakınız Şekil 4.3). Proteinler 20 farklı amino aside kadar varan kombinasyonlar içerebilir, ancak mRNA moleküllerinde sadece dört baz vardır. Peki, bu kod nasıl çalışır? Ribozomda şifresi çözülen hangi bilgiler, bir hücreye hangi amino asitlerin bir proteine ait olduğunu söyler? mRNA'da sadece dört nükleotid varsa, mRNA 20 farklı amino asit için kodlama bilgilerini nasıl sağlayabilir?

Bu soruların cevabı neredeyse tüm canlı organizmalar tarafından kullanılan evrensel bir genetik dil olan genetik kodda yatmaktadır. Bu kod, mRNA moleküllerinin içerisinde bulunan **kodon** adlı üçlü nükleotid birimler halinde çalışır. Her bir kodon tek bir amino asidi kodlar (Tablo 2.3). Örneğin, UAC kodonu tirozin amino asidini kodlar, UGC kodonu sistein amino asidini kodlar. Her bir kodon bir amino asidi kodlasa da, genetik kodda esneklik vardır. Üçlü nükleotid kodonları halinde toplanan dört bazın tüm olası kombinasyonları dikkate alındığında 64 farklı olası kodon vardır (4^3). Ancak sadece 20 amino asit olduğu için, amino asitlerin çoğu birden fazla kodon tarafından kodlanabilir. Örneğin, Tablo 2.3'de görüldüğü gibi lisin amino asidi AAA ve AAG ile kodlanabilir. Kodon fazlalığına sahip olmak, translasyonun etkinliğini artırır. Bazı kodonlar, tıpkı bazı kelimelerin aynı anlama gelen diğer kelimelere tercih edilmesi gibi, diğerlerine göre mRNA'larda daha çok bulunurlar.

TABLO 2.3 GENETİK KOD

Birinci Baz (5' Ucu)	İkinci baz: U	İkinci baz: C	İkinci baz: A	İkinci baz: G	Üçüncü Baz (3' Ucu)
U	UUU, UUC: Fenilalanin (Phe)	UCU, UCC, UCA, UCG: Serin (Ser)	UAU, UAC: Tirozin (Tyr)	UGU, UGC: Sistein (Cys)	U
	UUA, UUG: Lösin (Leu)		UAA: *Dur*	UGA: *Dur*	C
			UAG: *Dur*	UGG: Triptofan	A
					G
C	CUU, CUC, CUA, CUG: Lösin (Leu)	CCU, CCC, CCA, CCG: Prolin (Pro)	CAU, CAC: Histidin (His)	CGU, CGC, CGA, CGG: Arjinin (Arg)	U
			CAA, CAG: Glutamin (Gln)		C
					A
					G
A	AUU, AUC, AUA: İzolösin (Ile)	ACU, ACC, ACA, ACG: Treonin (Thr)	AAU, AAC: Asparajin (Asn)	AGU, AGC: Serin (Ser)	U
					C
	AUG: Metiyonin (Met) BAŞLANGIÇ KODONU		AAA, AAG: Lisin (Lys)	AGA, AGG: Arjinin (Arg)	A
					G
G	GUU, GUC, GUA, GUG: Valin (Val)	GCU, GCC, GCA, GCG: Alanin (Ala)	GAU, GAC: Aspartik asit (Asp)	GGU, GGC, GGA, GGG: Glisin (Giy)	U
					C
			GAA, GAG: Glutamik asit (Glu)		A
					G

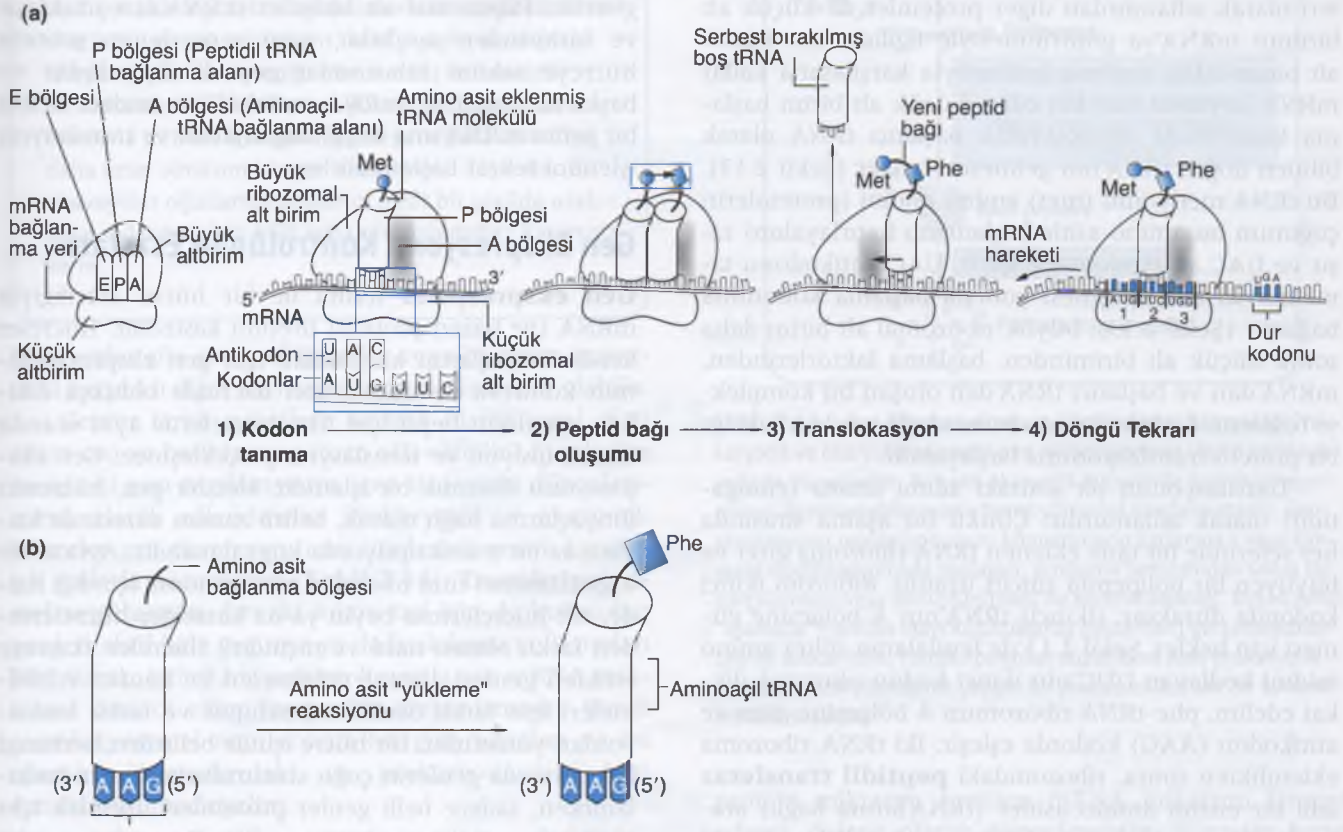
Ayrıca genetik kodun içerdiği kodonlar ribozomlara translasyonun nerede başlayıp nerede biteceğini de söyler. Başlangıç kodonu, AUG, metiyonin amino asidini kodlar ve mRNA translasyonu için başlangıç noktasını işaret eder. Sonuçta bazı proteinlerde translasyondan kısa süre sonra uzaklaştırılsa da, bu amino asit pek çok proteindeki ilk amino asittir. Dur kodonları translasyonu sonlandırır. UGA yaygın olan bir dur kodonudur, ancak UAA ve UAG dur kodonları da vardır (Tablo 2.3). Dur kodonları amino asitleri kodlamazlar; basit bir şekilde translasyonun sonunu işaret ederler.

Genetik kod evrenseldir. İnsan, bakteri, bitki, solucan, meyve sinekleri ve diğer tüm türlerin hücrelerinde kullanılırlar. Belirli türlerin kodlarında bazı ince farklılıklar vardır, ancak temelde biyolojinin tamamında aynı şekilde kullanılırlar. Bu nedenle, biyologlar rekombinant DNA teknolojisi olarak adlandırılan teknikleri kullanarak insülin geni gibi bir insan genini klonlayabilir ve bakterilere aktararak, bakteri hücrelerinin – normalde bu organizmalarda üretilmeyen – insülin trankripsiyonu ve translasyonu yapmasını sağlayabilirler. Evrensel kodun bir diğer faydalı yönü, bilim insanlarına fare gibi bir türdeki bir geni klonlamalarına ve daha sonra fare geninin dizi bilgisini insanlardaki benzer bir geni tanımlamada kullanmalarına olanak sağlamasıdır. Farklı türler ortak bir genetik kodu kullandıkları için, bu yaklaşım pek çok hastalıkla ilgili insan genlerinin tanımlanması açısından çok yaygın bir stratejidir.

Ribozomlar ve tRNA molekülleri

Ribozomlar, alt birim (subunit) adlı yapıları oluşturan protein ve rRNA kümelerinden oluşan karmaşık yapılardır. Her bir ribozom küçük ve büyük alt birim olmak üzere, iki alt birim içermektedir. Bu alt birimler tRNA moleküllerinin bağlandığı **A (aminoaçil) bölgesi** ve **P (peptidil) bölgesi** ile tRNA moleküllerinin ribozomdan ayrıldığı **E bölgesi** olarak adlandırılan iki oyuk oluşturacak şekilde birleşmişlerdir (**Şekil 2.13**).

Taşıyıcı RNA'lar 100 nükleotid uzunluğundan daha kısa küçük moleküllerdir. Taşıyıcı RNA'lar karmaşık şekillerde katlanırlar ve bir tRNA'da bulunan belli nükleotidler birbirleri ile eşleşirler. Sonuçta, bu moleküller baz eşleşmesi yapıyorken, diğer eşleşmemiş parçalar ilmikler oluşturacağı için bir tRNA'nın yonca yaprağı adlı bir yapıda olduğu düşünülür. Her



ŞEKİL 2.13 Protein Sentezi Aşamaları (a) Her bir ribozom bir büyük ve bir küçük alt birim içerir. Burada mRNA'ya bağlı bir ribozom görülmektedir. Translasyonun özetlenmiş aşamaları 1.'den 4. basamağa kadar gösterilmektedir. (b) Bu kitapta kullanılan tRNA simgesinin şematik örneği. Her tRNA'nın bir ucunda bir amino asit bağlama alanı ve karşı uçta üç nükleotidlik bir antikodon dizisi vardır.

bir tRNA'nın bir ucu bir amino asit bağlama yeridir (Şekil 2.13b). Sitoplazmadaki aminoaçil tRNA sentetaz enzimi her bir tRNA molekülüne tek bir amino asit ekleyerek **aminoaçil taşıyıcı RNA (tRNA)** veya "yüklü" tRNA olarak bilinen yapıyı oluşturur. Aminoaçil tRNA molekülleri diğer amino asitleri ribozoma taşır ve A bölgesinde ribozomların oyuklarına bağlanırlar. Her bir tRNA molekülünün karşı ucunda antikodon adlı üç nükleotidli bir dizi vardır. **Antikodon** mRNA'daki kodonları tamamlayıcı baz çiftleri olarak dizayn edilmiştir. Artık translasyonun "oyuncuları"nı – mRNA, ribozomlar ve tRNA – öğrendiğinize göre, şimdi de bu bileşenlerin bir proteini üretmek için nasıl bir araya geldiklerini inceleyelim.

Translasyonun aşamaları

Prokaryotlardaki ve ökaryotlardaki translasyon arasında bazı temel farklılıklar vardır. Burada başlama, uzama ve sonlanma olarak adlandırılan ökaryotlardaki üç ana translasyon aşamasını temel yönleriyle açıklayacağız. Translasyonun başlangıcı *başlama* (initiation) olarak adlandırılır. Başlama esnasında küçük ribozom alt birimi mRNA'nın 5′ başlığını tanıyarak mRNA molekülünün 5′ ucuna bağlanır. Ayrıca, başlama faktörleri olarak adlandırılan diğer proteinler de küçük alt birimin mRNA'ya götürülmesiyle ilgilidir. Bu küçük alt birim AUG başlama kodonuyla karşılaşana kadar mRNA boyunca hareket eder. Küçük alt birim başlama kodonunda duraksayarak başlatıcı tRNA olarak bilinen doğru tRNA'nın gelmesini bekler (Şekil 2.13). Bu tRNA metiyonin (met) amino asidini (proteinlerin çoğunun bu amino asitle başladığını hatırlayalım) taşır ve UAC antikodonunu içerir. UAC antikodonu tamamlayıcı baz eşleşmesi yoluyla başlama kodonuna bağlanır (Şekil 2.13); büyük ribozomal alt birim daha sonra küçük alt biriminden, başlama faktörlerinden, mRNA'dan ve başlatıcı tRNA'dan oluşan bu komplekse bağlanır. Bu bileşenlerin bulunduğu yerde, ribozom bir protein translasyonuna başlayabilir.

Translasyonun bir sonraki adımı *uzama* (elongation) olarak adlandırılır. Çünkü bu aşama sırasında her seferinde bir tane eklenen tRNA ribozoma girer ve büyüyen bir polipeptid zinciri uzatılır. Ribozom ikinci kodonda duraksar, (ikinci) tRNA'nın A bölgesine girmesi için bekler. Şekil 2.13'de fenilalanin (phe) amino asidini kodlayan UUC'nin ikinci kodon olmasına dikkat edelim. phe-tRNA ribozomun A bölgesine girer ve antikodon (AAG) kodonla eşleşir. İki tRNA ribozoma eklendikten sonra, ribozomdaki **peptidil transferaz** adlı bir enzim amino asitler (tRNA'larına bağlı) arasında bir peptid bağı oluşturmayı katalizler. Peptid bağları amino asitleri bir polipeptid zinciri oluşturmak için birbirleriyle birleştirir.

Amino asitler, birbirlerine bağlandıktan sonra, başlatıcı tRNA metiyonin bağlanmadan E bölgesinde kısa bir süre duraksar ve daha sonra ribozomdan ayrılır. Serbest bırakılmış "boş" tRNA'lar hücre tarafından yeniden devreye sokulur. Translasyonda yeniden kullanılabilen bir aminoaçil-tRNA oluşturmak için yeni bir amino asit bu tRNA'ya eklenir. Yeni oluşturulan polipeptid A bölgesinde tRNA'ya bağlanmış halde kalır. *Translokasyon* (yer değiştirme) adlı bir aşama sırasında ribozom yerini değiştirir, böylece tRNA ve büyüyen protein ribozomun P bölgesine hareket eder. Büyüyen bir polipeptid zincirinin bağlı olduğu bu tRNA, peptidil tRNA olarak isimlendirilir. Ribozomun A bölgesi şimdi dizideki 3. kodon (triptofanı kodlayan UGG kodonu) ile aynı hizadadır ve ribozom uygun aminoaçil tRNA'nın A bölgesine girmesini bekler. Bu döngü, daha önceki gibi, bir sonraki amino asidin (triptofan) büyüyen proteine eklenmesi şeklinde devam eder ve ribozom mRNA boyunca hareket ettikçe tekrarlanır.

Uzama döngüsü bir dur kodonuyla (örneğin UGA) karşılaşıncaya kadar yeni bir protein oluşturmaya devam eder. Bu sinyal translasyonun *sonlanma* (termination) adlı 3. basamağını işaret eder. Dur kodonlarının bir amino asidi kodlamadığını hatırlayalım. *Serbest bırakma faktörleri* adlı proteinler translasyonu sonlandırmak için dur kodonuyla etkileşime girerler. Ribozomal alt birimler mRNA'dan uzaklaşır ve birbirinden ayrılırlar, yeni sentezlenen protein hücreye salınır. Ribozomlar geri dönüşümlüdür ve başka herhangi bir mRNA molekülüne (sadece belirli bir genin mRNA'sına değil) bağlanabilir ve translasyon işlemini tekrar başlatabilirler.

Gen Ekspresyonu Kontrolünün Esasları

Gen ekspresyonu terimi ile bir hücre aracılığıyla mRNA (ve bazen protein) üretimi kastedilir. Hücreler kendi ihtiyaçlarını karşılamak için gen ekspresyonunun kontrolü ve translasyon üzerinde oldukça etkilidir. Genlerin hepsi için tüm hücrelerde aynı oranda transkripsiyon ve translasyon gerçekleşmez. Gen ekspresyonu dinamik bir işlemdir. Her bir gen, hücrenin ihtiyaçlarına bağlı olarak, belirli zaman sürecinde kısmen az bir transkripsiyonla kopyalanabilir. Ayrıca, bir organizmanın tüm hücreleri aynı genomu içerdiği halde, cilt hücrelerinin beyin ya da karaciğer hücrelerinden farklı olması nasıl ve niçindir? Hücreler eksprese ettikleri genleri düzenleyebilmeleri ve kontrol edebilmeleri için farklı özelliklere sahiptir ve farklı fonksiyonları yürütürler. Bir hücre içinde belirtilen herhangi bir zamanda genlerin çoğu susturulurken veya baskılanırken, sadece belli genler proteinleri üretmek için aktif hale getirilir ve eksprese edilir. Bu genler, gerekli proteinleri yapmak için hücre içindeki veya dışındaki özgün başlama işaretlerine yanıt olarak, sadece belirli zamanlarda hücre aracılığıyla ifade edilirler. Bu işaretler sıcaklık değişimleri, dış çevredeki besin maddeleri,

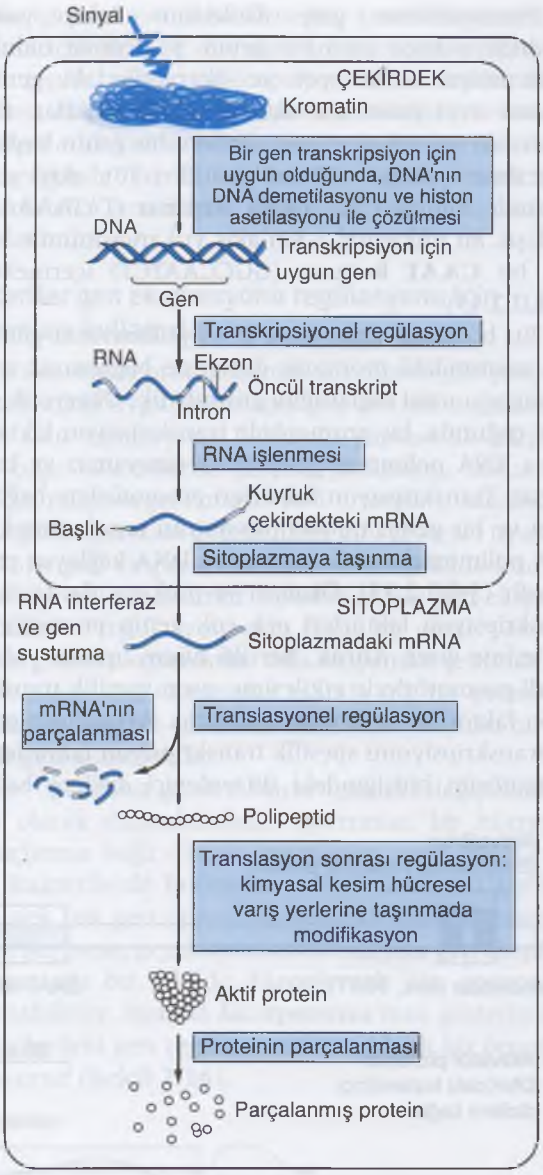
KARARI SİZ VERİN

Biyoteknolojik Ürünlere Herkes Ulaşabilmeli midir?

Genlerin nasıl tanımlanabildiğini, klonlanabildiğini ve incelenebildiğini daha sonra ayrıntılı bir şekilde öğreneceğiz (Bölüm 3). Gen klonlamasının yararlarından biri insan hastalıklarıyla ilgili genlerin belirlenmesidir. Sonuçta pek çok gen ürününü laboratuvarda yapmak ve tıbbi amaçlar için kullanmak mümkündür. Örneğin, insülin geni bakteride klonlandığında, diyabetli insanları tedavi etmek için büyük miktarda insülin üretimi mümkün oldu. Benzer şekilde çocukluk çağındaki kemik ve kas gelişimini teşvik eden insan büyüme hormonları (hGH) için genlerin klonlanması, bu hormonların kolayca bulunabileceği bir kaynak sağladı. Yasal olarak sadece reçeteyle temin edilebilen hGH, çocuklardaki kısa boyluluk ve cüceliğin belirli formlarını tedavi etmek için yaygın ve etkin bir şekilde kullanılmaktadır. hGH'nin profesyonel sporcular tarafından yasadışı kullanımına son yıllarda çok rastlanılmaktadır. Cücelik, bir yetişkinin boyunun yaklaşık 120 cm ya da daha kısa olmasıyla belirlenen bir durum olarak tanımlanır. hGH ve diğer bazı biyoteknoloji ürünlerinin ortaya sürülmesi etik bir sorunu artırmıştır. hGH'yi daha uzun çocuk isteyen ya da cüce çocuğu olan herkes kullanabilir mi? Orta boydaki oğullarının yüksekokul basketbol takımına girmesi için daha iyi bir şans yakalasın diye daha uzun olmasını isteyen ebeveynleri düşünün. Bu ebeveynler oğullarına boylarını basit bir şekilde uzatmayı sağlaması için hGH kullandırmalı mıdır? Kararı siz verin.

hormonlar gibi çevresel işaretler veya hücreler arasındaki karşılıklı diğer karmaşık kimyasal işaretler olabilir.

Genler farklı işaretlere karşılık olarak nasıl aktif (turn on) ve baskılanmış (turn off) olabilir? Biyologlar bu işlemi **gen regülasyonu** (gen ifadesinin düzenlenmesi) olarak adlandırırlar. Prokaryotik ve ökaryotik hücreler gen ekspresyonunu (ifadesini) çeşitli karmaşık yollarla düzenlerler (**Şekil 2.14**). **Transkripsiyonel regülasyon**, her iki hücre tipi için de kullanılan genleri aktif hale geçirme ya da baskılama yollarından biri olarak, belirli bir genden kopyalanan mRNA miktarını kontrol eden yaygın bir mekanizmadır. Şimdi transkripsiyonel regülasyona bir giriş yapalım ve bu işlemin ökaryotlardaki ve prokaryotlardaki bazı örneklerini inceleyelim.



ŞEKİL 2.14 Gen Ekspresyonunun Regülasyonu Aşamaları Prokaryotik ve ökaryotik hücreler gen ekspresyonunu çeşitli karmaşık yollarla düzenlerler. Bu şekil ökaryotik hücrelerde gen ekspresyonunun düzenlenebilmesinin temel yönlerini özetlemektedir. Gen ekspresyonu regülasyonunun; kromatinlerin katlanması veya kimyasal modifikasyonuyla başlayan, proteinin sentezinden sonra ise parçalanması veya dönüştürülmesi ile kontrol edildiği, birçok farklı "aşamada" (şekilde mavi kutucuklarda gösterilen) gerçekleşebileceğine dikkat edin. Transkripsiyonel düzenleme hem prokaryotik hem ökaryotik hücrelerde yaygın bir şekilde kullanılan bir kontrol mekanizmasıdır.

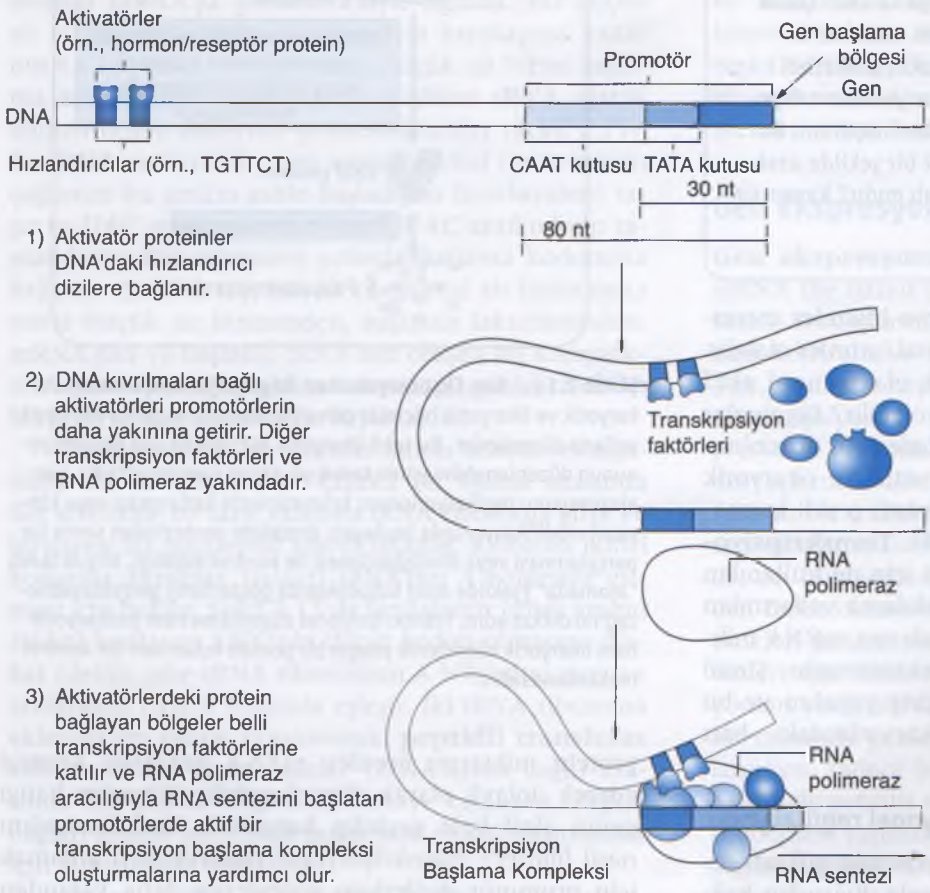
Gen ekspresyonunun transkripsiyonel regülasyonu

Bir hücre tarafından oluşturulan proteinin miktarı genelde bu hücredeki mRNA miktarıyla doğrudan bağlantılı olduğundan, hücreler belirli bir genin ürettiği protein miktarını üretilen mRNA miktarını kontrol ederek dolaylı olarak düzenleyebilir. Hücreler hangi genin aktif hale geçirilip hangisinin baskılanacağını nasıl bilirler? Transkripsiyonel düzenlemeyi anlamak için promotör dizilerinin görevlerini daha yakından incelemeliyiz.

Promotörlerin gen dizilerinin "akış yukarı" yönünde olduğu yani bir genin 5′ ucunda oldukları belirlenmiştir. Prokaryot ve ökaryotlardaki genlerin tamamı aynı promotör dizilerini kullanmazlar. Ökaryotlardaki yaygın promotör dizileri, bir genin başlangıç bölgesinin yaklaşık 30 nükleotid (-30) akış yukarı yönünde bulunan bir **TATA kutusu** (TATAAAA) ve yaklaşık 80 nükleotid (-80) akış yukarı yönünde bulunan bir **CAAT kutusu** (GGCCAATCT) içermektedir (**Şekil 2.15**).

Bu bölümde daha önce RNA polimerazın genlerin çok yakınındaki promotör dizilerine bağlanarak transkripsiyonu nasıl başlattığını görmüştük. Ökaryotik genlerin çoğunda, bir promotörde transkripsiyon faktörleri yoksa RNA polimeraz promotörü tanıyamaz ve bağlanamaz. Transkripsiyon faktörleri promotörlere bağlanabilen ve bir genin transkripsiyonunu teşvik etmek için RNA polimerazla etkileşime giren DNA bağlayıcı proteinlerdir (Şekil 2.15). Ökaryot ve prokaryotlarda yaygın transkripsiyon faktörleri pek çok genin promotörüyle etkileşime girer. Ancak, her iki hücre tipinde yalnızca belirli promotörlerle etkileşime giren spesifik transkripsiyon faktörleri de kullanılmaktadır. Ayrıca bazı genlerin transkripsiyonu spesifik transkripsiyon faktörlerinin promotörün bitişiğindeki düzenleyici dizilere bağlanmasına da bağlıdır. Dahası, pek çok gen **hızlandırıcı** adlı düzenleyici dizileri de içeren hücreler tarafından sıkı bir şekilde regüle edilmektedir.

Hızlandırıcı diziler genellikle promotörün akış yukarı yaklaşık 50 ya da daha fazla baz çifti uzağında yer alırlar, fakat bazen bir genin akış aşağı bölümünde de bulunabilirler. Regülatör proteinlere bağlanan hızlandırıcı diziler genellikle *aktivatör* olarak tanımlanırlar. Aktivatör molekülleri, bir genin transkripsiyonunu teşvik eden (aktive eden) bir kompleks oluşturmak için transkripsiyon faktörleri ve RNA polimerazla etkileşime girerler. Hücreler çok çeşitli, farklı aktivatör molekülleri kullanırlar. Her bir aktivatör belirli bir hızlandırıcı diziye bağlanır. Bazı aktivatör molekülleri hormonlar olabilir. Örneğin, erkek eşey testesteron steroidi gen ekspesyonunu teşvik eden bir aktivatör olabilir. Testesteronun gelişme çağındaki erkek çocuklarda kas ve tüy gelişimi gibi hücresel aktiviteleri teşvik ettiğini biliyorsunuz. Peki testesteron nasıl çalışıyor? Bu hormon hücrelerin içindeki bir reseptör proteinine bağlanır. Testesteron-reseptör protein kompleksi, *androjen yanıt (androjen-response) elementi* (5′-TGTTCT-3′) adlı, DNA'da bulunan özel bir hızlandırıcı elemente bağlanmak için bir aktivatör gibi hareket eder. Bu elementler genellikle promotörün yakınında bulunur. Zamanı geldiğinde, testesteron



ŞEKİL 2.15 Promotörler, Transkripsiyon Faktörleri ve Hızlandırıcılar

ve reseptörü gen ekspresyonunu teşvik eder. Dişi eşey östrojen steroidi de benzer bir şekilde çalışır.

Fakat testesteron ve diğer aktivatörler tüm hücrelerdeki genlerin tamamının ekspresyonunu teşvik etmezler. Aktivatörler yalnızca onları bağlayabilen hızlandırıcı dizilerini içeren genlerde hareket ederler. Testesteronlar kas ve saç büyümesi ile ilgili genlerin ekspresyonunu teşvik ederler. Çünkü bu genler androjen yanıt elementlerini içerirler. Androjen yanıt elementleri olmayan diğer genlerin transkripsiyonu doğrudan hormonlar tarafından etkilenmez. Bu arada, steroidin vücut yapanlar ve sporcular tarafından kas kütlesini ve gücünü artırmak için amaç dışı kullanımı, steroidlerin uzun üreli kullanımlarda gen ekspresyonunu anormal bir şekilde teşvik etmesinden dolayı, uzun vadeli ciddi sağlık sorunlarına neden olmaktadır.

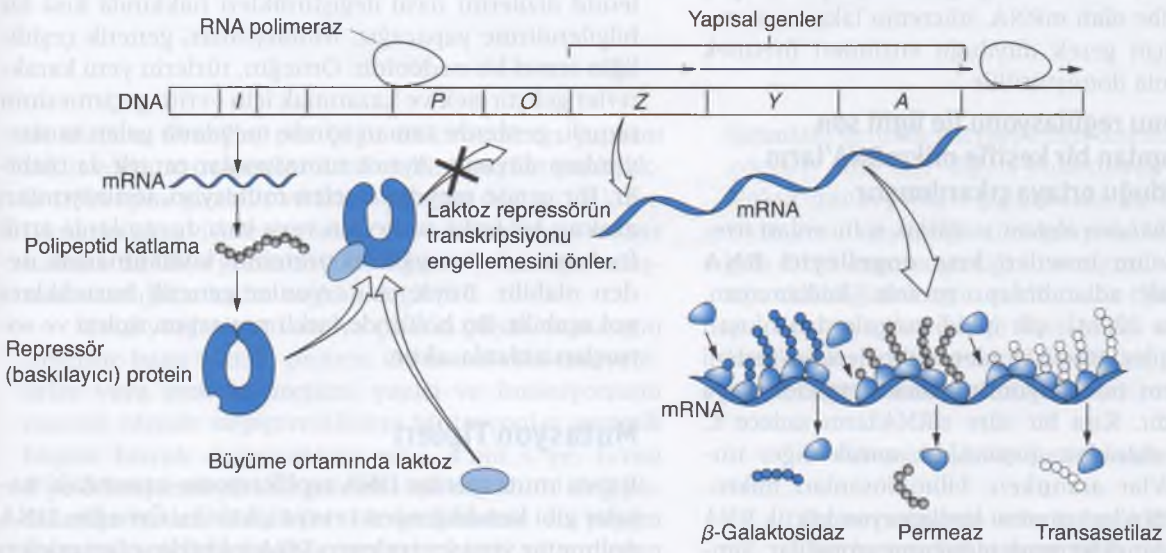
Hücreler aktivatörler ve hızlandırıcılar aracılığıyla ekspresyonun düzenlenmesi ve hücresel aktivitelerin kontrol edilmesi için transkripsiyonel kontrolü kullanabilir. Bazı genler transkripsiyonu azaltan belli baskılayıcı diziler içerirler. Farklı hücreler farklı transkripsiyon faktörleri ve aktivatör moleküller ürettiği için, genler bazı dokularda çalışır, diğerlerinde çalışmaz. Cilt hücreleri kas hücrelerini yapandan farklı genlerle çalışır, böylece her bir hücre tipi, her bir hücre tipine farklı fonksiyonlar veren farklı proteinleri üretir. Sonuç olarak, tüm vücut hücreleri aynı genoma sahip olsalar bile, doku ve hücre spesifik gen ekspresyonu hücrelerin ifade ettikleri proteinleri kontrol etmelerinin bir yoludur. Bu önemli kontrol mekanizmaları farklı hücrelerin farklı fonksiyonlara sahip olma nedenlerinin parçasıdır.

Ayrıca, bir genin düzenleyici bölgelerine bağlanan promotörler, hızlandırıcı diziler ve transkripsiyon faktörlerinin tespit edilmesi, biyoteknoloji ürünlerinin yapımı için de önemlidir. Örneğin, kemik büyümesi ve gelişimi için ihtiyaç duyulan proteinlerin ekspresyonunu teşvik eden transkripsiyon faktörlerinin tespit edilmesi, eklem iltihabı türlerinden muzdarip insanlara, hücreleri artık kemik büyümesini teşvik eden faktörleri üretmediğinde kemik büyümesini teşvik etmek için kullanılabilen yeni ilaçları geliştirmede de bilim insanlarına yardımcı olur.

Bakteriler gen ekspresyonu regülasyonu için operonları kullanırlar

Bakteriler, insan proteinlerinin üretilmesi gibi pek çok biyoteknoloji uygulaması için çok önemli organizmalardır. Gen regülasyonu hakkında yapılan ilk çalışmaların çoğu bakterilerde gerçekleştirilmiştir. Bakteriler ve diğer mikroorganizmalar besi ortamları, sıcaklık ve ışık yoğunluğundaki değişiklikler gibi çevresel uyaranlara karşı gen ekspresyonunu hızlı bir şekilde kontrol edebilirler ve etmelidirler. Bakterilerdeki gen ekspresyonunun ve regülasyonunun ilginç bir yönü, pek çok bakteri geninin **operonlar** adlı oluşumlar şeklinde organize olmasıdır. Operonlar aslında tek bir promotör tarafından kontrol edilen ve bir arada bulunan birkaç ilişkili gen kümeleridir.

Bir operonun genleri hücre içindeki değişikliklere yanıt olarak düzenlenebilir. Operonlar, bir hücrenin ihtiyaçlarına bağlı olarak uyarılabilir veya engellenebilir. Bakterilerde beslenme metabolizmasını kontrol eden pek çok gen operonlar şeklinde düzenlenmiştir. Bakteriler besin gereksinimlerine karşılık gen ekspresyonunu sıkı bir şekilde düzenlemek için operonları kullanabilirler. Burada ***lac* operonu**'nun gösterimiyle bakterilerdeki gen regülasyonunun klasik bir örneğini sunuyoruz (**Şekil 2.16**).



ŞEKİL 2.16 ***lac* Operonu** *lac* operonunu kontrol ederek, bakteri hücreleri laktoz şekerinin varlığına yanıt olarak gen ekspresyonunu regüle edebilirler. Laktoz bulunmadığında, *lac* repressörünün operatöre bağlanması transkripsiyonu engeller. Laktozun varlığında, laktoz repressöre bağlanarak onu etkisizleştirir, böylece operonun transkripsiyonuna imkân sağlar.

lac operonu aşağıda verilen üç genden oluşur:

- β-*galaktosidaz* enzimini kodlayan *lacZ*
- *Permeaz* enzimini kodlayan *lacY*
- *Asetilaz* enzimini kodlayan *lacA*

Bu üç enzim birlikte laktozun bakteri hücreleri tarafından taşınması ve parçalanması için de gereklidir. Sütte bulunan bir şeker olan laktoz, pek çok bakteri için önemli bir enerji kaynağıdır. Laktozun bakteri metabolizmasında kullanımı için, şeker permeaz aracılığıyla hücrelere taşınır, daha sonra β-galaktosidaz tarafından glukoz ve galaktoza indirgenir. Asetilazın fonksiyonu belli değildir, ancak hücreleri laktozun toksik indirgeme ürünlerinden korumada bir rol oynayabilir. *lac* operonu *lacI* geni adlı ayrı bir gen tarafından kodlanan ***lac* represörü** (baskılayıcısı) adlı bir protein tarafından regüle edilir. Bakteriler laktozun bulunmadığı bir ortamda büyütülürse, represör protein **operatör** (o) adlı *lac* operonu promotörü (p) içindeki bir diziye bağlanmak için sarmal-dönüş-sarmal motifini kullanır. Represör, operatöre bağlanarak RNA polimerazın promotöre bağlanmasını ve operondaki *Z*, *Y* ve *A* genlerinin traskripsiyonunu engeller (Şekil 2.16). Bu bakterilerin kendi metabolizmalarını kontrol edebilmeleri için güzel bir yoldur. Enerji üretimi için laktoz yoksa niçin genlerin transkripsiyonu ve proteinlerin translasyonu için enerji boşa harcansın?

Tam tersine laktoz bulunduğunda, şekerler *lac* operonu transkripsiyonunu teşvik eden uyarıcı moleküller gibi hareket ederler. Laktoz, *lac* represörüne bağlanır, represör proteinin şeklini değiştirir ve operatöre bağlanmasını engeller (Şekil 2.16). RNA polimeraz, yolu üzerinde bir represör olmadığından, *lac* promotörüne bağlanır ve operonun transkripsiyonunu başlatır. Operondan transkribe olan mRNA, hücrenin laktozu metabolize etmesi için gerek duyduğu enzimleri üretmek için, translasyonla dönüştürülür.

Gen ekspresyonu regülasyonu ile ilgili son zamanlarda yapılan bir keşifle mikroRNA'ların genleri susturduğu ortaya çıkarılmıştır

1998'de *Caenorhabditis elegans* yuvarlak solucanları üzerinde çalışan bilim insanları **kısa engelleyici RNA (siRNA)** olarak adlandırılan, protein kodlamayan, küçük (21 veya 22 nt), çift iplikli parçalardan oluşan RNA'ları keşfettiler. Böyle isimlendirilmelerinin nedeni bağlı mRNA'ların translasyonunu bloke etmeleri veya engel olmalarıdır. Kısa bir süre siRNA'ların sadece *C. elegans*'a özgü oldukları düşünüldü, ancak diğer türlerde de siRNA'lar aranırken, bilim insanları mikroRNA'ların (miRNA'lar) protein kodlamayan küçük RNA moleküllerinin bir diğer sınıfı olduğunu saptadılar. Şimdiye kadar incelenen tüm çok hücreli organizmalarda miRNA genleri tespit edildi.

Tıpkı siRNA'lar gibi, miRNA'lar da, mRNA bozulmasına neden olarak veya mRNA translasyonunu engelleyerek gen ekspresyonunu susturma yoluyla, gen ekspresyonunu regüle eden düzenleyici moleküllerdir. MikroRNA genleri, enzimler (Drosha ve Dicer) aracılığıyla kesilip 21-22 nükleotid uzunlukta kısa tek iplikli parçacıklara işlenen RNA transkriptleri üretirler (**Şekil 2.17**). İşlenmiş miRNA'lar daha sonra, kendilerinin miRNA dizisine komplementer olan mRNA'lara bağlanmasını sağlayan bir protein kompleksine (RISCs adlı) bağlanırlar. miRNA'ların bir mRNA dizisine bağlanması ya ribozomlardaki translasyonu engeller, ya da mRNA'nın enzimatik bozulmasına neden olur. Her iki durumda da mRNA'nın proteine dönüştürülmesi engellenerek ekpresyon önlenmiş veya susturulmuş olur.

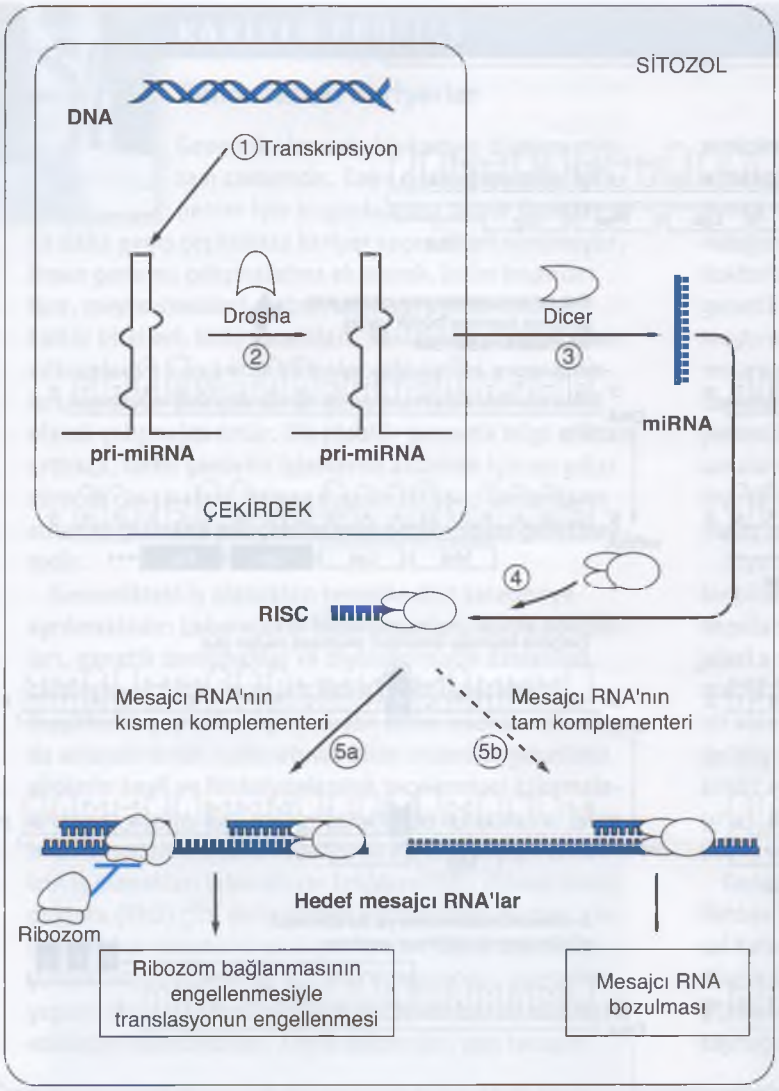
RNA'ya dayalı gen susturma mekanizmaları genellikle **RNA interferans (RNAi)** olarak anılır. miRNA aracılığıyla susturulmuş insan genlerinin tanımlanması günümüzde çok aktif bir araştırma alanıdır. Bilim insanları RNAi'lerin kullanımından, küçük RNA molekülleri aracılığıyla insan hastalıklarıyla ilgili genleri seçici bir şekilde durdurmak veya susturmak için ümit verici bir potansiyele sahip olduğundan, yararlanmaya çalışıyorlar (Bölüm 3 ve 11'de bahsedildi). RNAi'nin bir araştırma tekniği olarak ne kadar değerli olduğunun kanıtı olarak, 2006 yılı Fizyoloji veya Tıptaki Nobel Ödülü gen susturma ile ilgili bu metodun keşfi nedeniyle Stanford Üniversitesi'nden Andrew Fire'ye ve Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesinden Craig Mello'ya verildi.

2.5 Mutasyonlar: Sebepleri ve Sonuçları

Mutasyonların genleri nasıl etkilediği veya DNA nükleotid dizilerini nasıl değiştirdikleri hakkında kısa bir bilgilendirme yapacağız. Mutasyonlar, genetik çeşitliliğin temel bir nedenidir. Örneğin, türlerin yeni karakterler geliştirmek ve kazanmak için evrim geçirmesinin temeli, genlerde zaman içinde meydana gelen mutasyonlara dayanır. Ayrıca mutasyonlar zararlı da olabilir. Bir gende meydana gelen mutasyon, fonksiyonları azalmış bir farklı proteinin veya bazı durumlarda artık fonksiyonel olmayan bir proteinin kodlanmasına neden olabilir. Böyle mutasyonlar genetik hastalıklara yol açabilir. Bu bölümde farklı mutasyon tipleri ve sonuçları anlatılacaktır.

Mutasyon Tipleri

Bazen mutasyonlar DNA replikasyonu sırasındaki hatalar gibi kendiliğinden ortaya çıkabilir. Örneğin, DNA polimeraz yeni sentezlenen DNA iplikçiğine farz edelim C olması gerekirken T gibi yanlış bir nükleotid ekleyebilir. Hücredeki enzimler hataları tespit etmeye ve düzeltmeye çalışsalar bile, DNA replikasyonunda zaman zaman hatalar olur. Mutasyonlar çevresel nedenlerle



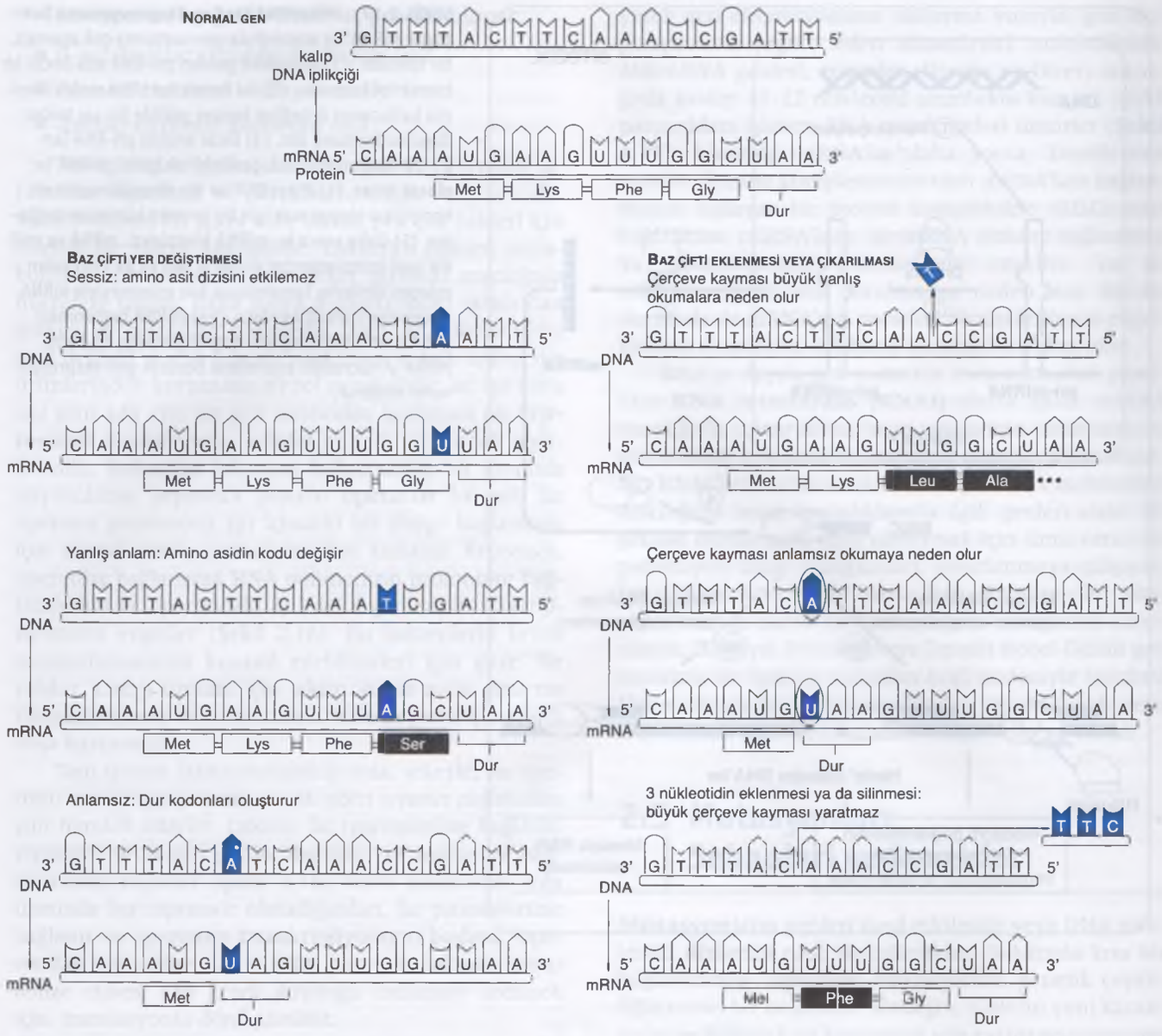
ŞEKİL 2.17 MikroRNA'lar Gen Ekspresyonunu Susturur miRNA'lar aracılığıyla gen susturma çok aşamalı bir işlemdir. (1) MikroRNA genleri pri-RNA adlı öncül bir transkript kopyalar, (2) bu transkript tRNA moleküllerinin katlanması örneğine benzer şekilde bir saç tokası düğümü formunu alır. (3) Dicer enzimi pri-RNA'ları 21-22 nükleotid uzunluğundaki tek iplikli miRNA'lar olarak keser. (4) MikroRNA'lar bir ribonükleoprotein kompleksi oluşturmak için bir protein kümesine bağlanır. (5) Daha sonra bu miRNA kompleksi, mRNA ve miRNA'daki komplementer dizilerle tam ya da (5b) yakın eşleşen dizilerle, tamamlayıcı baz eşleşmesiyle mRNA moleküllerine bağlanabilir. (5a) miRNA bağlanması daha sonra, translasyonu engelleyerek ya da bağlı mRNA'yı hücredeki enzimlerle bozarak gen ekspresyonunu susturur.

de olabilir. Örneğin, pek çoğu nükleotidlerin yapısını taklit eden, **mutajenler** denilen kimyasallar yanlışlıkla DNA içine girebilir ve DNA yapısını değiştirebilirler. Güneşin ultraviyole ışınlarına veya x-ışınlarına maruz kalmak da DNA'yı mutasyona uğratır (yazın bronzlaşmak sandığınız kadar sağlıklı değildir).

Mutasyonlar nasıl ortaya çıkarsa çıksın, mutasyon tiplerine bağlı olarak, protein üretimini etkilemeyebilirler veya protein üretimi, yapısı ve fonksiyonunu önemli ölçüde değiştirebilirler. Mutasyonlar genetik bilgide büyük değişikliklere veya A'nın C'ye, G'nin T'ye dönüşümü gibi bir gendeki tek nükleotid değişikliklerine neden olabilirler. Bir genomdaki en yaygın mutasyon **nokta mutasyonları** olarak adlandırılan tek nükleotid değişiklikleridir (veya birkaç nükleotid mutasyonları). Böyle mutasyonlar genel olarak **tek nükleotid polimorfizmleri** (**SNPs** – "snip"ler olarak söylenir) olarak adlandırılır ve farklı insan genomlarındaki genetik varyasyonun önemli bir tipini temsil ederler. SNP'leri diğer bölümlerde de tartışacağız. Nokta mutasyonları çoğunlukla bir baz çiftinin diğeriyle yer değiştirdiği sübstitüsyon; bir nükleotidin bir gen dizisi arasına girdiği insersiyon; veya bir baz çiftinin eksildiği delesyon şeklindedir (**Şekil 2.18**).

Mutasyonlar, hücre üzerindeki etkilerini, sonuçta karakterleri etkileyecek biçimde, bir proteinin özelliklerini değiştirerek gösterirler.

Gen mutasyonları şunlara neden olabilir:
↓
Protein yapısında ve fonksiyonunda değişiklikler; fonksiyonel olmayan bir proteinin sentezi veya hiçbir proteinin sentezlenmemesinin yol açabileceği:
↓
Bir karakterin değişmesi veya kaybı



ŞEKİL 2.18 **Mutasyon Tipleri** Mutasyonlar mRNA'nın genetik kodunu ve bir genin translasyonuyla ortaya çıkan proteinleri etkileyebilir. Burada bir genden kopyalanan bir mRNA parçası gösterilmiştir, ancak mutasyonlar genellikle DNA'da meydana gelir. Bir gendeki mutasyonlar translasyonu yapılan proteinler üzerinde farklı etkilere sahip olabilir.

Proteinler büyük karmaşık moleküllerdir. Çoğu proteinin doğru bir şekilde çalışabilmesi için üç-boyutlu karmaşık bir şekilde katlanması gerekir. Bir proteindeki bir ya da iki amino asidin değişimi, proteinin fonksiyonunu önemli ölçüde bozarak ya da bazı durumlarda çalışmasını tamamen önleyerek, proteinin tüm şeklini değiştirebilir. Mutasyon, bir genin kodon dizisini aynı amino asidi kodlayan başka bir kodonla değiştirirse protein üzerinde etkili olmaz (Şekil 2.18). Bu mutasyon tipi, proteinin yapısını ve fonksiyonunu etkilemediği için **sessiz mutasyon**dur. Benzer şekilde, bir mutasyon bir kodonu farklı bir amino asidi kodlayacak şekilde değiştirebilir. Eğer kodlanan yeni amino asit proteinin yapısını ve fonksiyonunu değiştirmezse böyle **yanlış anlamlı mutasyonlar** da "sessiz" olarak kabul edilir. Ancak, yeni kodlanan amino asit proteinin yapısını değiştirirse fonksiyonu da önemli ölçüde değişebilir. Daha sonra,



KARİYER PROFİLİ

Genomikteki Kariyerler

Genomik alanında bir kariyer düşünmenin tam zamanıdır. Daha önce, genomla ilgilenenler için bugünkünden büyük fırsatlar ya da daha geniş çeşitlilikte kariyer seçenekleri olmamıştır. İnsan genomu çalışmalarına ek olarak, bilim insanları fare, meyve sinekleri, zebra, tarımsal açıdan önemli kültür bitkileri, bitki zararlıları, hastalıklara neden olan mikroplar ve sucul organizmalar gibi model organizmaları kapsayan pek çok türün genomlarıyla ilgili de aktif olarak çalışmaktadırlar. Ulaşılabilir genomik bilgi miktarı arttıkça, farklı genlerin işlevlerini anlamak için on yıllar sürecek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Genomların sırlarını çözmede pek çok insanın ortak çabası gerekmektedir.

Genomikteki iş olanakları temelde dört kategoriye ayrılmaktadır: Laboratuvar bilim insanları, klinik doktorları, genetik danışmanlar ve biyoinformatik uzmanları. Laboratuvar bilim insanları deneylerini laboratuvar tezgâhında yaptıkları için, tezgâh bilim insanları olarak da adlandırılırlar. Laboratuvar bilim insanları genellikle genlerin keşfi ve fonksiyonlarının incelenmesi çalışmalarında yer alırlar. Başlangıç düzeyindeki laboratuvar bilim insanlarından önlisans veya lisans eğitimi almış olanlar için iş olanakları laboratuvar teknisyenliği; yüksek lisans, doktora (PhD) gibi daha yüksek eğitim almış olanlar için laboratuvar yöneticisi pozisyonlarıdır. Klinik doktorları yüksek lisans düzeyinde eğitimli doktorlardır, araştırma yaparlar ve araştırma gruplarının üyeleri olarak hastalarla etkileşim halindedirler. Klinik doktorları, gen terapisi protokolleri gibi yeni genetik tabanlı tedavilerle hastalarını tedavi etmek için araştırma çalışmaları da yürütürler. Ayrıca, genomik, tıp alanında çok büyük etkilere sahip olduğundan ve bunu gelecekte de sürdüreceğinden, tıp doktorları bu alan için önemlidir. İnsan hastalıklarının genetik tabanlı yeni tedavilerini ortaya çıkaran genetik araştırmaları laboratuvar tezgahından başucumuza getiren *translasyonel tıp* alanına gittikçe artan bir ilgi vardır. Genetik danışmanlar, insanların, genlerinin hastalıklara yatkınlıklarına nasıl etki ettiği gibi genomik bilgileri anlamalarına yardımcı olur. Danışman pozisyonları fizyoloji, biyoloji ve genetik hakkında çalışmaları içeren yüksek lisans derecelerini gerektirir.

Biyoinformatik biyoloji ile bilgisayar bilimini birleştiren bir bilim dalıdır. Biyoinformatik gen ve protein verilerini depolama, analiz etme ve paylaşmayı kapsar. Genom projeleri aracılığıyla elde edilen DNA dizi bilgileri, biyoinformatiği çok hızlı gelişen ve genomik için kesinlikle gerekli bir alan yapmıştır. Biyoinformatikçiler hem biyoloji hem de bilgisayar bilimi eğitimi almışlardır ve genom verilerini analiz etmek için tezgâh bilim insanlarıyla birlikte çalışırlar. Biyoinformatikteki pek çok pozisyon lisans, yüksek lisans ve doktora derecesi gerektirir.

Genetikte öne çıkan kariyer seçeneklerini incelemek için, Rehber İnternet Sitesinde yer alan Keeping Current (Güncel Kalın) web bağlantısına girerek İnsan Genom Programı Bilgileri (Human Genome Program Information) sayfasını gözden geçirin; bu adreste ayrıca, diğer birçok değerli kaynağa ulaşacağınız bağlantılar da bulunmaktadır.

bir SNP'in orak hücre hastalığı adlı insan genetik hastalığına nasıl neden olduğu ile ilgili önemli bir örnek anlatılacaktır.

Anlamsız mutasyonlar olarak adlandırılan mutasyonlar bazen bir amino asidin bir kodonunu dur kodonuna dönüştürürler. Bu olay, translasyondan sonra genellikle fonksiyonel olmayan bir protein üreten, anormal şekilde kısalmış proteinlerin oluşmasına neden olur. Ayrıca, insersiyonlar ve delesyonlar da **çerçeve kayması mutasyonuna** neden olarak, bir genden üretilen proteini önemli ölçüde etkileyebilirler. Şekil 2.18'de gösterildiği gibi, bir nükleotidin insersiyonu, kodonların okuma çerçevesinin insersiyonun sağına doğru kaymasına neden olarak, mRNA tarafından kodlanan proteini değiştirmektedir. Çerçeve kaymaları çoğunlukla fonksiyonel olmayan proteinler oluşturur.

Mutasyonlar Kalıtsal veya Edinsel Olabilir

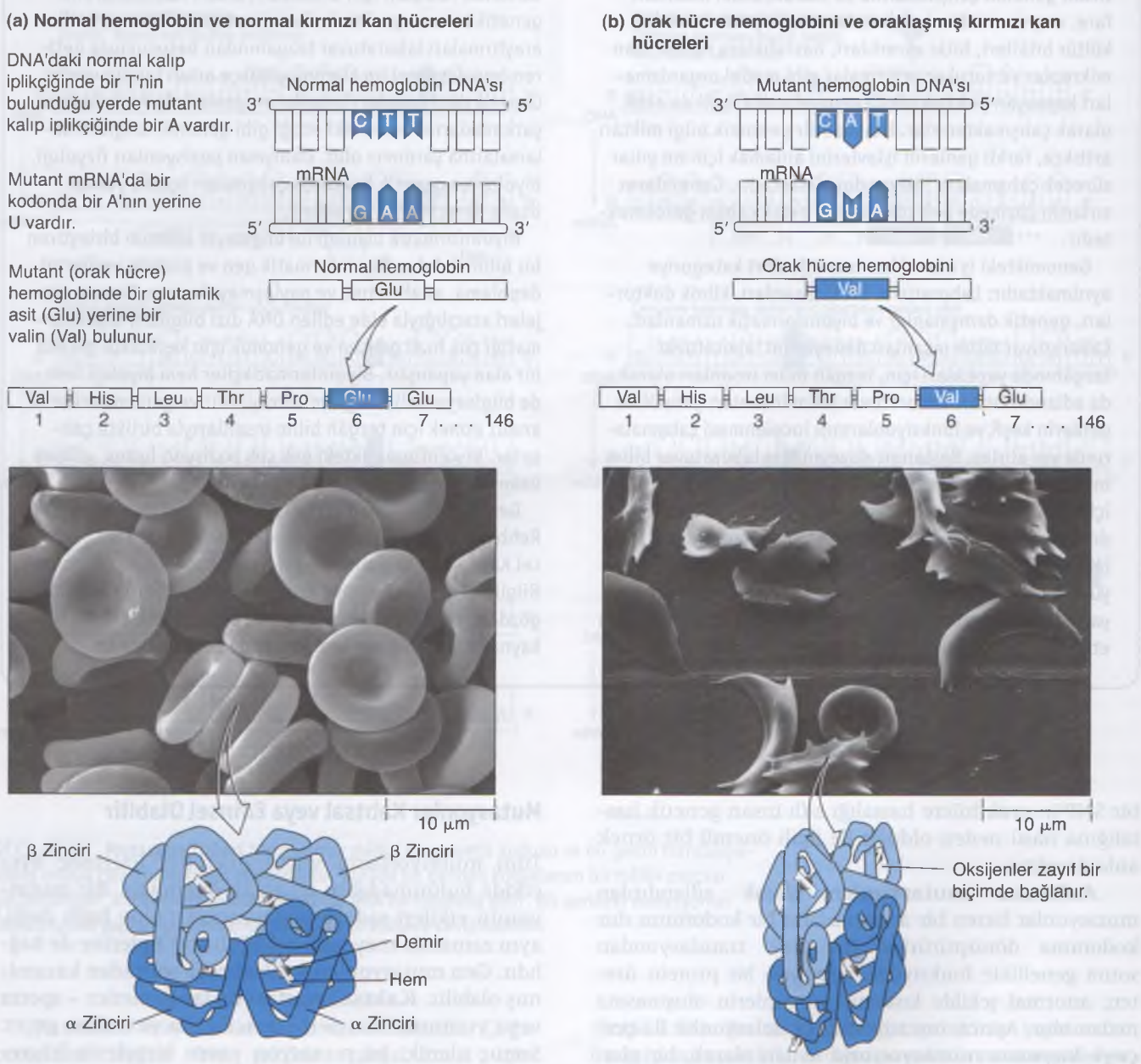
Tüm mutasyonların vücut hücreleri üzerinde aynı etkide bulunmadığını anlamak önemlidir. Bir mutasyonun etkileri sadece mutasyonun tipine bağlı değil, aynı zamanda meydana geldiği hücre tiplerine de bağlıdır. Gen mutasyonları kalıtsal veya sonradan kazanılmış olabilir. **Kalıtsal mutasyonlar** gametler – sperm veya yumurta hücreleri – aracılığıyla yavrulara geçer. Sonuç olarak, bu mutasyon yavru bireylerin hücrelerinin tamamının genomunda mevcuttur. Kalıtsal mutasyonlar doğum kusurlarına veya kalıtsal genetik hastalıklara neden olabilir.

Edinsel mutasyonlar vücut hücrelerinin genomunda meydana gelir ve yavrulara geçmez. Kalıtsal olmasalar da, edinsel mutasyonlar kanser tümörlerinin oluşumuna, metabolik bozukluklar ve diğer

durumlara yol açan hücre büyümesi anormalliklerine sebep olabilmektedirler. Örneğin, ultraviyole ışına uzun süreli maruz kalma, cilt kanserine yol açan cilt hücreleri edinsel mutasyonlarına neden olabilir. Kanserin ve diğer pek çok insan hastalığının genetik temelini anlama çabası, biyoteknolojinin araştırma alanlarının başında gelmektedir.

Mutasyonlar genomlardaki varyasyonun kaynağıdır ve insan genetik hastalıklarının nedenlerinden biridir

Mutasyonlar, pek çok insan genetik hastalığının moleküler kaynağını oluşturmaktadır. Orak hücre hastalığı, belirli bir mutasyonun neden olduğu keşfedilen ilk genetik hastalıktır (**Şekil 2.19**). Orak hücre hastalığı kırmızı kan hücrelerine oksijen bağlayan protein olan



ŞEKİL 2.19 Orak Hücre Hastalığının Moleküler Temeli (a) Kırmızı kan hücrelerine oksijen bağlayan hemoglobin proteini dört polipeptit zincirinden oluşur. Şekilde, toplam 146 amino asit içeren hemoglobin polipetidlerinden birindeki normal hemoglobin geninin bir kısmı, mRNA kopyası ve ilk yedi amino asit gösterilmektedir. (b) Orak hücre hastalığına neden olan hatalı gen dizisinde tek bir baz çifti değişimi vardır ve bu hemoglobin proteininin translasyonunu değiştirir. Bu ince değişim, kırmızı kan hücrelerinin şeklinin orak biçimini almasına neden olur.

hemoglobin proteinindeki polipeptitlerden birini kodlayan gendeki tek bir nükleotidin değişimi ile, bir baz çifti sübstitüsyonuyla, meydana gelir. Kırmızı kan hücreleri, her biri dört polipeptit zincirinden oluşan, milyonlarca hemoglobin molekülü içermektedir (Şekil 2.19). β-globin genindeki bir nokta mutasyonu genetik kodu değiştirir, böylece gen hemoglobin polipeptitlerinden birindeki pozisyon 6 için farklı bir amino asit kodlar. Bunun sonucunda, orak hücre hemoglobininde glutamik asidin yerinde valin amino asidi bulunur. Hemoglobin geninin hatalı iki kopyasını taşıyan bireyler orak hücre hastalığının etkilerine maruz kalırlar. Bu hafif mutasyon hemoglobinin oksijen taşıma yeteneğini değiştirir ve kırmızı kan hücrelerinin şeklini anormal olarak orak biçimine dönüştürür. Oraklaşmış hücreler kan damarlarını tıkar, hastaların dokularına oksijen iletiminin zayıf olması eklem ağrısı ve diğer semptomlara neden olur. Orak hücre hastalığı en iyi anlaşılmış kalıtsal genetik bozukluklardan biridir.

Bilim insanları insan genomu hakkında daha fazla bilgi edindikçe, dünyanın farklı yerlerindeki farklı özgeçmişe sahip insanların DNA dizilerinin çok benzer olduğunu keşfettiler. Hangi etnik kökenden olursa olsun, insan genomları yaklaşık olarak % 99.9 birbirinin aynıdır. Bir diğer ifadeyle, DNA diziniz Başkan Barack Obama, LeBron James, Britney Spears, Julia Roberts, Justin Bieber'in – veya neredeyse diğer tüm insanların – DNA dizileriyle yaklaşık % 99.9 oranında aynıdır.

Bu nedenle, bir birey ile diğerinin DNA'sı arasında yaklaşık % 0.1 farklılık olması veya binlerce baz çiftinden yalnızca birinin farklı olmasının anlamı; bireyler arasında kabaca 3 milyon farklılık olduğudur. Bu varyasyonların çoğu mutasyonlarla meydana gelir ve çoğunun görünürde etkisi yoktur; ancak diğer mutasyonlar hücre fonksiyonunu, davranışları ve genetik hastalıklara yatkınlıkları güçlü bir şekilde etkiler. Bu değişiklikler insanlar arasındaki boy ve saç renginden, kişilik, zekâ ve yaşam süresine kadar değişen tüm kalıtsal farklılıkların temel kaynaklarıdır.

İnsan genomları arasındaki genetik varyasyonların çoğu, SNP'lerden kaynaklanmaktadır. Örneğin, başkan Barack Obama'nın DNA dizisinin belirli bir bölgesinde belirli bir baz "A" olurken, Britney Spears'ta "T", LeBron'da "C" ve sizin aynı bölgedeki bazınız "G" olabilir. SNP'lerin çoğu DNA'nın intron bölgelerinde olduğu için zararsızdır, ancak ekzon bölgelerinde olurlarsa hücre fonksiyonunu etkileyebilir ve hastalığa neden olabilirler. Orak hücre hastalığına bir SNP neden olmaktadır. Şekil 1.12'deki, üç farklı insanda bir gen dizisinin karşılaştırılmasına bakınız. Bu gendeki bir SNP eğer 2. kişide bir sessiz mutasyonsa, proteinin yapı ve fonksiyonunu etkilemeyebilir. Diğer SNP'ler (3. kişide) eğer proteinin yapı ve fonksiyonunu değiştirirlerse hastalığa neden olurlar.



"Hiçkimse yaralanmadığı için şanslısın. Baz çiftlerin dağınık ve okuma çerçevenin tamamı karmakarışıktı."

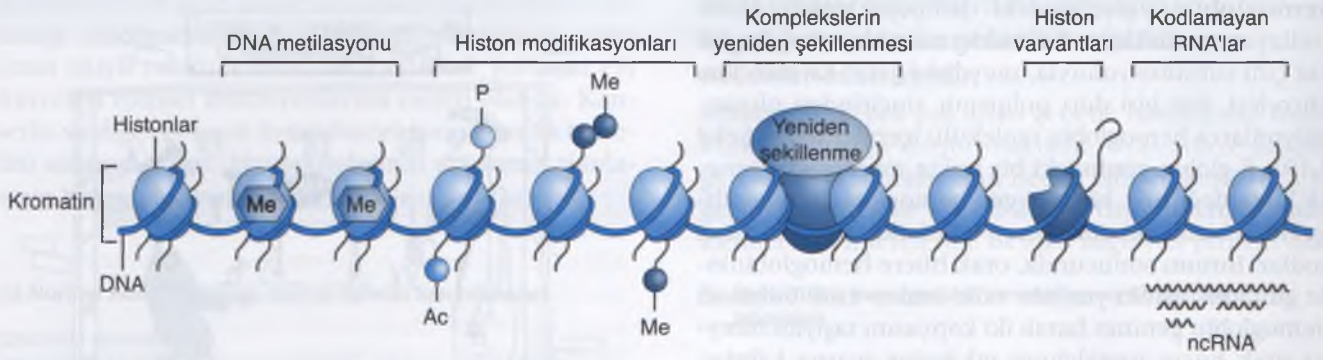
ŞEKİL 2.20 Biyoteknoloji Mutasyonları Belirlemek ve Düzeltmek için Kullanılıyor

İlerleyen bölümlerde, birkaç genetik hastalık şartını tartışacağız, hatalı genlerin nasıl belirlenebildiğini inceleyeceğiz ve bilim insanlarının bu hastalıkları tedavi etmek için gen terapisi yaklaşımları hakkında ne gibi çalışmalar yaptıklarını anlatacağız (**Şekil 2.20**; genetik hastalık koşulları hakkında daha fazla bilgi için, bakınız Bölüm 11).

2.6 Epigenomu Açıklamak

İnsan ve diğer türlerin genomları hakkındaki çalışmalarımız, **epigenom** ve onun gen ekspresyonu üzerindeki etkileri hakkında büyük bir öngörü sağlamıştır. *Epigenom* terimi kromatin yapısındaki modifikasyonları ifade eder, DNA dizisindeki mutasyonları kapsamaz. Bazı epigenetik modifikasyonlar kalıtsalken, bazıları nesilden nesile değişir. Epigenetik modifikasyonlardan bazıları geri dönüşümlü iken, bazıları kalıcıdır. Epigenetik değişiklikler hem vücuttaki hücre tipleri arasında hem de normal ve hastalıklı dokularda farklılık gösterebilir. Beslenme ve çevresel koşullar epigenomu etkileyebilir. Ayrıca, embriyonik gelişim esnasında gen ekspresyonu modellerinin nasıl değişebildiği hakkında epigenetiğin temel bir rol oynadığını biliyoruz.

Epigenom hakkında ne kadar çok çalışırsak, ne kadar karmaşık olduğu hakkında o kadar çok şey öğreniriz. Biz epigenomun önemini doğru bir şekilde değerlendirmeye daha yeni başlıyoruz. Kromatin modifikasyonlarının hangi tipleri epigenoma katkıda bulunur? Epigenetik modifikasyonlar hem DNA'yı hem de histonları etkiler. Örneğin, *metilasyon* olarak bilinen ve genellikle sitozin bazında görülen, metil gruplarının ($-CH_3$) DNA'ya eklenmesi. Metilasyon his-



ŞEKİL 2.21 Epigenetikte Kromatin Modifikasyonları Burada gösterilen kromatin modifikasyonları gen ekspresyonu üzerinde pek çok epigenetik etkiden sorumludur. Bunlar: DNA metilasyonu (Me); asetilasyon (Ac), fosforilasyon (P) ve metilasyon yoluyla histon modifikasyonu; histonların ve diğer DNA-bağlayan proteinlerin yeniden şekillendirilmesi; histon varyasyonları; ve kodlamayan RNA'lar (ncRNA).

ton proteinlerinde de olur. Histon modifikasyonlarının diğer örnekleri; asetil gruplarının ($CO\ CH_3$) eklenmesi veya *asetilasyon* ve fosfat gruplarının (PO_4) eklenmesi veya *fosforilasyon* (**Şekil 2.21**).

Metilasyon, asetilasyon ve fosforilasyonun bir genomu ne ölçüde etkileyeceği, kromozomun bir bölgesinden diğerine büyük ölçüde değişir. Bu kimyasal modifikasyonlar DNA'nın bir kromozomda nasıl paketlenip düğümleneceğini etkileyen karmaşık şekillerde çalışırlar. Böyle epigenetik modifikasyonlar bir DNA parçasının transkripsiyonla ilgili proteinler için ne kadar erişilebilir olduğunu etkilediği için, bu tip yapısal etkileşimler sonuçta gen ekspresyonunun genomun belli bir bölgesinde nasıl kolay bir şekilde meydana geldiğini etkiler. Örneğin, bir genomun aşırı derecede asetillenmiş bölgeleri DNA'nın transkripsiyonuna izin veren daha açık ve daha az yoğun düzenlemeler ortaya çıkmasına neden olur. Genomun böyle bir bölgesinden asetil gruplarının uzaklaştırılması genellikle transkripsiyonu engeller. Trankripsiyonu etkileyen diğer epigenetik modifikasyonlar; genomun aktif bölgelerini gizleyebilecek biçimde histonların ve diğer DNA bağlama proteinlerinin yeniden şekillendirilmesi, DNA'da bulunan histon protein çeşitlerindeki varyasyonlar, DNA'yı örterek gen ekspresyonunu etkileyen kodlamayan RNA'ların bulunup bulunmaması olarak sayılabilir (Şekil 2.21).

Epigenom gen ekspresyonunu düzenlediği için, neredeyse tüm büyük ilaç şirketleri ve pek çok biyoteknoloji şirketi epigenetik projeler üzerinde çalışmaktadır. Epigenomun kanser dâhil pek çok hastalıkla ilgili olduğunu biliyoruz. Epigenetik değişim hedefiyle epigenetik modifikasyonların önlenmesi veya teşvik edilmesi ve bu şekilde hastalıkların tedavisi, çok heyecan veren bir araştırma alanıdır. Örneğin, histon proteinlerine metil grupları ekleyerek gen ekspresyonunu etkileyen, kısmen yeni bir ilaç kategorisi olan histon metil transferazlar (HMTs), belirli kötü huylu tümörlerin ve löseminin tedavisinde gelecek için umut vaat etmektedir. Genomlar ve genetik hastalıkların tedavisi üzerinde çalışan biyoteknoloji endüstrisindeki yöntemler hakkında bilginiz artarken, epigenom hakkındaki bu kısa özeti de aklınızda tutunuz.

BİR FARK YARATMAK

Dünya çapındaki bilim insanları insan hastalıklarının tedavisine yönelik çeşitli hücre terapisi yöntemleri üzerinde çalışmaktadırlar. Örneğin, Rush Üniversitesi Tıp Merkezi ve Emory Üniversitesi'ndeki araştırıcılar küçük jelatin küreciklere bağlı olan retinal pigmentli epitel hücrelerin (RPE) kullanıldığı yeni bir hücre terapisinin uygulamalarını araştırmaktadırlar. İnsan denekler üzerinde yapılan ilk çalışmalarda bu kürecikler Parkinson (PD) hastalarının beyinlerine yerleştirilmiştir. Tedavi edilen hastaların titreme, katılık, hareketlerin yavaşlaması, denge ve koordinasyon bozukluğu gibi Parkinson simptomlarında iyileşme görülmüştür. Tedavi edilen hastaların bazıları tedaviden sonra 6 yıl veya daha fazla süredir iyileşme gösterdiği için, bu hücre terapisi yaklaşımı umut vericidir. RPE hücreleri, beyindeki nöronlar tarafından üretilen sinir taşıyıcısı dopaminlerin öncülü olan levodopayı üretmektedirler. Dopamin üreten nöronların kaybı Parkinson hastalığının ana nedenlerinden biridir. Bu uygulamada, RPE hücreleri bir laboratuvar kültürüne alınır ve hücrelerin beyinde hayatta kalması için gerekli olan jelatin küreciklere eklenir. Daha sonra bu kürecikler hastalara aktarılır. Aktarım yapılan hücreler, dopamin üretmek için bölgesel nöronlar tarafından kullanılabilen, bir levodopa kaynağı oluşturur. Bu uygulamanın Parkinson hastalığının tedavisi için geçerli bir tedavi seçeneği ya da çare olup olmayacağı zaman içinde anlaşılacaktır; ancak şüphesiz ki hastalık tedavisi sürecinde sonuçta "bir fark yaratacak" ve acıları dindirecek pek çok hücre tabanlı stratejinin çalışmaları halen devam etmektedir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Genleri ve kromozomları karşılaştırarak kıyaslayın ve hücre içindeki görevlerini tanımlayın.
2. Eğer bir DNA molekülünün bir iplikçikteki dizisi 5'-AGCCCCGACTCTATTC-3' ise, bu iplikçiğin tamamlayıcı dizisi nedir?
3. Gen ekspresyonu deyimi ne anlama gelmektedir?
4. Yeni bir bakteri suşu teşhis ettiğinizi varsayın. Eğer bu organizmanın hücrelerinin DNA içeriğinin % 13'ü adenin ise, genomunun yaklaşık yüzde kaçı guaninden oluşur? Cevabınızı açıklayınız.
5. DNA ve RNA arasındaki en az üç önemli farklılığı sayın.
6. Aşağıdaki mRNA dizisini ele alalım: 5'-AGCACCAUGCCCCGAACCUCAAAGUGAAACAAAAA-3'. Bu mRNA kaç adet kodon içermektedir? Bu dizi ile kaç adet amino asit kodlanır? Bu mRNA tarafından kodlanan bir amino asit dizisini belirlemek için Tablo 2.3'ü kullanın. Not: mRNA moleküllerinin aslında burada gösterilen kısa diziden çok daha büyük olduğunu unutmayın.
7. Aşağıdaki DNA dizisini ele alalım:

   5'-TTTATGGG TTGGCCCGGGTCATGATT- 3'
   3'-AAATCCCAACCGGGCCCAGT ACTAA- 5'

   a. Bu dizilerin herbirini mRNA'ya transkribe edin. Hangi DNA dizisi (üst veya alt iplikçik) başlangıç kodonu içeren fonksiyonel bir mRNA üretir? Bu mRNA'dan üretilen polipeptidin amino asit dizisi nedir?

   b. Fonksiyonel mRNA'yı üreten DNA ipliği için, soldan sağa doğru her bazı ilki "1." olacak şekilde numaralandırın. 10 ve 11. bazlar arasına, insersiyon mutasyonu gibi, bir " T" ekleyin. Bu yeni iplikten mRNA transkribe edin ve onu translasyonla bir proteine dönüştürün. Bu proteinin amino asit dizisini (a) seçeneğinde translasyon olan diziyle karşılaştırın. Neler oldu? Açıklayınız.
8. Protein senteziyle ilgili üç RNA çeşidinin adını yazınız ve her birinin fonksiyonlarını açıklayınız.
9. Operon nedir? Bakteriler gen ekspresyonu regülasyonunda operonları nasıl kullanır?
10. Gen ekspresyonu regülasyonu nedir? Neden önemlidir? Gen ekspresyonunun regüle edilebilmesinin yollarını örneklerle açıklayınız.
11. DNA'nın yarı korunumlu replikasyon sürecini, bir replikasyon çatalı çizerek ve bu işlemle ilgili önemli enzimleri, proteinleri ve diğer bileşenleri göstererek anlatınız. Her bir bileşenin fonksiyonunu bir cümle ile tanımlayınız.
12. Neden bazı mutasyonların proteinlerin yapı ve fonksiyonlarını değiştirmeleri hastalıklara neden olurken, diğer mutasyonların proteinlerin yapı ve fonksiyonu üzerinde önemli bir etkisi yoktur?
13. DNA'nın bir nükleotidindeki deoksiriboz şekerinin hangi karbonu azotlu baza bağlıdır?
14. Epigenom nedir? Biyoteknoloji ve ilaç şirketleri epigenomla niçin ilgilenmektedir?

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

3

Rekombinant DNA Teknolojisi ve Genomik

Çeviren: Fuat ÖZYÖRÜK

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Rekombinant DNA teknolojisinin genlerin klonlanmasında ve DNA'nın manipüle edilmesinde nasıl kullanılacağını açıklayabilmelisiniz.
- Farklı tipte klonlama vektörlerinin özelliklerini ve uygulama alanlarını karşılaştırabilmelisiniz.
- Hedef genler için DNA kütüphanelerinin nasıl oluşturulup, taranacağını anlayabilmelisiniz.
- Genlerin yapı, işlev ve ifadelerinde agaroz jel elektroforezi, PCR ve diğer moleküler tekniklerin kullanımını açıklayabilmelisiniz.
- Tüm genom shotgun ve yüksek hacimli dizi analizi tekniklerinin çalışma ilkelerini anlatabilmelisiniz.
- İnsan genom projesinin önemli bulgularını, tıbbi ve bilimsel uygulama alanlarını, bunlarla ilişkili etik, yasal ve sosyal problemleri anlayabilmelisiniz.
- Genomikle ilgili "omik" son ekli disiplinlerin neden hızla geliştiklerini açıklayabilmelisiniz.
- Biyoinformatiğin nükleik asit, protein dizi ve yapılarının analizinde nasıl kullanıldığı ile ilgili örnekler verebilmelisiniz.



Rekombinant DNA deneyi yapan biyoloji lisans öğrencileri.

Öğrendiğiniz gibi, biyoteknoloji yeni bir bilim değil, ancak modern biyoteknoloji dönemi DNA klonlama tekniklerinin geliştirilmesiyle başladı. 1970'lerden buyana ve günümüzde **rekombinant DNA teknolojisi** ve **genetik mühendisliği** alanlarında şaşırtıcı ve hızla gelişen laboratuvar yöntemleri, moleküler biyoloji, temel bilimler ve tıbbi araştırmayı sürekli değiştirmektedir. Bu bölümde, rekombinant DNA teknolojisinin bir özetini sunacağız. Daha sonra bilim insanlarının genleri klonlamada gen yapısını ve işlevlerini çalışmada kullandığı inanılmaz bir dizi tekniğe göz atacağız. Bu bölüm, genom çalışmaları için yöntemler sunan genomik ve biyoinformatiğe giriş ile son bulacaktır.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Rekombinant DNA ve genom araştırmalarında gelecekte öngörülen pek çok heyecan verici alan vardır. Değişik bitkiler, hayvanlar, bakteri, virus ve diğer canlılar için yapılan binlerce genom projesinin tamamlanıyor olması şüphesiz en önemli gelişmedir. Bilim insanlarının biyoteknolojideki potansiyel uygulamaları kullanarak yeni genler bulma umudu sürmektedir. İnsan Genom Projesinin sağladığı başarının ardından, genomik bilgilerin—ağrı ve acının biyoteknolojik yöntemlerle hafifletilmesi, hastalık genlerinin erken saptanması, kanser ve diğer birçok beşeri sağlık sorunu için gen-temelli tedavi stratejilerini de içeren—yeni uygulamalar için kullanımı büyük umutlar vaat etmektedir. Ayrıca, yakın gelecekte bireysel genomların dizi analizleri de söz konusu olacaktır.

3.1 Rekombinant DNA Teknolojisi ve DNA Klonlanmasına Giriş

Bilim insanları James Watson ve Francis Crick DNA molekülünün çift iplikçikli sarmal bir yapısı olduğunu bulduklarında, bu buluşun potansiyel önemi ve etkisini belirtmişlerdi. Ancak moleküler biyolojinin sonraki yarım yüzyılda kat ettiği şaşırtıcı gelişme Nobel ödülü kazanan onlar için bile hayaldi.

Watson ve Crick'in buluşunun yıllar öncesinde ve sonra, birçok diğer bilim insanı DNA'nın canlı hücrenin genetik materyali olduğuyla ilgili anlayışımıza katkıda bulunmuştur. Birçok araştırıcı bakteri ve bakteriyofajlarda DNA yapısı ve replikasyonunu çalışmışlardır. Daha çok faj olarak da adlandırılan **bakteriyofajlar** bakteri hücrelerini enfekte eden virüslerdir. DNA replikasyonu ve DNA sentezleyen enzimler hakkında bildiğimiz pek çok şey, bakteri ve fajlar üzerindeki çalışmalardan elde edilmişlerdir. Örneğin DNA ligazın, DNA replikasyonu sırasında DNA parçacıklarını (Okazaki parçaları) birbirine eklediğini anımsayalım (Bölüm 2). İlerde öğreneceğiniz gibi, DNA ligaz rekombinant DNA teknolojisinde çok önemli bir enzimdir.

1960'ların sonlarında, birçok bilim insanı gen klonlamaya ilgi gösterdi ve farklı kaynaklardan elde edilen bir DNA'nın kesilip yapıştırılarak klonlanabileceğini (rekombinant DNA teknolojisi) ileri sürdüler. *Gen klonlama, rekombinant DNA teknolojisi* ve *genetik mühendisliği* terimlerinin aynı süreçleri tanımladığı düşünülebilir. Rekombinant DNA teknolojisi yaygın olarak, gen klonlamasını anlatmada kullanılırken, genetik mühendisliği terimi bir organizmanın genomunu değiştirmek için rekombinant DNA teknolojisi ve gen klonlamasının kullanılmasına dayanır. Ancak *rekombinant DNA teknolojisi* ve *genetik mühendisliği* sıklıkla birbirlerinin yerine kullanılabilir. *Klon*, bir bitkinin üretilmesi veya aşılanması amacıyla dalının kesilmesi anlamına gelen Yunanca bir sözcükten köken alır. Modern biyoloji terminolojisinde, klon, başka tek bir varlıktan üretilen molekül, hücre veya organizmadır. Bu bölümde tanımlandığı şekliyle gen klonlamada gereksinilen teknikler bir organizmayı klonlamak için kullanılanlardan farklıdır.

Restriksiyon Enzimleri ve Plazmid DNA Vektörleri

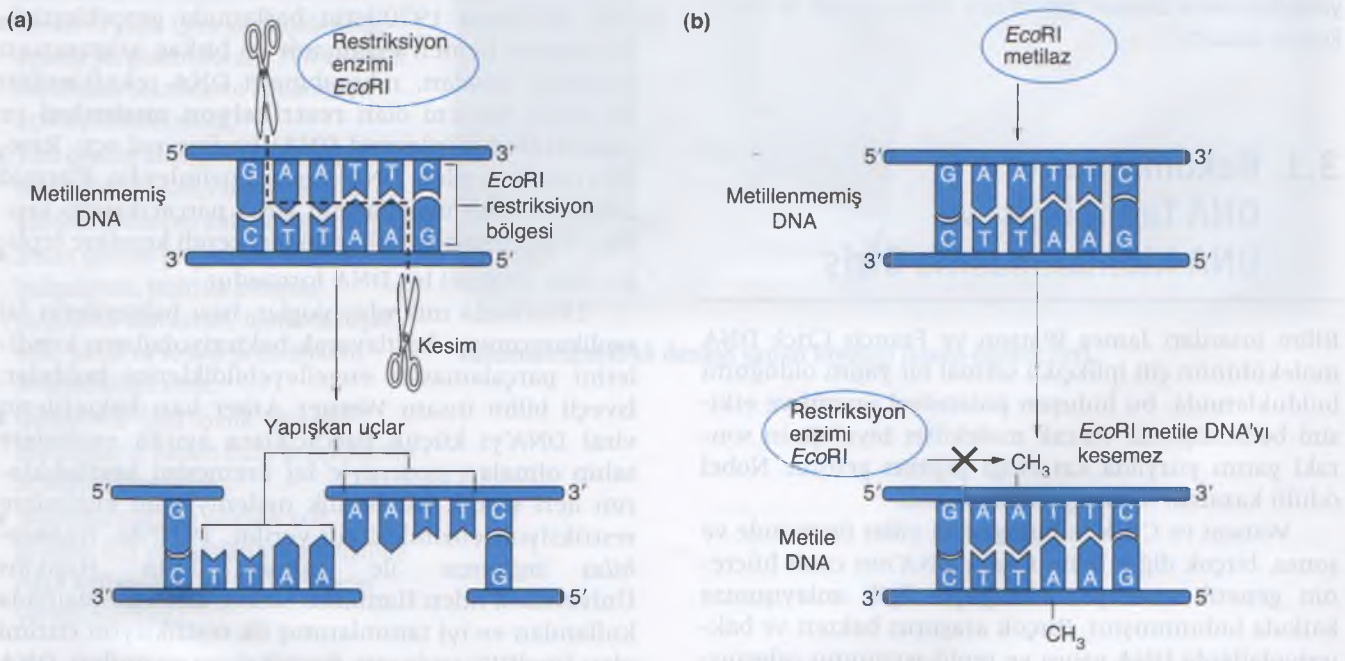
Gen klonlama 1970'lerin başlarında gerçekleştirildi. Hemen hemen eşzamanlı ve birkaç araştırıcının ortaklaşa çabaları, rekombinant DNA tekniklerinin iki temel bileşeni olan **restriksiyon enzimleri** ve **plazmidlerin** (plazmid DNA) keşfine yol açtı. Restriksiyon enzimleri DNA-kesen enzimlerdir. Plazmid DNA ise bilim insanlarının DNA parçacıklarını taşıma ve klonlamada kullandıkları kendi kendine replike olan, dairesel bir DNA formudur.

1960'larda mikrobiyologlar, bazı bakterilerin faj replikasyonunu kısıtlayarak bakteriyofajların kendilerini parçalamasını engelleyebildiklerini buldular. İsveçli bilim insanı Werner Arber bazı bakterilerin viral DNA'yı küçük parçacıklara ayıran enzimlere sahip olmaları nedeniyle faj üremesini kısıtladıklarını ileri sürdü. Bu özellik nedeniyle bu enzimlere restriksiyon enzimleri adı verildi. 1970'de, *Haemophilus influenza* ile çalışan John Hopkins Üniversitesi'nden Hamilton Smith, DNA klonlamada kullanılan ve iyi tanımlanmış ilk restriksiyon enzimi olan *Hin*dIII'ü izole etti. Restriksiyon enzimleri, DNA dizilerini sonundan kesen ekzonükleaz enzimlerinin aksine içinden kestikleri için restriksiyon endonükleaz (endo "içinde", nükleaz, "nükleik asit kesen enzim") olarak da adlandırılırlar. Smith *Hin*dIII'ün

DNA'yı küçük parçacıklara kestiğini veya ayrıştırdığını kanıtlamıştır. 1978 yılında, Smith, Werner Arber ve Daniel Nathans'ın restriksiyon enzimleriyle ilgili buluşları ve uygulamaları onlara Nobel Ödülü kazandırmıştır.

Restriksiyon enzimleri öncelikle bakterilerde bulunurlar ve kısaltılmış adları izole edildikleri bakterilerin tür ve cins adlarından köken alır. Örneğin, izole edilen ilk enzimlerden olan *Eco*RI, *E. coli* RY13 suşundan izole edildiği için bu ad verilmiştir. Restriksiyon enzimleri DNA molekülünü, DNA dizisindeki nükleotidleri birleştiren fofsodiester bağını (şeker-fosfat omurgasındaki) ayırarak keser. Ancak bu rastgele bir kesim olmadığı gibi, tüm restriksiyon enzimleri DNA'yı aynı yerden kesmez. Diğer enzimler gibi restriksiyon enzimleri de belirli bir **substrat** özelliği gösterirler. **Şekil 3.1a**'da gösterildiği gibi, restriksiyon enzimleri DNA'ya **restriksiyon bölgeleri** olarak adlandırılan spesifik noktalardan bağlanır, tanır ve keserler. Restriksiyon enzimleri bakteriyel hücrelerde bulunan DNA'yı kesemezler. Çünkü bakteriyel DNA'nın bazı nükleotidlerinde restriksiyon enzimlerinin etkisini engelleyen metil grupları bulunur (Şekil 3.1b).

Restriksiyon enzimleri, tipik olarak dört veya altı nükleotidlik bir bölgeyi tanıdıklarından, genellikle dört-veya altı baz çifti kesici olarak adlandırılırlar. Sekiz baz çifti kesiciler de tanımlanmıştır. Her restriksiyon bölgesi nükleotidlerin tersten de aynı şekilde okunabildiği bir **palindromdur** (kapak ve ata sözcükleri gibi). *Eco*RI gibi, bazı restriksiyon enzimleri DNA'yı kestiklerinde **yapışkan uçlar** olarak adlandırılan tek iplikçikli serbest uçlar oluşturur (bakınız Şekil 3.1a); başka enzimler ise **küt uç** olarak adlandırılan, çift iplikçikli uçlar oluştururlar. Tablo 3.1 yaygın olarak kullanılan bazı restriksiyon enzimlerini, köken aldıkları mikroorganizmaları ve kesim bölgelerini göstermektedir. İlk üç enzimin altı-baz-çifti kesen ve yapışkan uçlu DNA parçacığı oluşturan enzimler olduklarına dikkat ediniz. Dördüncü enzim (*Taq*I), dört-baz-çifti keser ve yapışkan uçlar oluşturur, aşağıdaki diğer üç enzim ise küt uçlu DNA parçacıkları oluştururlar. Birçok klonlama deneyinde yapışkan uçlu DNA parçacıklarının



ŞEKİL 3.1 Restriksiyon Bölgeleri ve Restriksiyon Enzimi İşleyişi (a) DNA'nın *Eco*RI tarafından kesilmesiyle yapışkan uçlu DNA parçacıkları oluşur. (b) *Eco*RI restriksiyon bölgesinin *Eco*RI metilaz enzimiyle metillenmesi, *Eco*RI'nın DNA'yı kesmesini engeller. Not: *Eco*RI restriksiyon bölgesinin metillenmesi bir adenin nükleotidin üzerinde olmasına rağmen, metilasyon sitozin nükleotidlerinde daha sık oluşur.

TABLO 3.1 YAYGIN RESTRİKSİYON ENZİMLERİ

Kaynak Mikroorganizma	Enzim	Restriksiyon Bölgesi
Yapışkan Uç Oluşturanlar		
Hemophilus influenzae	*Hin*dIII	5′ A-A-G-C-T-T 3′ / 3′ T-T-C-G-A-A 5′
Escherichia coli	*Eco*RI	5′ G-A-A-T-T-C 3′ / 3′ C-T-T-A-A-G 5′
Bacillus amyloliquefaciens	*Bam*HI	5′ G-G-A-T-C-C 3′ / 3′ C-C-T-A-G-G 5′
Thermus aquaticus	*Taq*I	5′ T-C-G-A 3′ / 3′ A-G-C-T 5′
Küt Uç Oluşturanlar		
Arthrobacter luteus	*Alu*I	5′ A-G-C-T 3′ / 3′ T-C-G-A 5′
Haemophilus aegypticus	*Hae*III	5′ G-G-C-C 3′ / 3′ C-C-G-G 5′
Serratia marcescens	*Sma*I	5′ C-C-C-G-G-G 3′ / 3′ G-G-G-C-C-C 5′

kolayca birleşebilmeleri, yapışkan uç oluşturan enzimlerin küt uç oluşturan enzimlere göre daha sık tercih edilmesine neden olur. Herhangi bir canlıya ait DNA, eğer belli bir restriksiyon bölgesine sahip ise, belirli bir enzim tarafından parçalanabilir. Restriksiyon enzimlerinin keşfi, moleküler biyologlara en basit ifadeyle gen klonlamaya olanak sağlayan makasların keşfi anlamına gelmektedir.



TİCARET ARAÇLARI

Restriksiyon Enzimleri

Restriksiyon enzimleri moleküler biyologların DNA ile oynayabilmelerini sağlayan çok gelişmiş makaslardır. Hamilton Smith ve diğer bilim insanlarının öncülüğü ile son 30 yıldır restriksiyon enzimleri ile çalışmak daha kolay hale gelmiştir. 300'ün üzerinde restriksiyon enzimi ticari olarak oldukça ucuza sağlanabilmektedir. Birçok enzim rekombinant DNA teknolojisi ile klonlanmış olduğundan kolaylıkla yüksek miktarlarda elde edilebilmektedir. Ticari olarak hazırlanan enzimler uygun boyutlarda, tampon sıvıları ve enzimsel etkinlik için gereken tüm bileşenleriyle birlikte paketlenerek satılırlar. Bir araştırıcı ilk kez bir enzim ile çalışacak ise, enzim özelliklerini ve tedarik edicilerin yerlerini içeren restriksiyon enzim veri tabanını (REBASE) kullanabilmektedir.

Ayrıca, restriksiyon enzimleri ve DNA dizileri ile çalışan bilim insanlarına yardımcı olan çok değişik yazılım ve internet siteleri bulunmaktadır. Örneğin, 7 200 bazlık bir DNA dizisini klonlayan ve dizi analizini yapan bir moleküler biyolog olduğunuzu ve geninizi 250 baz çifti uzunluğunda bir prob oluşturacak şekilde kesen bir enzim olup olmadığını araştırmak istediğinizi varsayalım. Yakın zamanlara kadar bu işlemi, birçok enzimle, uzun zaman ve kaynak gerektiren deneme yanılma yoluyla anlamak zorundaydınız. Eğer geninizin dizi analizini yapmış olsaydınız, aradığınız restriksiyon bölgesini, diziyi gözlerinizle tarayarak bulmak zorunda kalırdınız. Restriksiyon bölgelerinin analizini sağlayan araçlara sahip pek çok web sitesi sayesinde, bu işlemler artık çok daha kolay yapılabiliyor. Örneğin Webcutter'da, DNA dizileri web sitesine yüklenerek restriksiyon enzim kesim motifleri yönünden incelenebilmektedir (Sorular ve Etkinlikler bölümünde 8. soruya bakınız).

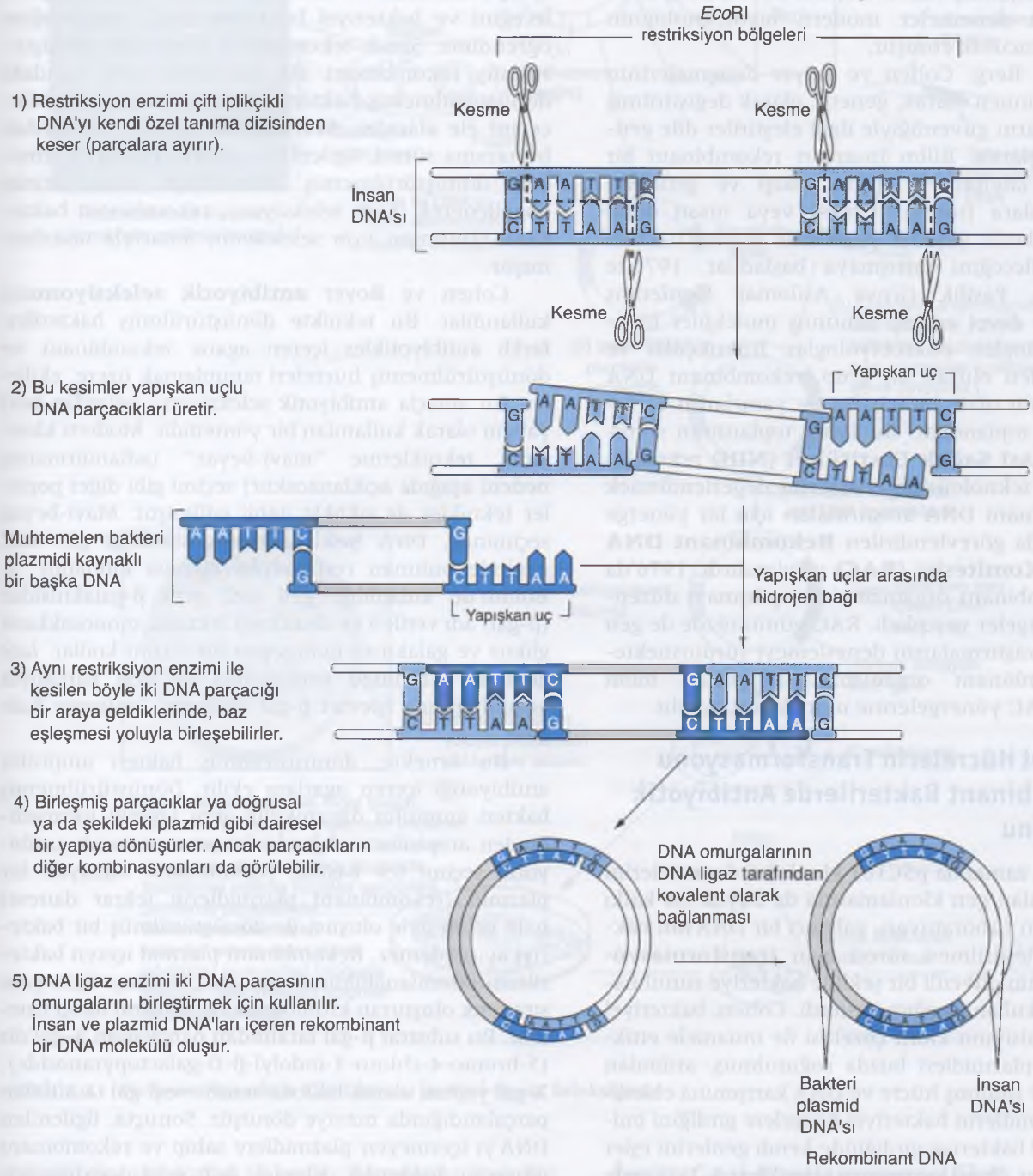
Rekombinant DNA tekniklerinin biyoloji ve tıp araştırmalarında yaygın bir şekilde uygulamaya girmesiyle yüzlerce yöntem kitabı, web sitesi ve bilimsel dergi ortaya çıkmıştır. Popüler aylık *Biotechniques* dergisinde biyologlar moleküler klonlama teknikleri konusundaki bilgilerini yayınlar ve paylaşırlar. PCR primerlerinin tasarlanmasında yaygın olarak kullanılan birçok site ve uygulamalar Rehber İnternet Sitesindeki Güncel Kalın (Keeping Current): Web bağlantılarında bulunabilir.

1970'lerin başında, Stanford Üniversitesi'nden Paul Berg, Herbert Boyer, Stanley Cohen ve arkadaşları moleküler biyolojiyi sonsuza kadar değiştirecek olan gen klonlamasını kullandılar. Berg'in *E. coli* kromozomu DNA'sı ve bir maymun virüsü olan SV40 (simian virüs 40) DNA'sını birleştirerek (uç birleştirme) rekombinant bir DNA parçacığı oluşturması, rekombinant DNA teknolojisinin ilk adımı oldu. Berg, önce *E. coli* ve SV40 DNA'larını izole etti. Sonra her iki DNA örneğini *Eco*R1 ile kesti, oluşan kromozomal ve viral DNA parçacıklarını DNA ligaz enzimi içeren bir reaksiyon tüpünde bir araya getirdi ve *E. coli* ve SV40 DNA'larından oluşan melez molekülü oluşturmuş oldu. Paul Berg, bu deneyiyle 1980'de kimya alanında Nobel Ödülü aldı ve yaptığı buluşun önemi bilim dünyası tarafından kabul edildi. Bu deneyde farklı kaynaklardan elde edilen DNA örneklerinin aynı enzimle kesilebileceği ve oluşan parçacıkların bir rekombinant DNA molekülünde birleştirilebileceği gösterildi. Berg Nobel Ödülünü, birbirlerinden bağımsız olarak DNA dizileme yöntemleri – bu bölümde daha sonra tartışılacak – geliştiren, Walter Gilbert ve Frederick Sanger ile paylaştı.

Berg kromozomal DNA ile çalışırken; Cohen plazmid olarak bilinen küçük ve dairesel DNA'ların moleküler biyolojisi üzerine yoğunlaştı. Plazmid DNA'ları öncelikle bakterilerde bulunurlar ve bakteriyel kromozomun yanı sıra bakteriyel sitoplâzmada bulunmaları onların ekstrakromozamal DNA olarak ele alınmalarına neden olur. Plazmidler sıklıkla ortalama 1 000-4 000 baz çifti arasında boyutlardadır ve kromozomdan bağımsız olarak kendi kendilerine replike olabilirler. Cohen plazmid replikasyonunu, plazmidlerin bakteriler arasında transferini ve bakterilerin antibiyotiklere dayanıklılık mekanizmalarını çalışmıştır.

Cohen plazmidlerin başka DNA parçalarını alan, taşıyabilen ve çoğaltabilen bir DNA parçacığı **(vektör)** olarak kullanılabileceğini ileri sürdü. Cohen ve Boyer DNA'yı başarıyla klonladıkları iki bakteriyel plazmidle deneme yaptılar ve sonuçları 1973'de yayınladılar. Birçok kişi bu çalışmayı rekombinant DNA teknolojisinin resmi olmayan doğumu olarak kabul etmiştir. Herbert Boyer tarafından daha önce izole edilen bir restriksiyon enzimi olan *Eco*R1'i kullanarak, her iki plazmidi önce kestiler. Daha sonra plazmid parçacıklarını DNA ligaz kullanarak birleştirip yeni bir melez (rekombinant) plazmid elde ettiler. DNA ligazın nükleotidlerin fosfodiester bağ oluşumunu katalize eden bir enzim olduğunu hatırlayalım. Ligaz yapışkan uçlu veya küt uçlu DNA parçacıklarını bağlayabilir. Bu ve bunun gibi denemelerin sonunda, Cohen ve Boyer klonlama amacına yönelik ilk plazmidi oluşturdular ve pSC101

("SC" Stanley Cohen) olarak adlandırdılar. pSC101 tetrasikline dayanıklılık geni ve *Eco*R1 ve *Hin*dIII gibi birkaç enzim tarafından tanınan restriksiyon bölgesi içermekteydi. İzleyen çalışmalarda Güney Afrika pençe-ayaklı kurbağasından (*Xenopus laevis*, genetik ve gelişimsel biyolojide kullanılan önemli bir model canlı) alınan DNA'yı pSC101'in *Eco*R1 alanına klonladılar. **Şekil 3.2**'de Cohen ve Boyer'in denemelerindeki uygulamalara benzer şekillerle rekombinant DNA'nın nasıl oluşturulduğu gösterilmiştir.



ŞEKİL 3.2 Rekombinant DNA'nın Oluşturulması *Eco*RI belirli bir diziye (5'-GAATTC-3') bağlanır ve DNA omurgasını keserek parçalara ayırır. DNA parçalarının tek-iplikli uçları tamamlayıcı baz çiftlerine sahip olduklarından birbirleri ile hidrojen bağları oluşturabilir. Daha sonra DNA ligaz rekombinant DNA'yı oluşturmak için DNA parçalarının omurgasındaki kovalent bağların oluşumunu katalize eder.

Cohen ve Boyer ilk DNA klonlama vektörünü (DNA yerleştirme ve replikasyonuna yönelik bir araç) oluşturmuş ve 1980'de geliştirdikleri pSC101 ile gen ekleme ve klonlama teknikleri için patent almışlardır. Gen klonlama ve gen manipülasyonlarında kullanılan pek çok güncel teknik, rekombinant DNA teknolojisinin bu temel yöntemlerine dayandığından, bu denemeler modern biyoteknolojinin doğuşuna öncülük etmiştir.

1974'te Berg, Cohen ve Boyer denemelerinin direkt bir sonucu olarak, genetik olarak değiştirilmiş organizmaların güvenliğiyle ilgili eleştiriler dile getirilmeye başlandı. Bilim insanları rekombinant bir bakterinin laboratuvar dışına çıkışı ve genlerini başka canlılara transfer etmesi veya insan dâhil başka canlılarda yaşama şansı elde etmesi halinde neler olabileceğini tartışmaya başladılar. 1975'te Kaliforniya, Pasifik Grove Asilomar Konferans Merkezi'ne davet edilen tanınmış moleküler biyologlar, virologlar, mikrobiyologlar, hukukçular ve gazetecilerden oluşan bir grup, rekombinant DNA teknolojisinin olası zararlarını ve yararlarını tartışmak üzere toplandılar. Bu tarihi toplantının sonucunda, **Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH)** rekombinant DNA teknolojisinin risklerini değerlendirmek ve rekombinant DNA araştırmaları için bir yönerge oluşturmakla görevlendirilen **Rekombinant DNA Danışma Komitesi**ni **(RAC)** yapılandırdı. 1976'da RAC rekombinant organizmalarla çalışmayı düzenleyen yönergeler yayınladı. RAC günümüzde de gen klonlama araştırmalarını denetlemeyi sürdürmektedir. Rekombinant organizmalarla çalışan bilim insanları RAC yönergelerine uymak zorundadır.

Bakteriyel Hücrelerin Transformasyonu ve Rekombinant Bakterilerde Antibiyotik Seleksiyonu

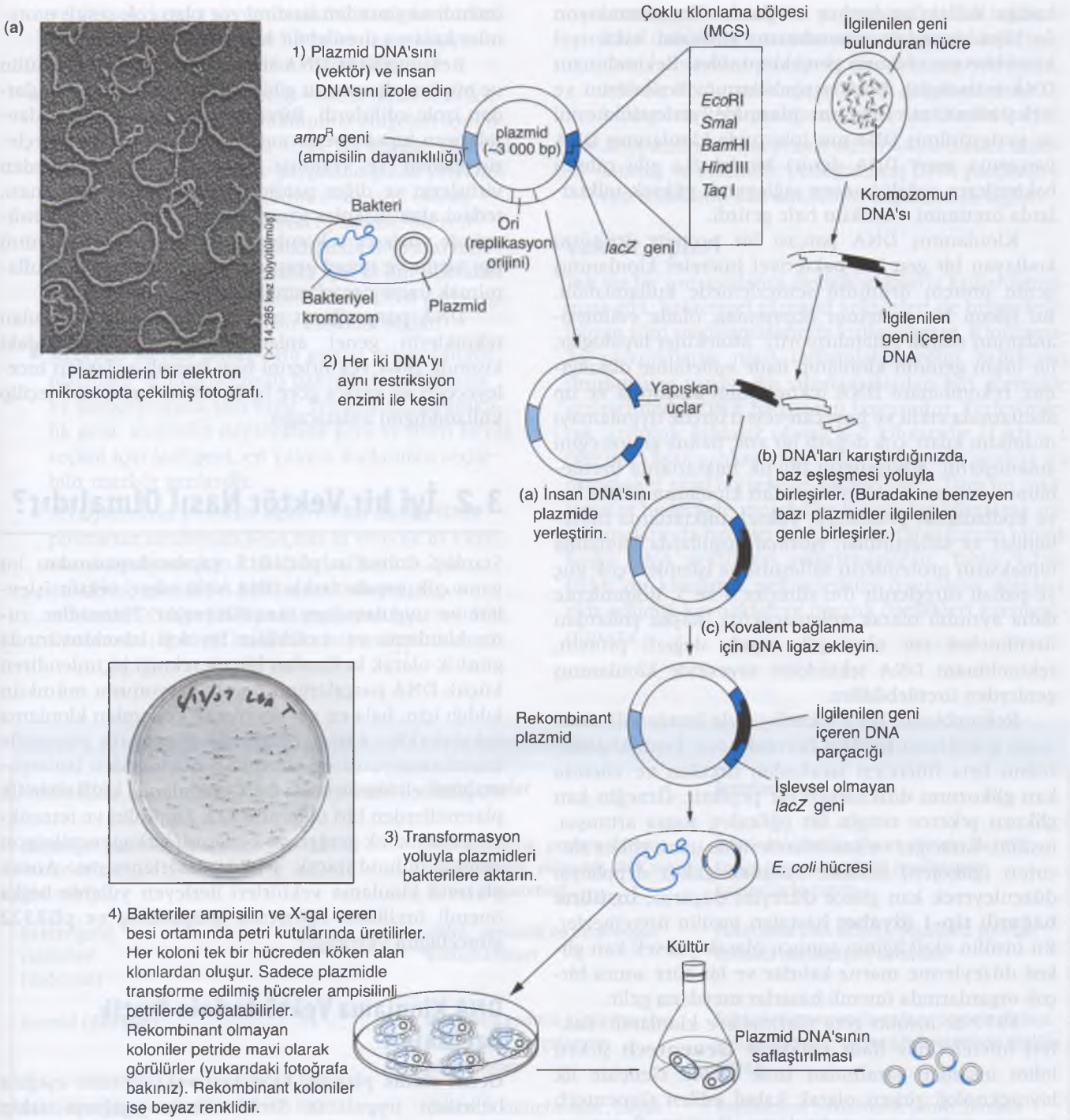
Cohen aynı zamanda pSC101 klonlama denemelerini mümkün kılan gen klonlamasına da büyük bir katkı yaptı. Cohen Laboratuvarı, yabancı bir DNA'nın bakterilere yerleştirilmesi süreci olan **transformasyon**un, DNA'nın güvenli bir şekilde bakteriye sunulmasında nasıl kullanılacağını gösterdi. Cohen, bakteriyel hücreleri kalsiyum klorit çözeltisi ile muamele ettikten sonra, plazmidleri buzda soğutulmuş, ardından kısa bir süre ısıtılmış hücre ve DNA karışımına eklediğinde, plazmidlerin bakteriyel hücrelere girdiğini buldu. Plazmid bakteriye girdiğinde kendi genlerini eşler ve ifade eder. Transformasyon teknikleri 5. Bölümde daha ayrıntılı açıklanacaktır. Daha modern bir transformasyon yöntemi olan **elektroporasyon**, yüksek voltajlı elektrik akımı darbeleriyle bakteri hücre duvarında küçük delikler oluşturarak DNA'nın girişine olanak sağlar.

Başka yöntemlerle DNA parçacıklarının ligasyonu ve transformasyonu istenen sonucu vermeyebilir. Ligasyon sırasında parçalanmış bazı plazmidler yabancı DNA'yı almadan tekrar dairesel durumlarına dönerler. Transformasyon sırasında hücrelerin pek çoğu DNA'yı almazlar.

Şu ana kadar DNA'nın bir vektöre nasıl yerleştirileceğini ve bakteriyel hücrelere nasıl sunulacağını öğrendiniz. Şimdi rekombinant plazmidle dönüştürülmüş rekombinant bir bakterinin çok sayıdaki dönüştürülmemiş bakterilerden nasıl ayırt edilebileceğini ele alacağız. **Seleksiyon** olarak adlandırılan bu tarama süreci, ilgilenilen yabancı DNA'yı içermeyen dönüştürülmemiş bakterilerin üremelerinin engellenerek (*karşı* seleksiyon), rekombinant bakterinin tanınması (*için* seleksiyon) amacıyla tasarlanmıştır.

Cohen ve Boyer **antibiyotik seleksiyonu**nu kullandılar. Bu teknikte dönüştürülmüş bakteriler, farklı antibiyotikler içeren agara, rekombinant ve dönüştürülmemiş hücreleri tanımlamak üzere, ekilirler. Bu amaçla antibiyotik seleksiyonu yıllardan beri yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Modern klonlama tekniklerine "mavi-beyaz" (adlandırmanın nedeni aşağıda açıklanacaktır) seçimi gibi diğer popüler teknikler de sıklıkla dahil edilmiştir. Mavi-beyaz seçiminde, DNA **Şekil 3.3**'de gösterildiği gibi *lac*Z geninde bulunan restriksiyon alanına klonlanır. 2. Bölüm'de anlatıldığı gibi *lac*Z geni β-galaktosidaz (β-gal) adı verilen ve disakkarit laktozu, monosakkarit glikoz ve galaktoza indirgeyen bir enzim kodlar. *lac*Z geninin bütünlüğü yerleştirilen bir gen parçasıyla bozulduğunda işlevsel β-gal enzimini üretemez hale gelir.

Bu örnekte, dönüştürülmüş bakteri ampisilin antibiyotiği içeren agarlara ekilir. Dönüştürülmemiş bakteri ampisilin dayanıklılık geni (*ampR*) içermediğinden ampisilin varlığında üreyemez. Ancak antibiyotik seçimi tek başına, rekombinant olmayan bir plazmid (rekombinant plazmidlerin tekrar dairesel hale gelmesiyle oluşur) ile dönüştürülmüş bir bakteriyi ayırt edemez. Rekombinant plazmid içeren bakterilerin tanımlanabilmesi için, agar, antibiyotiğin yanı sıra renk oluşturan kromojenik bir substrat da içermelidir. Bu substrat β-gal tarafından parçalanan X-gal'dir (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside). X-gal yapısal olarak laktoza benzer ve β-gal tarafından parçalandığında maviye dönüşür. Sonuçta, ilgilenilen DNA'yı içermeyen plazmidlere sahip ve rekombinant olmayan bakteriler işlevsel *lac*Z geni içerdiğinden β-gal üretir ve maviye dönüşürler. Böylece mavi-beyaz seçimi ile dönüştürülmemiş ve rekombinant olmayan bakteriler ya üremez ya da mavi renklerinden dolayı seçilmezler. Beyaz koloniler ise istenilen plazmidi içerdiklerinden tanınarak seçilirler. Rekom-



ŞEKİL 3.3 Bir Genin Plazmidde Klonlanması ve Mavi-Beyaz Seleksiyonu

binant plazmid içeren koloniler **klonlar**dır (her biri rekombinant plazmidlerin kopyalarını içeren, genetik olarak özdeş bakteri hücreleri).

İnsan Geni Klonlanmasına Giriş

Restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve plazmidler mümkün olan her kaynaktan genlerin klonlanması ve manipülasyonu amacıyla moleküler biyologlar tara-

fından kullanılan başlıca araçlardır. Transformasyon ile bilim insanları rekombinant DNA'nın bakteriyel hücrelere sunuluşunu gerçekleştirdiler. Rekombinant DNA teknolojisi, DNA parçacıklarının kesilmesini ve birleştirilmesini, DNA'nın plazmide yerleştirilmesini ve yerleştirilmiş DNA'nın (plazmide klonlanmış DNA parçasına *insert* DNA denir) bir fabrika gibi çalışan bakterilerce çoğaltılmasını sağlayarak yüksek miktarlarda üretimini mümkün hale getirdi.

Klonlanmış DNA parçası bir protein ürününü kodlayan bir gen ise, bakteriyel hücreler klonlanmış genin protein ürününü sentezlemede kullanılabilir. Bu işlemi bir proteinin *ekspresyonu* (ifade edilmesi-anlatımı) olarak adlandırıyoruz. Moleküler biyologlar, bir insan geninin klonlanıp ifade edilebilme olasılığının, rekombinant DNA teknolojisini araştırma ve tıp alanlarında etkili ve heyecan veren birçok uygulamayı mümkün kılan, çok değerli bir araç haline getireceğini anlamışlardı. Bakterilerin büyük miktarlarda üretilebilmesi sayesinde, bilim insanları klonlanmış DNA'ları ve kodladıkları proteinleri yüksek miktarlarda üretebildiler ve saflaştırdılar. Normal koşullarda klonlama olmaksızın proteinlerin saflaştırılma işlemleri çok güç ve pahalı süreçlerdir (bu süreçler 4 ve 5. Bölümlerde daha ayrıntılı olarak anlatılacaktır). Başka yollardan üretilmeleri zor olan çok sayıda değerli protein, rekombinant DNA teknolojisi sayesinde klonlanmış genlerden üretilebildiler.

Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen ilk ticari insan gen ürünü **insülin** hormonudur. İnsülin, pankreasın beta hücreleri tarafından üretilen ve vücutta kan glikozunu düzenleyen bir peptittir. Örneğin kan glikozu şekerce zengin bir öğünden sonra artmışsa, insülin, karaciğer ve kas hücrelerinde uzun glikoz zincirleri (glikojen) halinde bulunan glikoz depolarını düzenleyerek kan glikoz düzeyini düşürür. **İnsüline bağımlı tip-1 diyabet** hastaları insülin üretemezler. Bu insülin eksikliğinin sonucu olarak yüksek kan glikoz düzeylerine maruz kalırlar ve bir süre sonra birçok organlarında önemli hasarlar meydana gelir.

1977'de insülin geni plazmidlere klonlandı, bakteri hücrelerinde ifade edildi ve **Genentech** şirketi bilim insanları tarafından izole edildi. Genelde ilk biyoteknoloji şirketi olarak kabul edilen Genentech (*gene*tic *en*gineering *tech*nology) Herbert Boyer ve Robert Swanson tarafından 1976'da San Francisco'da kurulmuştur (insülinin klonmasında kullanılan tekniklerin ayrıntıları Bölüm 5'te incelenmektedir).

1982'de insan insülininin rekombinant formu (**Humulin**), insan uygulamalarında kullanılmak üzere **ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)** tarafından onaylanan ilk rekombinant DNA ürünü oldu. İnsülinden kısa bir süre sonra cüce çocukların tedavisinde kullanılan büyüme hormonu da klonlandı ve üretildi. Rekombinant DNA teknolojisi sayesinde tıbbi olarak önemli ve önceden üretimi zor olan çok çeşitli proteinler kolayca üretilebilir hale geldi.

Rekombinant DNA teknolojisinden önce, insülin ve büyüme hormonu gibi önemli hormonlar dokulardan izole edilirlerdi. Büyüme hormonu insan kadavralarının hipofiz bezlerinden elde edilirdi. Bu süreçlerin pahalı ve verimsiz olması yanında, bilmeden virüslerin ve diğer patojenlerin hormona bulaşması, tedavi alan insanlar için risk oluşturmaktaydı. Günümüzde yüzlerce rekombinant DNA teknolojisi ürünü tıp, tarım ve temel araştırma uygulamalarında kullanılmak üzere pazarlanmaktadır.

DNA parçacığının manipülasyonunda kullanılan tekniklerin genel anlatımından sonra, aşağıdaki kısımda DNA vektörlerini bazı önemli açılardan inceleyeceğiz ve amaca göre farklı vektörlerin nasıl seçilip kullanıldığını anlatacağız.

3.2 İyi bir Vektör Nasıl Olmalıdır?

Stanley Cohen'in pSC101'i yapılandırmasından bu yana çok sayıda farklı DNA vektörleri, vektör işlevleri ve uygulamaları tanımlanmıştır. Plazmidler, rutin klonlama ve moleküler biyoloji laboratuvarında günlük olarak kullanılan birçok tekniği biçimlendiren küçük DNA parçalarının manipülasyonunu mümkün kıldığı için, hala en yaygın olarak kullanılan klonlama vektörleridir. Ayrıca bakteriyel hücrelerin plazmidle transformasyonu ve plazmidin hücrelerden izolasyonu göreceli olarak kolaydır. Geniş alanda kullanılan ilk plazmidlerden biri olan pBR322, ampisilin ve tetrasiklin dayanıklılık genleri ve kullanışlı birkaç restriksiyon bölgesi bulunduracak şekilde tasarlanmıştır. Ancak plazmid klonlama vektörleri ilerleyen yıllarda başka önemli özellikler eklenerek geliştirilmiş ve pBR322 güncelliğini yitirmiştir.

DNA Klonlama Vektörlerinin Pratik Özellikleri

Genel olarak plazmid klonlama vektörlerinin aşağıda belirtilen uygulama özelliklerinden çoğuna sahip olmaları beklenir.

- *Boyut*—Konak bakterinin kromozamal DNA'sından kolaylıkla ayrılabilmesi için yeterince küçük olmalıdır.
- *Replikasyon orijini (ori)*—Plazmidin konak hücre kromozomundan ayrı olarak replikasyonuna olanak tanıyan DNA replikasyon bölgesi. Bir hücredeki plazmid sayısı **kopya sayısı** olarak adlandırılır. Normalde kopya sayısı beher hücre için 12'den azdır; ancak klonlama amacıyla kullanılan

ve yüksek-kopya sayılı olarak bilinen plazmidler her bir hücrede yüzlerce hatta binlerce kopya oluşturacak şekilde replike olabilirler.

- *Çoklu klonlama bölgesi (MCS)*—MCS, farklı restriksiyon enzimleri tarafından tanınma bölgeleri içeren bir DNA parçasıdır (Şekil 3.3a). Bu alanlar, plazmid restriksiyon enzimleri ile parçalandığında DNA'nın başka alanlarının zarar görmesine engel olacak şekilde tasarlanmıştır. Dairesel plazmid, bir restriksiyon enzimi ile parçalandığında doğrusal hale gelir. MCS birçok farklı enzim için kesim noktaları içerdiğinden, plazmide klonlanacak DNA parçacığının yerleşimi için büyük bir esneklik sağlar.
- *Seçilebilir markör genler*—Bu genler rekombinant plazmidle dönüştürülmüş bakterinin tanınması ve seleksiyonuna izin verir. Tetrasiklin dayanıklılık geni, ampisilin dayanıklılık geni ve mavi beyaz seçimi için *lacZ* geni, en yaygın kullanılan seçilebilir markör genlerdir.
- *RNA polimeraz promotör dizileri*—Bu diziler RNA polimeraz tarafından RNA'nın in vivo ve in vitro transkripsiyonu için kullanılırlar. Bölüm 2'de anlatıldığı gibi, RNA polimeraz transkripsiyon sırasında DNA'yı RNA'ya kopyalayan bir enzimdir. Canlılarda (*in vivo*), bu diziler bakterilerin klonlanmış genlerden RNA yapmasına olanak sağlar. RNA daha sonra protein sentezini gerçekleştirir. Canlı olmayan ortamlarda (*in vitro*), transkribe edilmiş RNA, gen ifade edilmesi çalışmalarında kullanılan RNA problarını sentezler (Kısım 3.4).
- *DNA dizilemesi için primer dizileri*—Bu diziler klonlanmış ve plazmide yerleştirilmiş DNA parçacığının nükleotid dizi analizinin yapılmasını sağlar.

Vektör Tipleri

Tek tip bir tornavidanın değişik vidalarla kullanılamaması gibi, bakteriyel plazmid vektörleri de biyoteknolojinin tüm uygulamalarında kullanılamaz. Klonlamada plazmidlerin nasıl kullanılabileceğini belirleyen sınırlamalar vardır. Bu sınırlamalardan biri plazmide yerleştirilecek DNA parçasının boyutudur. Yerleştirilecek uzunluk yaklaşık olarak 6-7 kilobazdır (1 kb = 1 000 bp). Ayrıca, bazen bakteriler ökaryotik genlere ait proteinleri zayıf bir şekilde ifade ederler. Tüm bu sınırlamalar nedeniyle moleküler biyologlar klonlama uygulamalarında her biri özel bir avantaj sağlayan birçok başka DNA vektörleri geliştirmişlerdir. Tablo 3.2'de farklı tip klonlama vektörlerinin uygulama alanları, elde edildiği kaynaklar ve önemli özellikleri karşılaştırılmıştır.

TABLO 3.2 DNA VEKTÖRLERİ VE UYGULAMALARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Vektör Tipi	Maksimum Ekleme Boyutu (kb)	Uygulamalar	Sınırlamaları
Bakteriyel plazmid vektörleri (dairesel)	~ 6–12	DNA klonlama, protein ifadesi, alt-klonlama, eklenmiş DNA'nın direkt dizilenmesi	Sınırlı ekleme boyutu ve protein ifadesi; kopya sayısı sorunları; replikasyon bakterilerle sınırlı
Bakteriyofaj vektörleri (doğrusal)	~ 25	cDNA, genomik ve ekspresyon kütüphaneleri	Paketleme DNA ekleme boyutunu sınırlar, konakta replikasyon sorunları
Kozmid (dairesel)	~ 35	cDNA ve genomik kütüphaneler, büyük DNA parçalarının klonlanması	Faj paketleme sınırlamaları; protein ifadesi için ideal değil; memeli hücrelerinde replike olmaz
Bakteriyel yapay kromozom (BAC, dairesel)	~ 300	Genomik kütüphaneler, büyük DNA parçalarının klonlanması	Replikasyon bakterilerle sınırlı; protein ekspresyonu için kullanılamaz
Maya yapay kromozomu (YAC, dairesel)	200–2 000	Genomik kütüphaneler, büyük DNA parçalarının klonlanması	Mayalarda üretilmeli; bakterilerde kullanılamaz
Ti vektörleri (dairesel)	Kullanılan Ti vektörün türüne bağlı olarak değişir	Bitkilerde gen transferi	Kullanımı bitki hücreleriyle sınırlı; restriksiyon bölgeleri rastgele dağıtılmış; vektörün büyüklüğü kolay manipülasyona engel

Bakteriyofaj vektörleri

Bakteriyofaj lamda (λ) klonlamada kullanılan ilk faj vektörlerinden biridir. λ kromozomu yaklaşık olarak 49 kb boyunda ve doğrusal bir yapıdadır. Klonlanmış DNA, λ kromozomunun merkezindeki restriksiyon bölgesine yerleştirilir. Rekombinant kromozomlar, *in vitro* olarak viral parçacıklar halinde paketlenir ve bu fajlar petriyi tamamen kaplamış *E. coli*'leri enfekte etmede kullanılır. Her bir λ kromozomunun sonunda 12 nükleotidlik çift halinde yapışkan bir bölge (COS) bulunur. λ konukçu *E. coli*'yi enfekte ettiğinde, λ kromozomu COS bölgesini kullanarak dairesel hale geçer ve replike olur. Bakteriyofaj λI **litik döngü** olarak bilinen bir süreç yoluyla replike olur. λ daha çok viral parçacık oluşturmak için replike oldukça, enfekte *E. coli* kolonileri parçalanır (lizizin anlamı parçalamak, ayırmaktır). Ölü bakterilerden oluşan alanlar **plak** adı verilen zonlar oluşturur ve buralar *E. coli*'nin parçalanmadığı alanlardan daha berrak olarak ayırt edilirler. Her bir plak milyonlarca rekombinant faj partikülü bulundurur. Bu vektörler, plazmidlerde sonuç alınamayan büyük (yaklaşık 25 kb'a kadar) DNA parçacıklarının klonlanmasına olanak sağlar. Faj vektörleri günümüzde çok yaygın değildir.

Kozmid vektörler

Kozmid vektörler λ DNA'sının COS ucu, bir plazmid replikasyon orijini ve antibiyotik dayanıklılık genleri içerir. Ancak viral genlerin pek çoğunu içermez. DNA, restriksiyon alanına klonlanır ve kozmid bakteriyofaj vektörlerinde olduğu gibi viral parçacıklar halinde paketlenerek *E. coli*'yi enfekte etmek için kullanılır. Kozmidler düşük-kopya-sayılı plazmidler gibi replike olurlar. Petride bakteri kolonileri oluşur ve rekombinantlar antibiyotik seleksiyonuyla taranır. 20-45 kb'lık DNA parçacıklarının klonlanmasına olanak tanıması, kozmidlerin üstünlüklerinden biridir. Ancak faj vektörlerinde olduğu gibi, daha üstün özelliklere sahip vektör tiplerinin geliştirilmesi kozmid vektörlerinin geniş çapta kullanımını sınırlamaktadır.

Ekspresyon vektörleri

Protein **ekspresyon vektörleri** DNA'nın plazmide yerleştirildiği yere bitişik bir prokaryotik promotör dizisine sahip oldukları için, bakteri hücrelerindeki ökaryotik proteinlerin yüksek-düzeyde sentezine (ekspresyonuna) olanak sağlarlar. Bakteri RNA polimerazı, promotöre bağlanarak, daha sonra proteine çevrilecek olan büyük miktarlarda RNA'yı (klonlanmış DNA parçası için) sentezleyebilir. Protein daha sonra 4. Bölümde tanımlanan yöntemler yardımıyla elde edilir. Ancak bakterilerde her zaman fonksiyonel bir proteinin ifadesi mümkün olmayabilir. Örneğin bakteri ribozomları bazen ökaryotik mRNA dizilerini çeviremeyebilir. *E. coli* hücresinde bir protein üretildiğinde, ökaryotik hücrelerde olduğu şekilde (organeller yardımıyla proteinlerin katlanması ve değiştirilmesi) katlanmayabilir veya doğru bir şekilde işlenmeyebilir. Ayrıca bakterilerdeki rekombinant ürünler, *E. coli*'lerin çoğu kez protein salgılamaması nedeniyle, problem oluşturabilir. Bu nedenle çoğu kez ekspresyon vektörleri için protein salgılamaya daha uygun olan *Bacillus subtilis* kullanılır.

Bazı durumlarda, konak bakteri rekombinant proteinleri yabancı olarak algılar ve yıkımlarken, başka durumlarda ifade edilen protein konak için ölümcüldür. SV40 gibi bazı virüsler ekspresyon vektörlerinin memeli hücrelerine yollanmasında kullanılabilirler. SV40'tan köken alan vektörler, yüksek-düzeyde transkripsiyon için güçlü bir viral promotör ve sentezlenen mRNA'ların 3′ ucuna çoklu(A) kuyruğu eklenebilmesi için, bir çoklu(A) ekleme sinyali bulundururlar. Bu vektörlerin değişik tipleri insanlarda gen terapisinde kullanılmaktadır.

Bakteri yapay kromozomları

Bakteri yapay kromozomları (BAC'lar), büyük hücrede bir ilâ iki kopya sayısına sahip düşük-kopya-sayılı plazmidlerdir. BAC'lar, F faktörünü (bakteriyel replikasyonu kontrol eden gen birimi) kodlar. BAC'lar, 100-300 kb aralığındaki DNA parçalarının yerleştirilmesine olanak sağlar ve İnsan Genom Projesinde insan kromozomlarının büyük parçalarının dizi analizi ve klonlanmasında yaygın olarak kullanılmıştır.

Maya yapay kromozomları

Maya yapay kromozomları (YAC'lar), *E. coli*'de çoğalan küçük plazmidlerdir ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya hücrelerine sunulurlar. YAC'lar ökaryotik kromozumun minyatür sürümleridir. Replikasyon orijini, seçilebilir markörler, iki telemor ve YAC'ın replikasyonunu ve hücre bölünmesi sırasında iki hücreye ayrılmasını mümkün kılan bir sentromere sahiptirler. Yabancı DNA parçacıkları YAC'ın merkezinde bulunan bir restriksiyon bölgesine klonlanır. 200 kb'den yaklaşık 2 megabaza (mb = 1 milyon baz) kadar büyüklükte olan büyük DNA parçalarının klonlanmasında kullanılırlar. BAC'lar gibi YAC'lar da İnsan Genom Projesindeki klonlama çalışmalarında önemli rol oynamıştır.

Ti vektörleri

Ti vektörleri *Rhizobium radiobacter* (önceden *Agrobacterium tumefaciens* olarak adlandırılmaktaydı, genom verilerine dayanarak yeniden adlandırılmıştır) adlı bakteriden elde edilen, 200 kb boyutlarında, doğal olarak bulunan plazmidlerdir. *Rhizobium radiobacter* toprakta yaşayan bir bitki patojeni olup, meyve ağaçlarında kök kanseri hastalığına neden olur. *R. radiobacter* konak bitkilere girdiğinde, Ti (Ti tümör tetikleyici=inducing anlamında) plazmidinden bir

DNA parçası (T-DNA) konukçu kromozomuna yerleşir. T-DNA kodladığı oksin adlı bir hormonla konukçu hücre duvarını zayıflatır. Enfekte bitki hücreleri bölünür ve tümör oluşturarak büyürler. Bitki genetikçileri Ti plazmidinden oksin ve diğer ölümcül genleri uzaklaştırabilirlerse, ortaya çıkan vektörün bitki hücrelerine gen yollanmasında kullanılabileceğini fark ettiler. 6. Bölümde Ti vektörlerinin bitki hücrelerine gen transferinde yaygın olarak kullanıldığını öğreneceksiniz.

Şu ana kadar değişik vektör tiplerini ve kullanım alanlarını anlattık. Şimdi bilim insanlarının rekombinant DNA teknolojisi kullanarak ilgilenilen genleri nasıl klonladıkları ve tanımladıklarını öğreneceksiniz.

3.3 İlgilenilen Geni Nasıl Tanır ve Klonlarsınız?

Rekombinant DNA molekülünü oluşturmak üzere değişik DNA parçacıklarının kesilip yapıştırılması moleküler biyolojide rutin bir uygulama haline gelmiştir. Şu ana kadar anlattığımız klonlama teknikleri DNA parçacıklarının restriksiyon enzimleri ile kesildiği yerlere dayanan *rastgele* bir klonlamaya izin vermekte, ancak tek bir genin veya DNA parçasının kesin olarak hedef alınması ve klonlanmasına izin vermemektedir. Örneğin insülin genini klonlamayı amaçlamışsanız, pankreastan DNA elde eder, enzimlerle keser, daha sonra parçalanan DNA'yı plazmide bağlarsınız. Bu yolla sadece insülin genini içeren tek bir rekombinant plazmid değil yüz binlerce rekombinant plazmid oluşturursunuz.

Moleküler biyologlar bu yaklaşıma "shotgun" klonlama adını verirler. Shotgun klonlamada birçok parçacık tek seferde rastgele klonlanır ve hiçbiri gen klonlama için özel olarak hedeflenmez. Hangi rekombinant plazmidin insülin geni olduğunu nasıl anlarsınız? Ayrıca insülin geni, (veya yakın diziler) kullandığınız restriksiyon enzimleri için kesim yerleri içermiyorsa, insülin geni içeren rekombinant plazmid elde edemeyebilirsiniz. İnsülin geni içeren bir plazmid oluşturursanız bile, bunu diğer rekombinant plazmidlerden nasıl ayırt edebilirsiniz? Bu durumda sadece çalışmak istediğiniz belirli bir geni nasıl bulabilir ve klonlarsınız? Bu sorular çoğu kez DNA kütüphaneleri kullanan klonlama yaklaşımları ile yanıtlanabilmektedir.

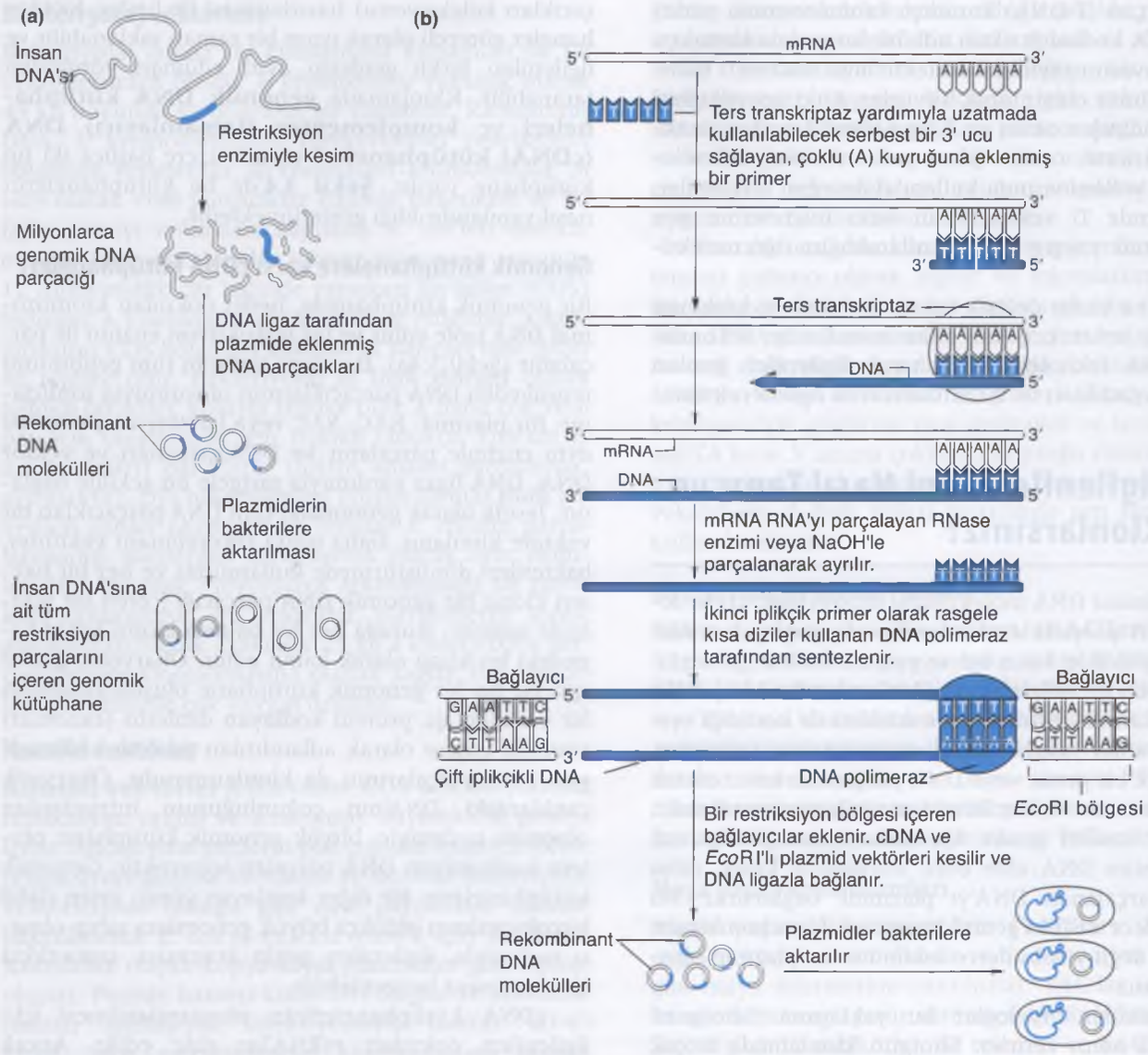
DNA Kütüphaneleri Oluşturma: Klonlanmış Gen Koleksiyonlarının Derlenmesi

Klonlama stratejilerinin çoğu bir **DNA Kütüphanesi** (belirli bir canlıdan elde edilen klonlanmış DNA parçacıkları koleksiyonu) hazırlanması ile başlar. Kütüphaneler göreceli olarak uzun bir zaman saklanabilir ve ilgilenilen farklı genlerin ayırt edilmesi yönünden taranabilir. Klonlamada **genomik DNA kütüphaneleri** ve **komplementer (tamamlayıcı) DNA (cDNA) kütüphaneleri** olmak üzere başlıca iki tip kütüphane vardır. **Şekil 3.4**'de bu kütüphanelerin nasıl yapılandırıldığı gösterilmektedir.

Genomik kütüphanelere karşı cDNA kütüphaneleri

Bir genomik kütüphanede, hedef dokudan kromozomal DNA izole edilir ve bir restriksiyon enzimi ile parçalanır (Şekil 3.4a). Bu süreç canlının tüm genomunu temsil eden DNA parçacıklarının oluşumuyla sonuçlanır. Bir plazmid, BAC, YAC veya bakteriyofaj vektörü aynı enzimle parçalanır ve DNA parçaları ve vektör DNA, DNA ligaz yardımıyla rastgele bir şekilde bağlanır. Teorik olarak genomdaki tüm DNA parçacıkları bir vektöre klonlanır. Daha sonra rekombinant vektörler, bakterileri dönüştürmede kullanılırlar ve her bir bakteri klonu bir genomik DNA parçacığı içeren bir plazmide sahiptir. Burada her bir bakteri klonu kütüphanedeki bir kitap olarak kabul edilir. Ökaryotik genler için bu tip bir genomik kütüphane oluşturulmasının bir dezavantajı, protein kodlayan dizilerin (ekzonlar) yanında intron olarak adlandırılan protein kodlamayan DNA parçalarının da klonlanmasıdır. Ökaryotik canlılardaki DNA'nın çoğunluğunun intronlardan oluşması nedeniyle, birçok genomik kütüphane protein kodlamayan DNA parçaları içerecektir. Genomik kütüphanelerin bir diğer kısıtlayıcı yönü; insan dâhil birçok canlının oldukça büyük genomlara sahip olması nedeniyle, ilgilenilen genin aranması, samanlıkta iğne aramaya benzetilebilir.

cDNA kütüphanelerinin oluşturulabilmesi için ilgilenilen dokudan mRNA'lar elde edilir. Ancak mRNA direkt olarak restriksiyon enzimleri ile kesilemeyeceği için öncelikle çift iplikçikli DNA molekülüne dönüştürülmelidir. **Ters transkriptaz (RT)** olarak adlandırılan bir enzim mRNA'nın çift iplikçikli DNA'ya sentezlenmesini katalize eder (Şekil 3.4b). **Retrovirüsler**den elde edilen bu enzim genetik bilgi akışında kural dışılık oluşturduğundan bu şekilde adlandırılmıştır. Retrovirüsler, RNA oluşturmak için bir DNA genomuna sahip olmak yerine, RNA genomuna sahiptirler. Konak hücreyi enfekte ettikten sonra RT, RNA'yı DNA'ya dönüştürür ve virüsün replikasyonu mümkün hale gelir. AIDS (kazanılmış immün yetmezlik sendromu) hastalığı etkeni insan immün yetmezlik virüsü (HIV), bir retrovirüstür. 11. Bölümde retrovirüslerin gen terapisi vektörleri olarak biyoteknolojide önemli bir yere sahip oldukları tartışılacaktır. RT, DNA'yı mRNA'nın tam bir kopyası olarak sentezleyebildiği için, DNA **komplementer DNA (cDNA)** olarak adlandırılır. mRNA alkalik solüsyonlar veya



ŞEKİL 3.4 İnsan Genomik DNA ve cDNA Kütüphanelerinin Karşılaştırılması (a) İnsan DNA'sı restriksiyon enzimleri ile plazmid veya diğer vektörlere klonlanmak üzere daha küçük parçalara kesilir. Bir (insan) genomik kütüphane her biri insan DNA'sının farklı bir parçasını içeren bakterilerin bir koleksiyonundan oluşur. Teorik olarak genomdaki tüm DNA'nın kütüphanede temsil edildiği kabul edilir. (b) Bir cDNA kütüphanesinde, mRNA ters transkriptaz enzimiyle cDNA'ya dönüştürülür. Restriksiyon bölgesi içeren bağlayıcılar yapışkan uçlar oluşturmak için cDNA'ya eklenir. Artık cDNA daha sonra bir bakteride çoğaltılmak üzere bir plazmidde klonlanabilir.

enzimlerle kesilir. Daha sonra çift iplikçikli cDNA'yı oluşturmada, ikinci iplikçiğin sentezlenmesi için DNA polimeraz kullanılır.

cDNA dizilerinin her iki uçlarında uygun bir restriksiyon bölgesi bulunma koşulu olmadığından, genellikle cDNA uçlarına *bağlayıcı diziler* olarak adlandırılan DNA dizileri enzimatik olarak eklenir. Bağlayıcılar, restriksiyon bölgelerine sahiptirler. Farklı bağlayıcılar için farklı restriksiyon bölgeleri ticari olarak sağlanabilmektedir. Bağlayıcıların eklenmesiyle cDNA, seçilen vektörün (çoğu kez plazmid) uygun bir restriksiyon bölgesine bağlanabilir. Rekombinant plazmid daha sonra bakterinin transformasyonunda kullanılır.

mRNA'nın izole edildiği hücre ve dokuların aktif olarak ifade edilen genlerinden oluşması, cDNA

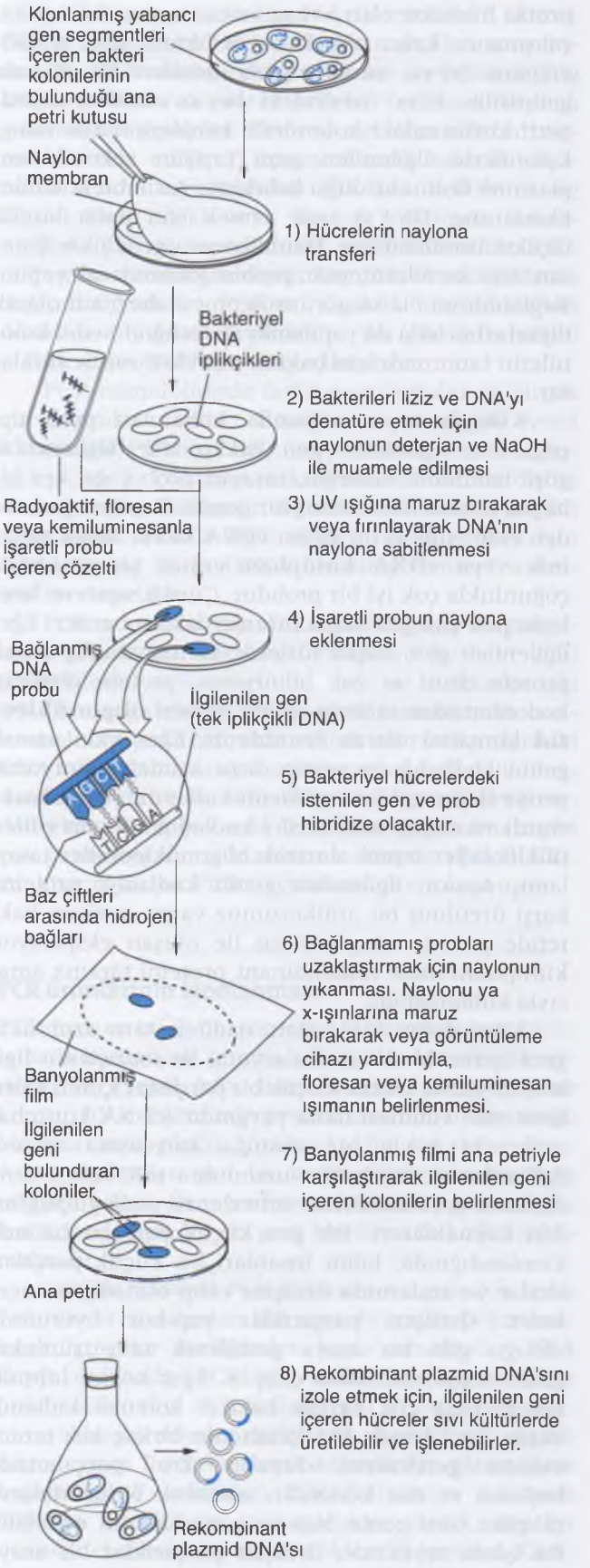
kütüphanelerinin genomik kütüphanelere karşı en önemli üstünlüğüdür. Ayrıca cDNA kütüphanesinde intronlar bulunmaz. Buna karşın, intron ve ekzonları içeren genomik kütüphaneler bir bakteriye klonlandığında, hücreler DNA'dan intronları uzaklaştırarak mRNA'yı kopyalayamaz ve bütünleştiremez. Bu nedenle bir genin klonlanması ve ifade edilmesi söz konusu olduğunda cDNA kütüphaneleri tercih edilirler.

cDNA kütüphanelerinin bir diğer üstün yanı, bir dokuda sadece belirli koşullarda ifade edilen genleri izole etme amacıyla oluşturulabilmesi ve taranabilmesidir. Örneğin bir gen, bir dokuda sadece bir hormonun uyarımıyla ifade ediliyorsa, araştırıcılar hormona duyarlı genlerin klonlanma şansını arttırmak için kütüphaneleri hormon uyarımlı hücrelerden oluştururlar. Kütüphaneler moleküler biyolojinin rutin bir uygulaması haline gelmişlerdir. Birçok şirket farklı türlerin değişik dokularından hazırlanmış kütüphaneleri pazarlamaktadırlar. cDNA kütüphanelerinin bir dezavantajı bol miktarda mRNA içeren bir kaynak doku yoksa oluşturulmaları ve taranmalarının güç olmasıdır. Ancak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) olarak öğreneceğiniz bir teknik sayesinde bu problem genellikle çözülebilmektedir.

Kütüphane taranması

Bir genomik ya da cDNA kütüphanesi, ilgilenilen genin tanımlanması amacıyla taranmalıdır. En yaygın kütüphane tarama tekniklerinden biri **koloni hibridizasyonu**dur (**Şekil 3.5**). Koloni hibridizasyonunda, kütüphaneleri rekombinant DNA olarak içeren bakteri kolonileri agar içeren bir petri kutusunda üretilir. Petrinin üzerine naylon veya nitroselülöz bir membran örtülür ve bazı bakteri hücreleri petride bulundukları yöne göre membrana yapışırlar. Eğer bakteriyofaj vektörleri kullanılıyorsa fajlar naylona aktarılırlar. Naylon, bakterileri eritmek ve üzerine bağlanan tek-iplikçi DNA'ları denatüre etmek için alkalin bir solüsyonla işlem görür. Daha sonra naylon, bir DNA **prob**uyla (ilgilenilen genin tamamlayıcısı tek iplikçikli bir DNA parçası) inkübe edilir. Problar radyoaktif bir nükleotid veya daha yaygın olarak floresan bir boya ile etiketlenir. Böylece ışık-yayan **(kemiluminesan)** reaksiyonların katalize edilmesinde kullanılabilirler. Etiket, probun bağlandığı yerin belirlenmesini sağlar. Probun naylondaki tamamlayıcı diziye bağlandığı bu sürece **hibridizasyon** adı verilir.

Naylon, daha sonra bağlanmamış fazla probları uzaklaştırmak için yıkanır ve **otoradyografi** olarak adlandırılan bir süreçte fotoğraf filmine maruz bırakılır. Probun naylona bağlandığı her yerde ışımaya bağlı olarak filmde gümüş tanecikler ortaya çıkar. İlgilenilen genin bulunuş miktarına bağlı olarak,



ŞEKİL 3.5 Koloni Hibridizasyonu: Klonlanmış İlgilenilen bir Geni Tanımlamak için DNA Probuyla Kütüphane Taraması

probla hibridize olan birkaç koloni saptanabilir. Film, çalışmanın kalıcı olarak kaydedilmesi için otoradyogram (veya otoradyograf) denilen bir işlemle geliştirilir. Film üzerindeki beyaz alanlar orijinal petri kutusundaki kolonilerle karşılaştırılarak hangi kolonilerin ilgilenilen geni taşıyan rekombinant plazmidi bulundurduğu belirlenir. Artık bu koloniler klonlanmış DNA'yı izole etmek için daha büyük ölçekte üretilebilirler. Hibridizasyon genellikle floresan veya kemiluminesan problar kullanılarak yapılır. Bağlanan probların görüntülenmesi alternatif olarak dijital cihazlarla da yapılabilir ve fotoğraf hedef kolonilerin tanınması için bakteri petri kutusu ile hizalanır.

Kütüphane taramasında kullanılan prob tipi çoğu kez ilgilenilen gen hakkındaki bilgilerimize göre belirlenir. Örneğin, tarayıcı prob çoğu kez bir başka türden klonlanmış bir gendir. Sıçan veya fareden elde edilmiş bir genin cDNA klonu insan genomik veya cDNA kütüphanelerinin taranmasında çoğunlukla çok iyi bir probdur. Çünkü sıçan ve farelerin pek çok gen dizisi insanlardakine benzer. Eğer ilgilenilen gen, başka türlerde klonlanmamış ancak protein dizisi az çok biliniyorsa, protein dizisinin kodonlarından tahmin edilen bir seri **oligonükleotid** kimyasal olarak sentezlenir. Eğer klonlanacak genin kodladığı proteinin dizisi kısmen biliniyorsa, geriye doğru çalışma yöntemi kullanılır (work backward) ve amino asit dizisini kodladığı tahmin edilen nükleotidler temel alınarak oligonükleotidler tasarlanır. Ayrıca, ilgilenilen genin kodladığı proteine karşı üretilmiş bir antikorumuz varsa, antikor, bakteride protein ekspresyonu ile oluşan ekspresyon kütüphanesinde rekombinant proteini tarama amacıyla kullanılabilir.

Kütüphane taramaları nadiren tam-uzunlukta geni içeren klonların izolasyonu ile sonuçlanır. İlgilenilen genin sadece küçük bir parçasını içeren klonların elde edilmesi daha yaygındır (cDNA kütüphanelerinde böyle bir sonuçla karşılaşma nedeni ilgilenilen gene ait tam-uzunlukta mRNA'nın izole edilmesi veya cDNA'nın sentezlenmesinin güçlüğünden kaynaklanır). Bir gen küçük parçalar halinde klonlandığında, bilim insanları bu küçük parçaları sıralar ve aralarında örtüşme olup olmadığını incelerler. Örtüşen parçacıklar yap-boz oyununda olduğu gibi bir araya getirilerek tam-uzunlukta genin oluşturulmasına çalışılır. Eğer koloni hibridizasyonunda çok sayıda bakteri kolonisi kullanılmışsa, bu işlemde kütüphanenin birkaç kez taranmasına gereksinim duyulur. Dizi parçalarında başlama ve dur kodonları aranarak birleştirilmeye çalışılan tüm genin başı ve sonu tahmin edilebilir. Bu işlem sayesinde, örtüşen parçacıklar bir araya getirilerek, gen tümleştirilir.

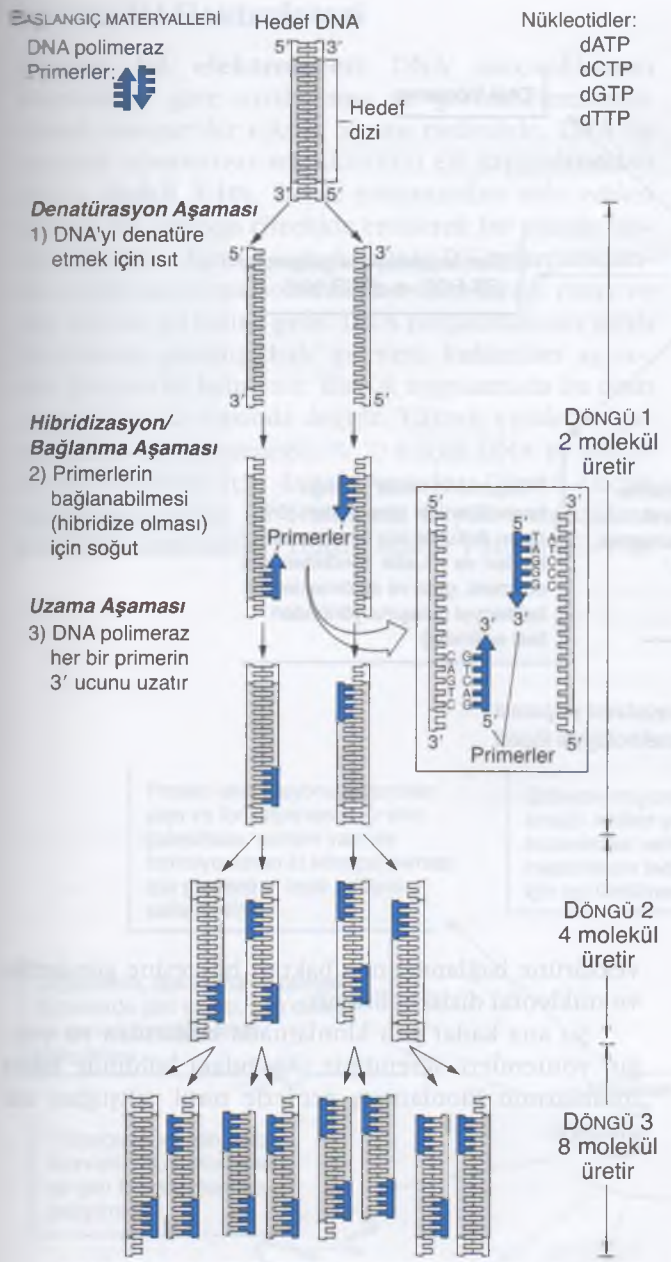
Bu bölümün sonlarında tartışacağımız tümgenom shotgun dizileme yöntemi, bilim insanlarına tüm genomu dizileme olanağı sağlar. Genomik çalışmalar sayesinde, genleri klonlamada ve tanımlamada kütüphanelerin önemi giderek azalmaktadır. Kütüphaneler kullanılarak bir veya birkaç gen tanımlanabilirken, genomik, bir genomdaki tüm gen dizilerinin belirlenmesine olanak tanımaktadır.

Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Kütüphanelerin ilgilenilen bir geni tanıma ve klonlamada yaygın ve çok etkin kullanılmasına karşın, **polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)** klonlamada kütüphanelere göre çok daha hızlı bir yaklaşımdır. PCR genlerin klonlanmasında sık tercih edilen bir teknik olmasının yanında, diğer birçok uygulama alanına da sahiptir. 1980'lerin ortalarında Kary Mullis tarafından geliştirilen PCR moleküler biyolojinin birçok alanında devrim niteliğinde etki yarattı. Mullis bu buluşuyla 1993'te Nobel Kimya Ödülünü kazandı. PCR kısa bir zaman diliminde belirli bir DNA dizisinin çoğaltılmasını veya kopyalanmasını sağlayan bir tekniktir. PCR'ın temel ilkesi oldukça basittir. Çoğaltılacak hedef DNA deoksiribonükleotidler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), tampon sıvı ve DNA polimeraz içeren ince duvarlı bir tüpün içine eklenir. Bir **primer** çifti de bu karışıma ilave edilir. Primerler 20-30 nükleotid uzunluğunda, kısa, tek zincirli DNA oligonükleotidleridir. Primerler çoğaltılacak hedef DNA'nın her iki ucuna komplementer olacak şekildedir (**Şekil 3.6**).

Reaksiyon tüpü daha sonra bir ısı döngüleyiciye yerleştirilir. En basit anlamda, ısı döngüleyici sıcaklığı kısa zaman aralıklarında hızlı bir şekilde değiştirme özelliğine sahip karmaşık yapıda bir ısıtma bloğuna sahiptir. Isı döngüleyici, örneği PCR döngüsü adı verilen bir seri reaksiyondan geçirir (Şekil 3.6). Her bir döngü üç aşamadan oluşur. Denatürasyon olarak adlandırılan ilk aşamada, reaksiyon tüpü yaklaşık 94-96 °C'ye kadar ısıtılarak hedef DNA'nın iplikçiklerinin birbirinden ayrılması sağlanır. Hibridizasyon (veya annealing) olarak adlandırılan ikinci aşamada, tüp yavaşça 55-65 °C'ye soğutulur. Soğutma işlemi, primerlerin hedef dizinin karşıt uçlarında bulunan tamamlayıcı bazlarla hidrojen bağı oluşturmasına olanak sağlar. Uzama (elongasyon) olarak adlandırılan son aşamada, sıcaklık hafifçe 70-75 °C'ye yükseltilir ve DNA polimeraz tamamlayıcı zincirin sentezlenmesi için şablon olarak kabul edilen her bir primerin 3' ucuna nükleotidleri ekler.

Bir tam döngünün sonunda hedef DNA miktarı ikiye katlanır. Isı döngüleyici bu üç aşamayı araştırıcının belirlediği bir sayıda (20-30 döngü) tekrarlar. PCR'ın en önemli üstünlüğü, çok kısa bir zaman diliminde, başlangıçta çok az miktarda olan hedef



ŞEKİL 3.6 Polimeraz Zincir Reaksiyonu

DNA'dan milyonlarca kopya çıkarma özelliğidir. Hedef DNA her bir döngüde iki katına çıktığından, 20 döngü sonra bir hedef DNA molekülünden yaklaşık olarak bir milyon kopya (2^{20}) oluşur.

PCR'ı mümkün kılan en önemli nokta reaksiyondaki DNA polimerazın tipidir. PCR için gereksinim duyulan tekrarlayan ısıtma ve soğutma işlemleri normal koşullarda DNA polimerazı birkaç döngüden sonra yıkımlayıp yok edecektir. Ancak PCR'a uygun bazı DNA polimeraz çeşitleri mevcuttur. Bu PCR enzimlerinden ilk ve en bilineni ***Taq* DNA polimeraz** olarak bilinir. *Taq* sıcak kaynak sularında yaşayabilen *Thermus aquaticus* adlı bir bakteriden elde edilir. *T. aquaticus* sıcak sularda yaşamaya uyum sağladığından (İlk kez Yellow Stone Ulusal Parkı'ndaki sıcak kaynak sularında bulunmuştur) yüksek sıcaklıklılara dayanabilen bir DNA polimeraz evrimleştirmiştir. *Taq* yüksek sıcaklıklarda değişmediğinden, PCR'ın sıcaklık farklılıklarına denatüre olmadan dayanabilir. *Taq* gibi termostabil polimerazlar, PCR için vazgeçilmezdir.

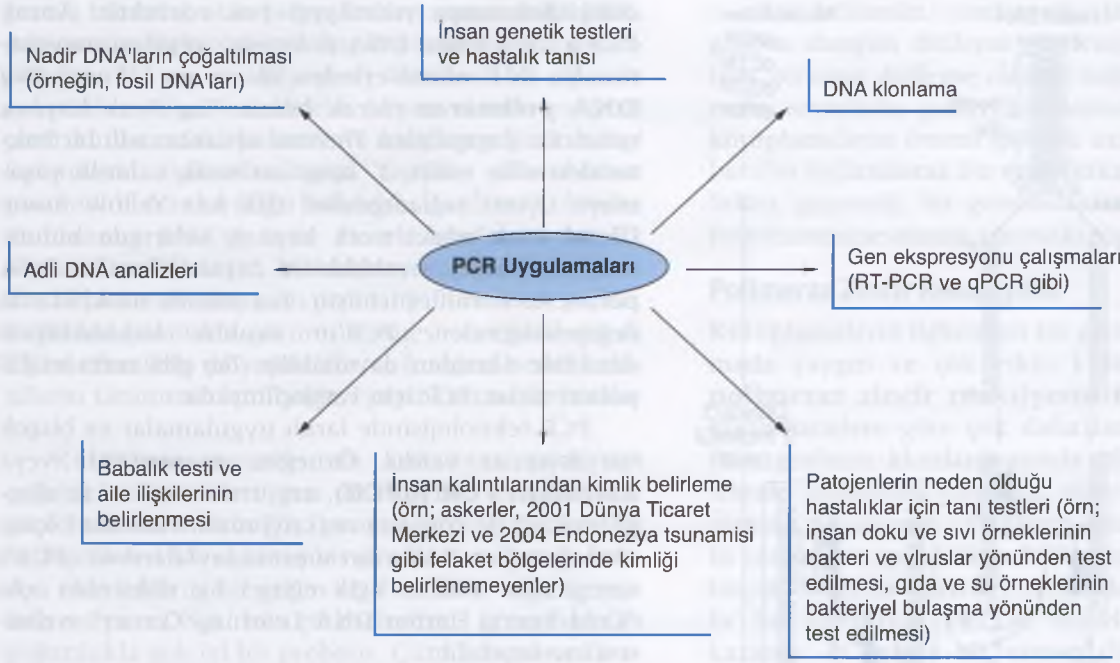
PCR teknolojisinde farklı uygulamalar ve birçok varyasyonlar vardır. Örneğin, **eş-zamanlı** veya **kantitatif PCR (qPCR)**, araştırıcılara, özel ısı döngüleyiciler ile çoğalma reaksiyonlarını anında ölçme olanağı sağlar. Bölümün sonraki sayfalarında qPCR'ı tartışacağız. PCR'la ilgili eğitsel bir doküman için "Cold Spring Harbor DNA Learning Center" websitesi incelenebilir.

PCR araştırma, tıp, DNA problarının oluşturulması, gen ifadesi, bakteriyel enfeksiyonlarda ve viral patojenlerin saptanmasında, çok az miktarlardaki DNA'nın çoğaltılmasında, genetik hastalıkların tanısında, olay yerinden elde edilen eser miktarlardaki DNA'nın çoğaltılmasıyla polisiye olaylarda delil oluşturulmasında ve hatta fosilleşmiş dinozor dokularından elde edilen çok eski DNA'ların çoğaltılması gibi çok geniş uygulama alanlarına sahiptir (**Şekil 3.7**). Bu kitapta birçok PCR uygulaması tanımlanmıştır.

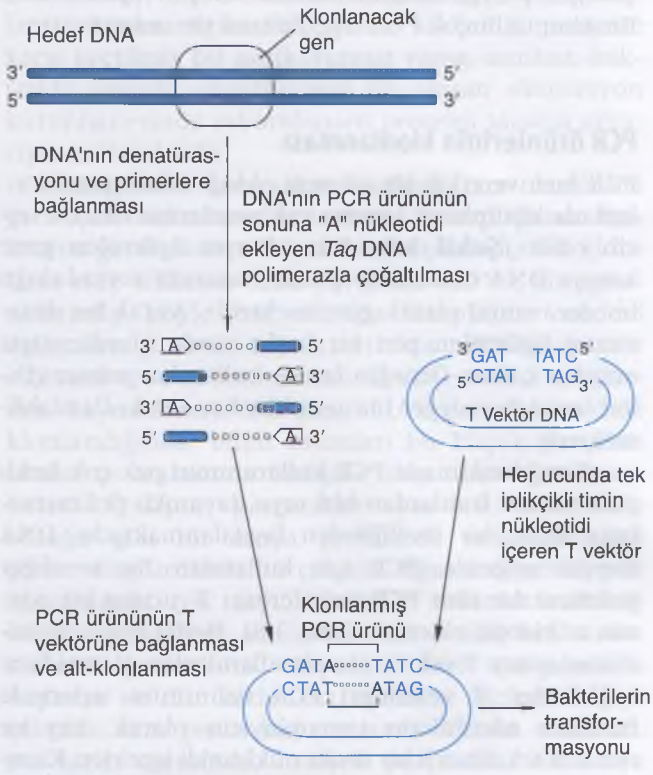
PCR ürünlerinin klonlanması

PCR hızlı ve etkili bir yöntem olduğundan, gen klonlamada kütüphane tarama yaklaşımlarına sıklıkla tercih edilir (**Şekil 3.8**). Buna karşın ilgilenilen gene komşu DNA dizilerinde primer tasarımı zorunluluğu bir dezavantaj olarak görülmektedir. Ancak bu dezavantaj ilgilenilen gen bir başka türde klonlanmışsa ortadan kalkar. Örneğin farede kullanılan primer çiftleri insanda eşdeğer bir geni klonlamada kullanılabilmektedir.

Gen klonlamada PCR kullanımının pek çok farklı yolu vardır. Bunlardan biri ısıya dayanıklı polimerazların ilginç bir özelliğinden faydalanmaktadır. DNA kopyalandığında, PCR için kullanılan *Taq* ve diğer polimerazlar tüm PCR ürünlerinin 3′ ucuna bir adenin nükleotid eklerler (Şekil 3.8). Hedef gen çoğaltıldıktan sonra T vektör olarak adlandırılan plazmidlere bağlanırlar. T vektörleri PCR ürününün uçlarında bulunan adeninlerin tamamlayıcısı olarak, her bir ucunda tek zincirli bir timin nükleotidi içerirler. Klonlanmış PCR ürününü içeren rekombinant plazmid T



ŞEKİL 3.7 PCR Uygulamaları DNA'nın PCR yoluyla çoğaltılması geniş uygulama yelpazesi ile moleküler biyolojide önemli bir yöntem haline gelmiştir. Şekilde biyoteknolojiyle ilişkili daha yaygın uygulamaların bazı örnekleri sunulmuştur.



ŞEKİL 3.8 Bir Genin PCR'la Klonlanması

vektörüne bağlandığında bakteri hücresine gönderilir ve nükleotid dizisi belirlenir.

Şu ana kadar gen klonlamada kullanılan en yaygın yöntemleri öğrendiniz. Aşağıdaki bölümde bilim insanlarının klonlanmış genlerle nasıl çalıştığını ele alacağız.

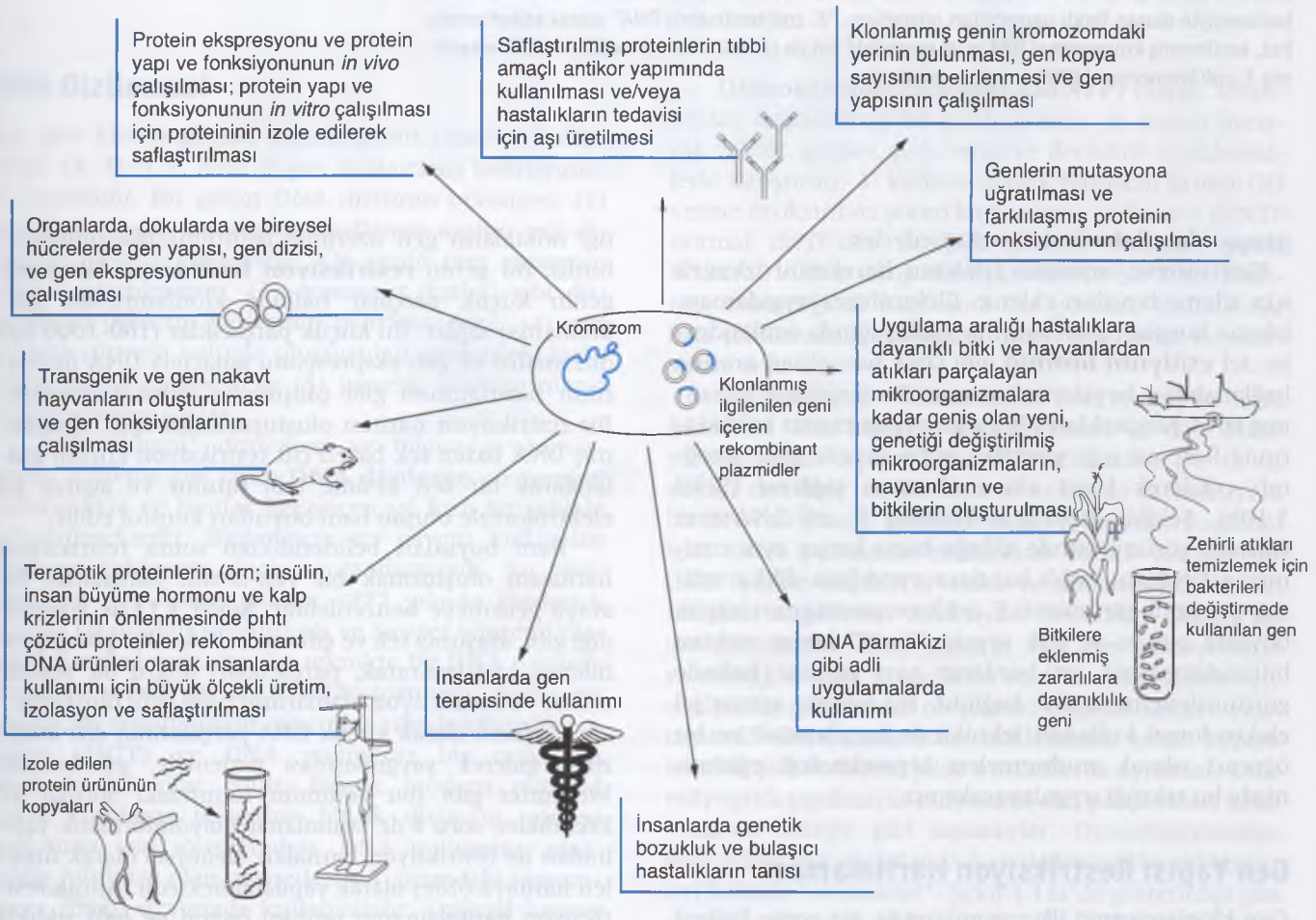
3.4 Rekombinant DNA Teknolojisi Laboratuvar Teknikleri ve Uygulamaları

DNA'yı neden klonlarız? Klonlanmış bir genle neler yapabiliriz? Gen klonlama ve rekombinant DNA teknolojisinin ileriki bölümlerde anlatılacak olan birçok uygulaması vardır (**Şekil 3.9**). Bu bölümde, önemli bazı rutin moleküler biyoloji teknikleri ile temel gen klonlama uygulamalarından söz edeceğiz.

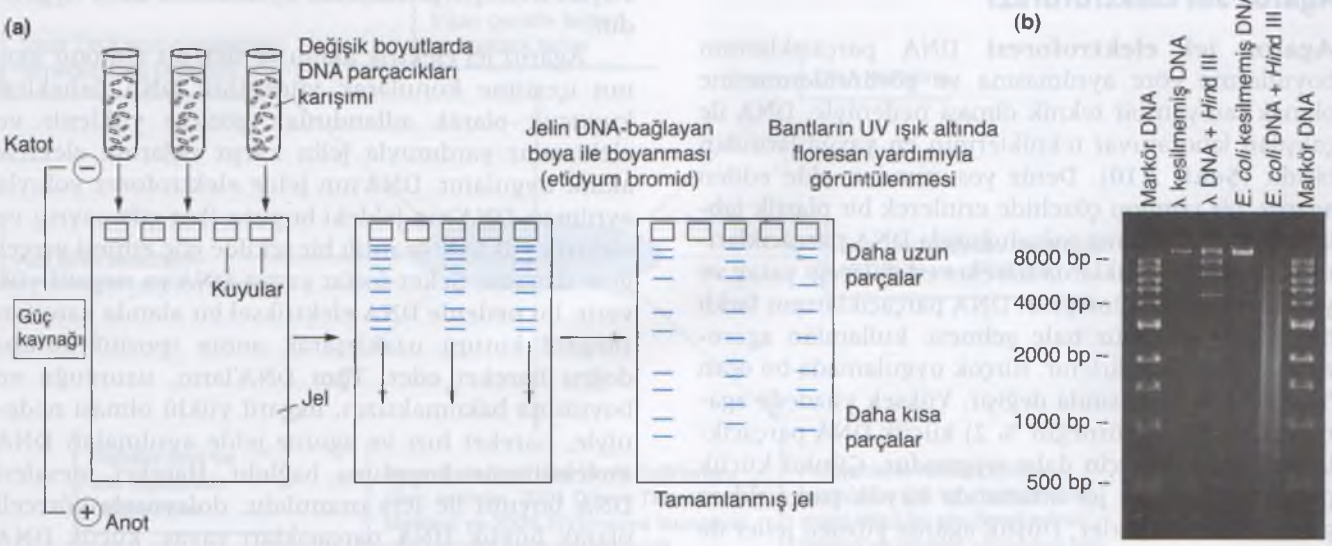
Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel elektroforezi DNA parçacıklarının boyutlarına göre ayrılmasına ve görüntülenmesine olanak tanıyan bir teknik olması nedeniyle, DNA ile çalışılan laboratuvar tekniklerinin en yaygınlarından biridir (**Şekil 3.10**). Deniz yosunundan elde edilen agaroz, bir tampon çözeltide eritilerek bir plastik tablaya dökülür. Agaroz soğuduğunda DNA parçacıklarının küçük kuyucuklarda hareket edebileceği yatay ve yarı katı bir jel haline gelir. DNA parçacıklarının farklı boyutlarda görünür hale gelmesi, kullanılan agarozun yüzdesi ile belirlenir. Birçok uygulamada bu oran % 0,5 ilâ % 2 arasında değişir. Yüksek yüzdede agaroz içeren bir jel (örneğin % 2) küçük DNA parçacıklarının ayrılması için daha uygundur. Çünkü küçük parçacıklar yoğun jel ortamında büyük parçacıklara göre daha hızlı ilerler. Düşük agaroz yüzdeli jeller de büyük DNA parçacıklarının ayrılmasına daha uygundur.

Agaroz jel elektrik akımı verilen bir tampon sıvının içerisine konularak yürütülür. DNA örnekleri kuyucuk olarak adlandırılan gözlere yüklenir ve elektrotlar yardımıyla jelin karşıt uçlarına elektrik akımı uygulanır. DNA'nın jelde elektroforez yoluyla ayrılması DNA'nın jeldeki boyutu (baz çifti sayısı) ve elektrik yüküyle orantılı bir şekilde göç etmesi gerçeğine dayanır. Şeker-fosfat yapısı DNA'ya negatif yük verir; bu nedenle DNA elektriksel bir alanda katottan (negatif kutup) uzaklaşarak anota (pozitif kutup) doğru hareket eder. Tüm DNA'ların, uzunluğu ve boyutuna bakılmaksızın, negatif yüklü olması nedeniyle, hareket hızı ve agoroz jelde ayrılmaları DNA molekülünün boyutuna bağlıdır. Hareket mesafesi DNA boyutu ile ters orantılıdır, dolayısıyla göreceli olarak büyük DNA parçacıkları yavaş, küçük DNA



ŞEKİL 3.9 Rekombinant DNA Teknolojisi Uygulamaları



ŞEKİL 3.10 Agaroz Jel Elektroforezi (a) DNA parçacıkları agaroz jel elektroforezi ile ayrılır ve görselleştirilebilir. (b) Etidyum bromid ile boyanmış bir agaroz jel fotoğrafı. "Markör DNA" olarak gösterilen hatta ticari olarak hazırlanmış DNA boyut standartları yüklenmiştir. Bu boyutu bilinen parçalar analiz edilen deneysel örnek DNA'sının boyutlarını belirlemede merdiven olarak kullanılır. "λ Kesilmemiş DNA" hattı yüksek moleküler ağırlıkta kesilmemiş faj λ kromozomal DNA'sını gösteriyor; "λ DNA + *Hin*dIII" hattı λ DNA'nın restriksiyon enzimi *Hin*dIII tarafından kesilmesiyle oluşan farklı parçacıkları gösteriyor. "*E. coli* kesilmemiş DNA" olarak etiketlenmiş hat, kesilmemiş kromozomal DNA'yı ve yanındaki hat da (*E. coli* DNA + *Hin*dIII) *Hin*dIII'le kesilmiş *E. coli* kromozomal DNA'sını göstermektedir.

parçacıkları daha hızlı hareket ederler.

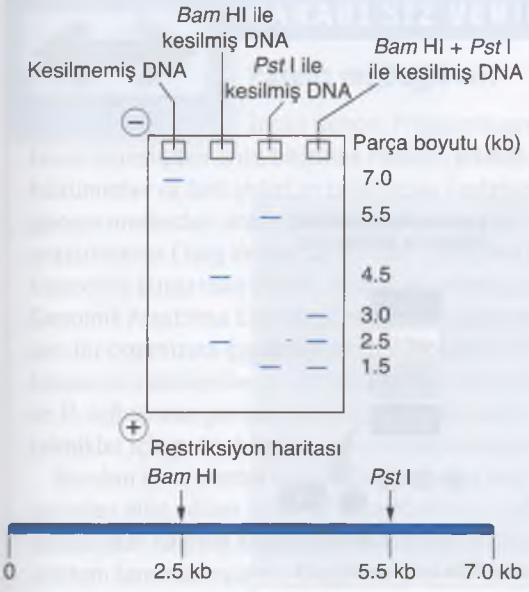
Elektroforez sırasında DNA'nın hareketini izlemek için izleme boyaları eklenir. Elektroforez uygulaması, izleme boyaları jelin sonuna yaklaştığında sonlandırılır. Jel **etidyum bromid** gibi DNA baz çiftleri arasına bağlanabilen boyalarla boyanır. Bu boyalarla boyanmış DNA parçacıkları ultraviyole ışığa maruz kaldıklarında floresan ışığı yayarlar ve bu sayede jelin fotoğrafı çekilerek kayıt altına alınması sağlanır (Şekil 3.10b). Şekilde *Hin*dIII'le kesilmiş *E. coli* DNA'sının sürüntü görünümünde olduğu buna karşın aynı enzimin λ DNA'sını farklı bantlara ayırdığına dikkat ediniz. Sürüntü görünümü *E. coli* kromozomunun büyük boyutta olması ve çok sayıda *Hin*dIII kesim noktası bulundurmasına ve bunların ayrı bantlar halinde görüntülenememesine bağlıdır. Bu kitapta agaroz jel elektroforezi kullanan tekniklerle karşılaşacak ve bir öğrenci olarak muhtemelen biyoteknoloji eğitiminizde bu tekniği uygulayacaksınız.

Gen Yapısı Restriksiyon Haritalaması

Gen klonlamasının ilk zamanlarında, bir genin fiziksel haritası basit olarak restriksiyon enzimlerinin geni kestiği noktaların gen üzerinde belirtilmesiyle oluşturulurdu. Bir genin **restriksiyon haritası**nın bilinmesi, genin küçük parçalar halinde klonlanmasını (altklonlama) sağlar. Bu küçük parçacıklar (100-1000 bp) dizi analizi ve gen ekspresyonu amacıyla DNA problarının hazırlanması gibi çalışmaları daha basitleştirir. Bir restriksiyon haritası oluşturabilmek için, klonlanmış DNA bazen tek bazen çift restriksiyon enzimi kullanılarak bir seri kesime tabi tutulur ve agaroz jel elektroforezle oluşan bant boyutları kontrol edilir.

Bant boyutları belirlendikten sonra restriksiyon haritasını oluşturmak bir yap-bozun parçalarını bir araya getirmeye benzetilebilir. **Şekil 3.11**'de gösterildiği gibi, araştırıcı tek ve çift enzimle kesilmiş bant profillerini karşılaştırarak, parçacıkları doğru bir şekilde sıralar ve restriksiyon alanlarının haritasını oluşturur.

Göreceli olarak küçük DNA parçalarının dizi analizinin giderek yaygınlaşması nedeniyle, günümüzde Webcutter gibi (bu bölümün sonundaki Sorular ve Etkinlikler, soru 8'de tanımlanan) biyoinformatik yazılımları ile restriksiyon haritaları, deneysel olarak üretilen haritaya özdeş olarak yapılabilmektedir. Ancak restriksiyon haritalamanın tarihsel önemi ve hala sıklıkla kullanılıyor olması bu tekniği hala değerli kılmaktadır.



ŞEKİL 3.11 Restriksiyon Haritalaması *Bam*HI ve *Pst*I restriksiyon bölgelerinin yerleri 7 kb uzunluğunda bir DNA parçasında belirlendi. *Bam*HI ile kesilmesi DNA'yı 2.5 ve 4.5 kb uzunlukta iki parçaya böler. Bu DNA'nın bir ucundan 2.5 kb uzaklıkta tek bir yerden kesildiğini göstermektedir. *Pst*I DNA'yı 1.5 ve 5.5 kb'lık iki parçaya ayırır. Bu da DNA'nın bir ucundan 1.5 kb uzaklıkta tek bir yerden kesildiğini göstermektedir. Bu iki enzim kullanıldığında DNA 3.0 kb, 2.5 kb ve 1.5 kb'lık 3 parçaya ayrılır. 3.0 kb'lık parça ne *Bam*HI ne de *Pst*I tarafından tek başına oluşturulamayacağına göre, bu DNA parçası *Bam*HI ve *Pst*I kesim bölgerinin ortasında yer almaktadır. DNA parçalarından oluşan bu yapboz düzenlendiğinde, Şekil'in altında yer alan restriksiyon haritasının bu denemede oluşan DNA parçalarının deseni ile tutarlı tek harita olduğu anlaşılır.

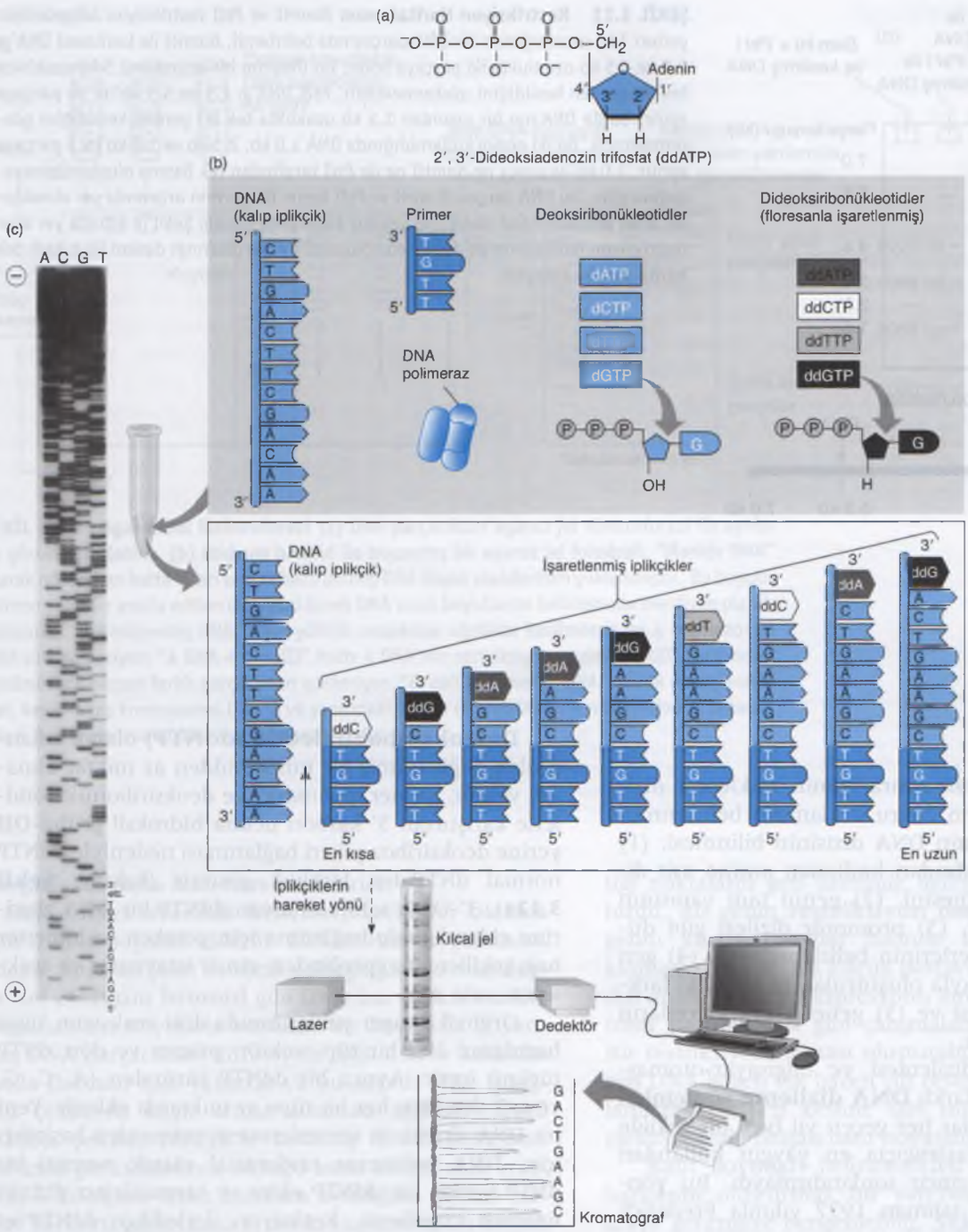
DNA Dizilemesi

Bir gen klonlandıktan sonra, genin nükleotid dizisinin (A, G, T, C'lerin doğru sıralaması) belirlenmesi önemlidir. Bir genin DNA dizisinin bilinmesi; (1) klonlanmış gen tarafından kodlanan amino asit dizisinin tahmin edilmesini, (2) genin tam yapısının ortaya çıkarılmasını, (3) promotör dizileri gibi düzenleyici öğelerin yerlerinin belirlenmesini, (4) gen uç-birleştirmesi yoluyla oluşturulan genlerdeki farklılıkların belirlenmesi ve (5) genetik mutasyonların belirlenmesini sağlar.

PCR "döngü" dizilemesi ve bilgisayar-otomasyonlu dizileme gibi farklı **DNA dizileme** yöntemleri bulunmakta ve bunlar her geçen yıl hızlı bir şekilde geliştirilmektedir. Başlangıçta en yaygın kullanılan dizileme yaklaşımı zincir sonlandırmaydı. Bu yönteme ait uygulama talimatı 1977 yılında Frederick Sanger tarafından geliştirilmiş ve Sanger yöntemi olarak adlandırılmaktadır. Bu teknikte bir DNA primeri, denatüre olmuş bir DNA kalıbı (örneğin; dizilemesi yapılacak rekombinant plazmid), deoksiribonükleotidler (dNTP) ve DNA polimeraz bir reaksiyon tüpünde hibridize edilir. Birçok modern plazmid çoklu klonlama bölgesine bitişik dizileme primeri bağlanma yeri içerdiğinden, DNA polimeraz, plazmidle hibridize olan primerlerin 3' ucundaki tamamlayıcı zinciri uzatmada kullanılabilir. Orijinal Sanger yaklaşımında primer dizilerinin işaretlenmesi radyoaktif maddelerle yapılmaktaydı.

Dideoksiribonükleotid (ddNTP) olarak adlandırılan değiştirilmiş bir nükleotidden az miktar alınarak vektör, primer, polimeraz ve deoksiribonükleotidlerle karıştırılır. 3' karbon ucuna hidroksil grubu-OH yerine deoksiriboz şekeri bağlanması nedeniyle ddNTP normal dNTP'den farklılık gösterir (bakınız **Şekil 3.12a**). 3'-OH'e sahip olmayan ddNTP bir DNA zincirine eklendiğinde bağlanma için gereken fosfodiester bağı şekillenemeyeceğinden, zincir uzayamaz ve reaksiyon sona erer.

Orijinal Sanger yaklaşımında dört reaksiyon tüpü hazırlanır. Her bir tüp, vektör, primer ve dört dNTP türünü içerir. Ayrıca bir ddNTP türünden (A, C, G, veya T den biri) her bir tüpe az miktarda eklenir. Yeni bir DNA zincirinin sentezlenmesi, primerden başladığı için, DNA polimeraz rastlantısal olarak normal bir dNTP yerine bir ddNTP ekler ve tamamlayıcı dizinin uzaması engellenir. Reaksiyon ilerledikçe ddNTP'ler sentezlenmekte olan zincirin her bir pozisyonuna eklenerek değişik boyutlarda ve dideoksi rezidüleriyle sonlanmış parçacıklar oluşturur. Orijinal Sanger yönteminde, DNA dizileri bir nükleotidlik farka duyarlı ince bir poliakrilamid jelde yürütülerek ayrılırlar. Otoradyografi yardımıyla radyoaktif dizi parçacıkları Şekil 3.12c'de olduğu gibi saptanırlar. Otoradyogramdan elde edilen dizi aşağıdan yukarı doğru nükleotid birimleri halinde "okunurlar". Şekil 3.12c'de gösterildiği gibi otoradyogramdan elde edilen dizi, vektördeki kalıp dizinin tamamlayıcısıdır.



ŞEKİL 3.12 Bilgisayar-Otomasyonlu DNA Dizileme (a) Bir dideoksinükleotidin (ddNTP) yapısı. Karbona bağlı 3′ ucunun hidroksil grubu (OH) yerine bir hidrojen olduğuna dikkat ediniz. Başka bir nükleotid bir ddNTP'ye 3′ ucundan bağlanamayacağı için bu nükleotidler Sanger yöntemiyle DNA dizilemede anahtardır (b). Bilgisayar-otomasyonlu yaklaşımlar kılcal bir jel kullanarak DNA parçalarını ayırır. Bir lazer ve dedektör dideoksinükleotidlerin yaydığı floresanı saptamada kullanılır. (c) Radyoaktif ddNTP'ler ve primerlerin kullanıldığı ve dört ayrı reaksiyonun gerçekleştirildiği orijinal dideoksi dizileme reaksiyonundan elde edilmiş bir otoradyogram. Hatlar üzerindeki harfler (A, C, G ve T) o hattaki dizileme reaksiyonunda kullanılan belirli bir ddNTP'ye karşılık gelir. Otoradyografi ile Sanger dizileme büyük ölçüde güncelliğini kaybetmiş ve yerini (b)'de ve yeni nesil dizileme teknolojilerinde gösterildiği gibi bilgisayar-otomasyonlu dizileme yaklaşımlarına bırakmıştır.



KARARI SİZ VERİN

Patent mi Değil mi?

İnsan Genom Projesinin programlanan süresinden önce bitirilme nedeni, kısmen de olsa hükümetler ve özel şirketler tarafından desteklenen genom merkezleri arasındaki rekabet olmuştur. Eski NIH araştırmacısı Craig Venter tarafından yönetilen Celera Genomics bunlardan biridir. Venter ve arkadaşları henüz Genomik Araştırma Enstitüsü'nde (TIGR) çalışırken yaşayan bir organizma genomunun (*Haemophilus influenzae*) tamamının dizilenmesini gerçekleştiren ilk araştırıcılardı ve *H. influenzae* genomu ve çözümlemede kullandıkları teknikler için patent başvurusunda bulunmuşlardı.

Bundan önce Venter ve arkadaşları insan beyin hücrelerinden elde edilen cDNA'ların rastlantısal olarak kısa parçacıklar halinde klonlanmasına olanak sağlayan bir yöntem tanımlamışlardı. **Eksprese dizi etiketleri (ESTs)** olarak adlandırılan bu kısa dizilerin, kuramsal olarak tamuzunlukta cDNA'ları tanımlamada prob olarak kullanılabilmesi mümkündü. Bazı EST'lerin daha önce klonlanmış bir gene veya bir genin bir bölümüne özdeş olduğu, ancak bazılarının yeni bir gen dizisi veya atık DNA olabileceği anlaşıldı. TIGR, Venter'in EST'leri tarafından tanınan tamuzunlukta genler için patent başvurusunda bulundu. Bu başvuru büyük bir tartışmayı da ateşledi. Örneğin:

- Araştırıcıların doğal olarak yaşayan canlılar için patent başvurusunda bulunmalarına izin verilmeli mi?
- Eğer bir patent başvurusunda bir genin yalnızca küçük bir parçası için izin verildiğinde – başvurunun yapıldığı DNA dizisinin ne işe yaradığını hiç kimse bilmese bile – bazı kişiler veya bir şirket, sadece bu yüzden ilk klonlama hakkına sahip olmak istemişse ne olur?
- Eğer klonlanmış DNA dizisinin kullanım alanı belirgin değilse ne olur?
- DNA kütüphanesi oluşturmak için gen mikroçipi kullanan araştırıcılara çalıştıkları bir canlıya ait genomun tamamı için patent hakkı verilebilir mi?
- Araştırıcılar patent hakkı aldıklarında patentlenen bilginin paylaşımında yirmi yıl süresince tekeldir. Pek çok insan, genom bilgisinin paylaşıma kapalı olmasının bilimsel ilerlemedeki bilgi paylaşımı geleneğine aykırı olduğunu düşünmektedir. Eğer patent alan grup veriyi perdeler ve bilgiyi paylaşmazsa, patentleme genlerin klonlanmasını yavaşlatır mı? Bir grup diğer grupların bir gen üzerinde çalışmasını veya ondan bir ürün elde etmesini engelleyecek şekilde patent hakkı talebinde bulunabilir mi?
- Peki ya patentini başkalarının aldığı bir genle ne yapacaklarını keşfeden bireyler?
- Genetik olarak değiştirilmiş bir canlı patentlenmeli mi? Tasarlanmış bakteriler (örneğin, çevre kirliliğinin temizlenmesinde kullanılanlar) ve transgenik hayvanlar, tıpkı beta interferon gibi klinik olarak önemli genlerde olduğu gibi patentlendiler.
- Bir genin şu an için mümkün olmayan ama gelecekte olması beklenen kullanımları için, bunları destekleyecek veriler olmasa bile, patent başvurusu yapılabilir mi?
- Eğer gen, genetik terapi geliştirilmesi olası bir hastalıkla ilgili bir dizi içeriyorsa ne olur?

ABD Patent ve Tescil Ofisi 1980 yılından bu yana 35 000'den fazla gen ve gen dizisine patent hakkı vermiş ve insan genlerinin yaklaşık % 20'si patentlenmiştir. Bazı bilim insanları ise bir DNA parçasının klonlanmasının iş yükü olarak patentlenme için çok basit kaldığını düşünmektedir. Pek çok bilim insanı, genleri keşfetmede ve çalışmada kullanılacak gen tedavisi yaklaşımları gibi yeni teknolojilere patent verilmesinin, genlerin kendisine verilmesinden daha uygun olduğunu savunmaktadırlar. Genel olarak gen patentlerinin çoğu DNA dizisinin kendisini değil, o dizi için kullanılan genetik test gibi bir teknolojiyi kapsar. Ticari bakış açısıyla ise, patentlenme bir ürünün pazara arzına kadar Ar-Ge'ye milyonlarca dolar (bazen milyarlarca dolar) harcayan özel şirketler için önemli bir mali teşvik aracıdır. Patentlenmeli mi, patentlenmemeli mi? Kararı siz verin.

Yüksek-hacimli bilgisayar otomasyonlu dizilemenin orijinal Sanger dizileme tekniğinin yerini alması

Bir dizileme jelinin yürütülmesindeki sınırlamalar nedeniyle, orijinal Sanger yöntemi ile bir reaksiyonda ancak 200-400 nükleotid okunabilmekteydi. Örneğin, 1 000 bazdan daha uzun bir DNA parçası söz konusu olduğunda birden fazla reaksiyon gerekmekteydi. Bu durumda her bir reaksiyonda elde edilen, ardı ardına örtüşecek şekilde tasarlanmış veriler 1 000 bazlık tek parça diziyi oluşturmak için bir araya getirilirdi.

Bu kısıtlamadan dolayı, Sanger dizileme yöntemi İnsan Genom Projesi gibi büyük ölçekli dizileme çalışmaları için elverişli değildi. Projenin programlanandan önce bitirilmesinin bir nedeni de **bilgisayar-otomasyonlu DNA dizileme yöntemleri**nin (bir reaksiyonda 500 bazdan daha uzun

DNA parçalarını dizileyebilen) geliştirilmesi olmuştur. Başlangıçta, bilgisayar otomasyonlu dizileme reaksiyonlarında radyoaktif olmayan ve farklı renklerde floresan boyalarla işaretlenmiş ddNTP'ler veya 5'ucunda bir boya ile işaretlenmiş dizileme primeri kullanılırdı (Şekil 3.12). Günümüzde tek bir reaksiyon tüpü kullanılmaktadır ve elle uygulanan poliakrilamit jel ve bunu izleyen otoradyografi yaklaşımı yerini kılcal jel olarak adlandırılan çok dar çaplı, tek yollu ve tüp şeklinde bir ayırt edici dizileme yöntemine bırakmıştır. DNA parçacıkları jelde ilerledikçe, bir lazer ışınıyla taranırlar. Lazer, her bir DNA parçacığının üzerinde ve her biri farklı dalga boyunda ışık yayan floresanla boyalı ddNTP'leri uyarır. Yayılan ışık bir algılayıcı tarafından toplanır ve büyütülür, daha sonra bu bilgi (ışıma desenleri) işlenmek ve dönüştürülmek üzere bir bilgisayara aktarılarak DNA dizisi ortaya çıkarılır (**Şekil 3.13**).

Otomatik DNA dizileyicileri genellikle birçok bazın ayrılmasını sağlayan, yaklaşık 30 cm uzunlukta, çoklu kılcal jeller içerir. Bu yaklaşımda bazı cihazlar her biri yaklaşık 900 bazlık dizi işleyen 96 kılcal jeli çalıştırabilmektedir. Bu cihazlarla günde 2 milyon bazlık bir dizi üretim kapasitesi mümkün hale gelmiştir. Bu dizileyiciler, kısa zaman dilimlerinde büyük miktarda diziyi işleyip üretebildikleri için, *yüksek hacimli* dizileyiciler olarak bilinmektedirler.

Yeni-Nesil Dizileme (NGS)

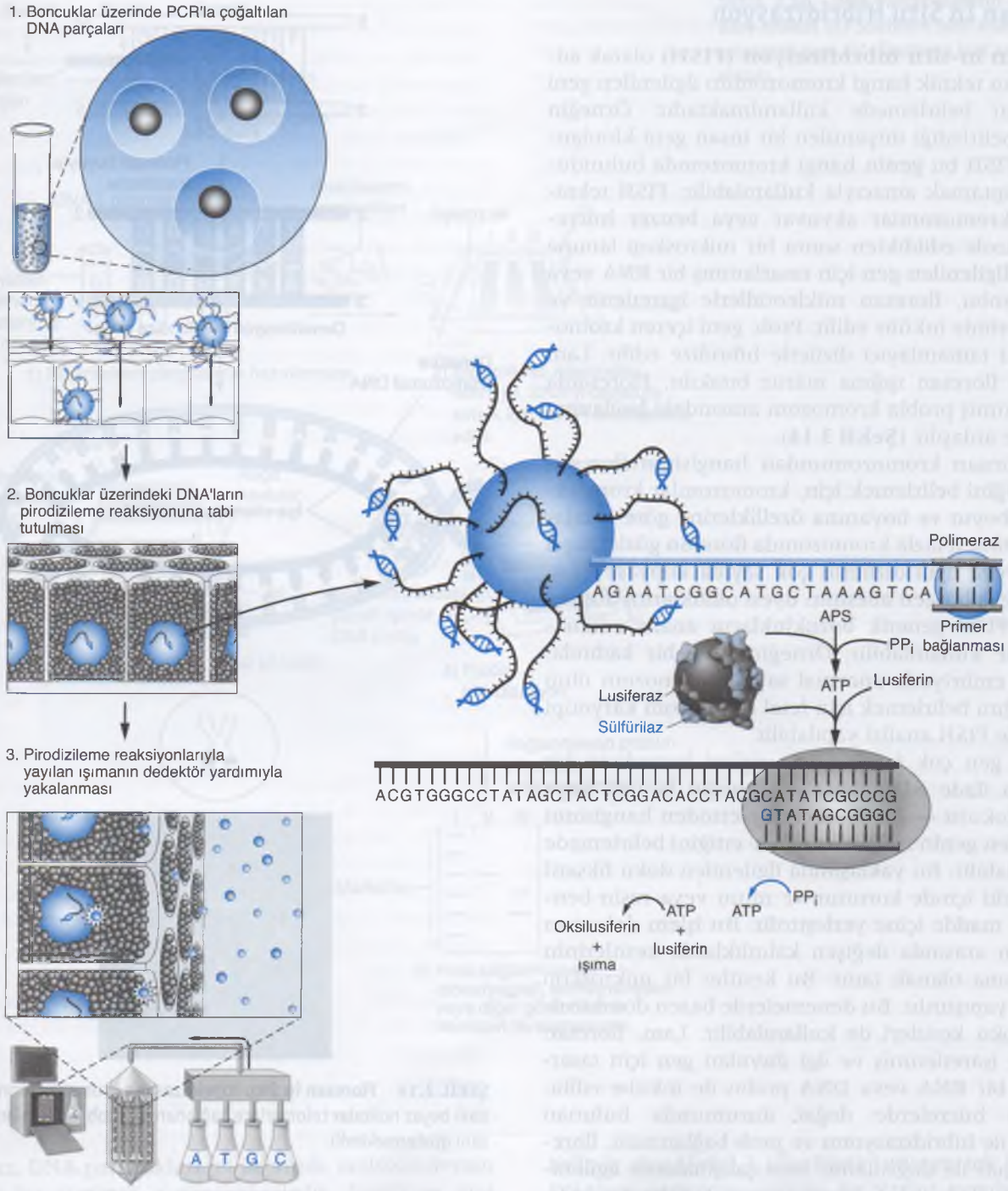
Genomiğin, daha hızlı, kısa sürede ve yüksek kapasitede analiz yapabilen dizileyicilere olan talebi arttırması, **yeni-nesil dizileme** (next-generation sequencing) teknolojilerinin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Bu cihazlar bir reaksiyonda 1 gigabazdan (milyar baz) daha fazla uzunlukta DNA dizisini oldukça doğru ve düşük maliyette üretmek üzere tasarlanmışlardır. Yeni-nesil dizileme yaklaşımları ile Sanger tekniği ve kılcal elektroforez yöntemleri terk edilmiş ve yerini ileri derecede gelişmiş floresan görüntüleme teknikleri ile donatılmış, karmaşık ve paralel biçimli yeni teknolojiler almıştır. NGS teknolojileri büyük miktarda dizi verisini hızlı (bazı durumlarda Sanger yaklaşımına göre 200 kez daha hızlı) ve düşük bir maliyetle üreten eşi görülmemiş bir kapasite sağlamaktadır.

Araştırıcılar arasında yeni-nesil dizileme tekniğine olan talep ve "1 000 dolara genom" gibi (bu bölümün sonunda tartışılacaktır) sorunlar, NGS yöntemleri üretmeye istekli şirketler arasında yoğun bir teknoloji yarışına yol açmıştır. 2005 yılında Roche 454 Life Systems, NGS teknolojisini ticarileştiren ilk şirket oldu (Şekil 3.13). Bu yaklaşım, genom dizilemede genomik DNA parçalarının boncuklara bağlı olduğu katı-faz yöntemini kullanmaktadır. Boncuklara bağlanan DNA'lar her biri yağla kaplı ayrı bir su damlacığı içinde PCR'la çoğaltılarak çok kuyulu plakalara yüklenir ve DNA polimerazla karıştırılırlar. Çok gözlü plakalar, her kuyuda bir boncuk olacak şekilde bir milyondan fazla kuyu bulundurur (Şekil 3.13). Daha sonra **pirodizileme** adı verilen bir reaksiyonla her kuyudaki boncukların üzerinde bulunan DNA'nın dizilemesi yapılır.

Pirodizilemede işaretlenmiş tek bir nükleotid (örneğin dGTP) kuyucukların üzerinden akar. Her kuyuda üzerinde DNA bulunan tek bir boncuk ve DNA'ya bağlanmış primerler bulunur. Bir tamamlayıcı nükleotid, primere yapışık kalıp diziyle karşılaştığında, DNA polimeraz tarafından primerin 3' ucuna eklenir. Nükleotidin eklenmesi, pirofosfat salınımı ve ateş böceği lüsiferaz enzimi yardımıyla ışın-salan bir dizi reaksiyona neden olur. Tek bir nükleotidin diziye eklendiğini saptamak için reaksiyondan yayılan ışın yakalanır ve kaydedilir. Nükleotid akış basamağının hızlı bir şekilde her dört nükleotid için yinelenmesiyle hangi bazın diziye eklendiği belirlenir. Bu yaklaşımla 400 bazlık bir okuma uzunluğu ve her 10 saatlik yürütmeyle yaklaşık 400 milyon bazlık bir veri elde edilir. NGS dizileme teknolojileri bu denli büyük veri görüntü dosyalarının depolanması ve kaydedilmesinde karşılaşılan önemli veri yönetimi sorunlarına yol açmıştır.

Applied Biosystems şirketi, **SOLiD** (supported oligonucleotide ligation and detection - desteklenmiş oligonükleotid bağlanma ve saptama) olarak adlandırılan ve her bir yürütmede 6 gigabazlık dizi üreten bir yaklaşım geliştirdi. SOLiD yöntemi DNA parçacıklarının boncuklara bağlanması ve çoğaltılması gibi özellikleriyle 454 yöntemine benzer, ancak kullanılan dizileme teknolojileri yönünden farklılık gösterir. Bu farklılıklar cihazın her bir yürütmede daha fazla veri üretmesine olanak sağlar. Bu tür altyapıların kurulabilmesi için gereken donanım pahalıdır. Ancak NGS yöntemleriyle üretilen veriler çok büyük miktarlarda ve baz başına maliyet Sanger yöntemine göre daha düşüktür. 2006'dan sonra yeni geliştirilen dizileme teknolojileri maliyetleri her iki yılda bir yarı oranında düşürmektedir.

Üçüncü nesil dizileyiciler üzerinde çalışmalar sürüyor ve bu araçlar 2015 yılından itibaren kullanılabilecektir. Örneğin nanoteknoloji kullanan ve tek zincirli DNA parçacıklarının nanoporlara yerleştirilmesi ve sonra her bir bazı yakalanan sinyale göre ayırabilen bir yaklaşım yakın gelecek için umut vadetmektedir. Bu yöntem, DNA çoğaltılması ve floresan etiketlere gereksinim duymaksızın DNA'nın tek bir dizi halinde okunmasını sağlayacaktır.



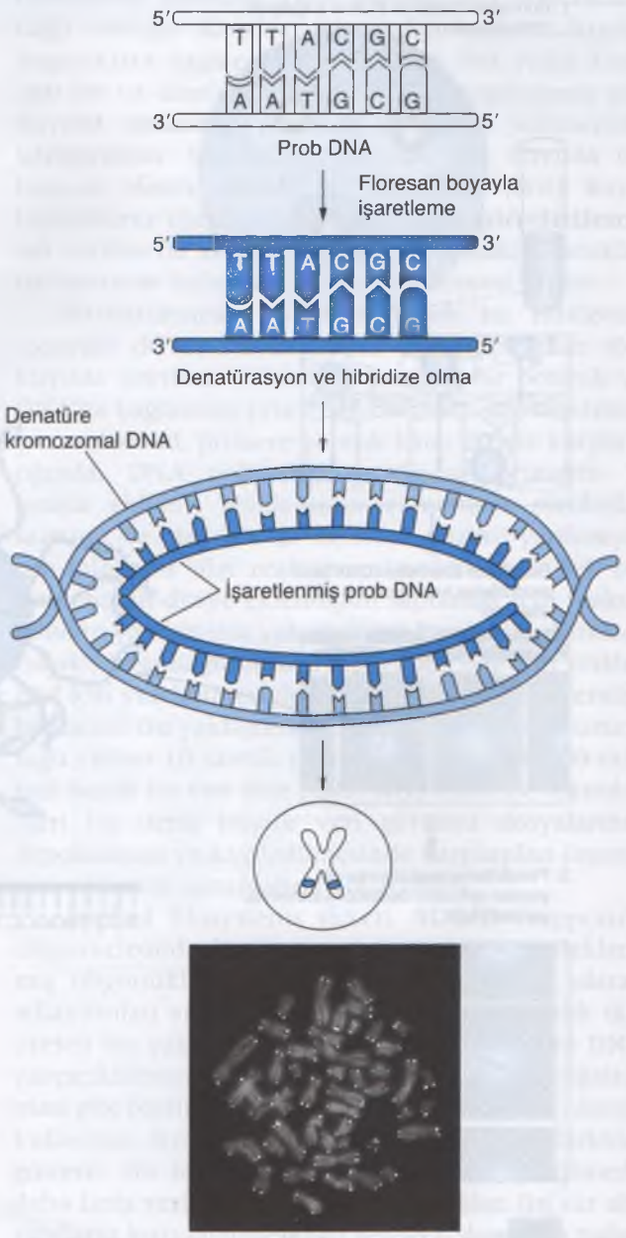
ŞEKİL 3.13 Roche 454 Yeni-Nesil Dizileme Teknolojisi Roche 454 dizileme teknolojisi DNA parçalarını boncuklara bağlar. DNA parçaları PCR'la çoğaltılarak kuyulara konulur (Adım 1) ve metinde anlatıldığı gibi pirodizilemeye tabi tutulur (Adım 2). Pirodizileme sırasında bu örnekte mavi "G" olarak gösterilen tek bir floresan nükleotid, kuyular üzerinden akıtılır. Bir nükleotid DNA polimeraz yardımıyla eklendiğinde, adenozin 5'-fosfosülfat (APS) ve sülfürilaz enzimiyle reaksiyona giren inorganik pirofosfat (PPi) ATP üretmek için açığa çıkar (mavi ok). Ateşböceği enzimi lüsiferaz bu ATP'yi kullanarak, tespit edilip ölçülebilen bir ışık yayar (Adım 3). Bir algılama sistemi tarafından yakalanan ışık, her bir kuyuya ilave edilen nükleotidlerin oluşturduğu deseni izlemek için analiz edilir. Akış döngüsü daha sonra diğer üç nükleotidin her biri ile tekrarlanır. Bu işlemin sürekli döngüsü yaklaşık 400 bazlık bir dizileme okuması oluşturur.

Floresan İn Situ Hibridizasyon

Floresan in-situ hibridizasyon (FISH) olarak adlandırılan teknik hangi kromozomun ilgilenilen geni içerdiğini belirlemede kullanılmaktadır. Örneğin zekâyı belirlediği düşünülen bir insan geni klonlanmışsa, FISH bu genin hangi kromozomda bulunduğunu saptamak amacıyla kullanılabilir. FISH tekniğinde, kromozomlar akyuvar veya benzer hücrelerden izole edildikten sonra bir mikroskop lamına yayılır. İlgilenilen gen için tasarlanmış bir RNA veya DNA probu, floresan nükleotidlerle işaretlenir ve lam üzerinde inkübe edilir. Prob, geni içeren kromozomdaki tamamlayıcı dizilerle hibridize edilir. Lam yıkanıp floresan ışığına maruz bırakılır. Floresanla etiketlenmiş probla kromozom arasındaki bağlanma ışıma ile anlaşılır (**Şekil 3.14**).

23 insan kromozomundan hangisinin floresan gösterdiğini belirlemek için, kromozomlar kromatitlerinin boyut ve boyanma özelliklerine göre hizalanırlar. Birden fazla kromozomda floresan gözlenmesi genin veya ilgili dizilerin çok sayıda kopyası olduğunu veya bir gen ailesinin üyesi olduklarını düşündürür. FISH genetik bozuklukların analiz edilmesinde de kullanılabilir. Örneğin gebe bir kadında, gelişen embriyoda anormal sayıda kromozom olup olmadığını belirlemek için fetal kromozom karyotipi üzerinde FISH analizi yapılabilir.

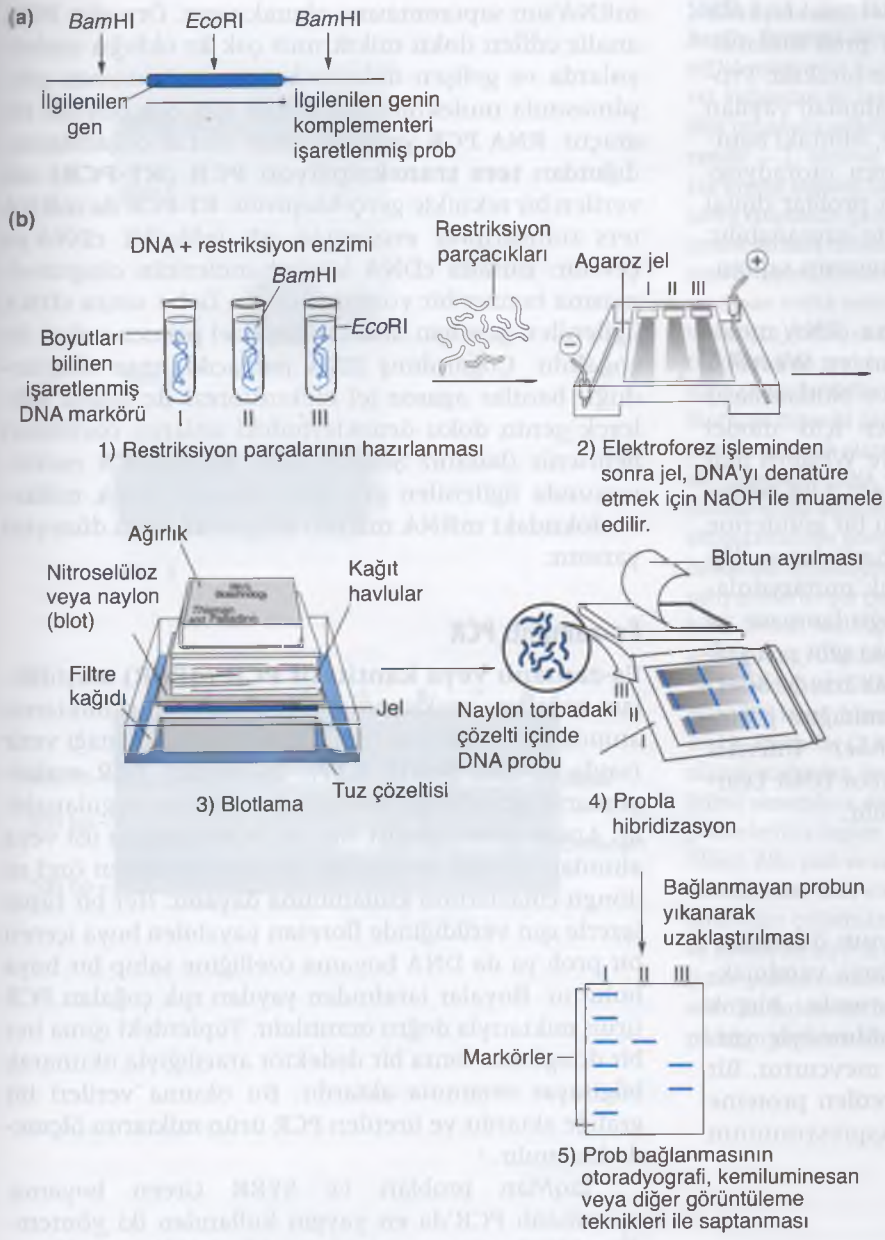
Bir gen çok farklı hücre tipleri barındıran bir organda ifade edildiğinde — örneğin böbrek veya beyin dokusu — FISH, hücre tiplerinden hangisinin ilgilenilen genin mRNA'sını ifade ettiğini belirlemede kullanılabilir. Bu yaklaşımda ilgilenilen doku fiksatif bir çözelti içinde korunur ve mum veya resin benzeri bir madde içine yerleştirilir. Bu işlem dokunun 1-5 mm arasında değişen kalınlıklarda kesitlerinin alınmasına olanak tanır. Bu kesitler bir mikroskop lamına yapıştırılır. Bu denemelerde bazen dondurulmuş doku kesitleri de kullanılabilir. Lam, floresan etiketle işaretlenmiş ve ilgi duyulan gen için tasarlanmış bir RNA veya DNA probu ile inkübe edilir. Probun hücrelerde doğal durumunda bulunan mRNA ile hibridizasyonu ve prob bağlanması, floresan tespiti ile doğrulanır. Bazı çalışmalarda ilgilenilen geni ifade eden hücre tipinin belirlenmesinde, doku kesitlerinde in situ PCR testi de yapılabilmektedir.



ŞEKİL 3.14 Floresan in Situ Hibridizasyon Kromozomların ucundaki beyaz noktalar telomerlere bağlanan bir probdan yayılan floresanı göstermektedir.

Southern Blot

Gen kopya sayısını belirlemeye yönelik bir başka teknik **Southern blot analizi** (Southern blotting veya hibridizasyon) olarak adlandırılır. 1975 yılında Ed Southern tarafından geliştirilen bu teknik kromozomların restriksiyon enzimleri ile küçük parçalara ayrılmasıyla başlar. DNA parçacıkları agaroz jel elektroforezi ile ayrılırlar (**Şekil 3.15**). Ancak kromozomal DNA'nın restriksiyon enzimleri ile parçalanması ile çok fazla sayıda DNA parçacığı oluşacağından bantların ayrık olarak görüntülenmesi mümkün



ŞEKİL 3.15 DNA Parçacıklarının Southern Blot Analizi (a) Southern blot analizi ile incelenecek gen. (b) Southern blot analizi aşamaları.

olmaz. DNA parçacıkları jel üzerinde aralıksız devam eden bir sürüntü görünümündedir. Southern blot sadece ilgi duyulan *belli* parçacıkları görüntülemede kullanılır. Elektroforezden sonra alkalin bir çözelti ile DNA denature edilir ve parçacıklar naylon veya nitroselüloz bir zara lekeleme (*blotting*) adı verilen bir teknik yardımıyla aktarılır.

Lekelemede bir jel sandviçi oluşturulur. Jel naylon zarın, filtre kâğıtlarının ve kâğıt havlunun altına yerleştirilir ve üzerine bir ağırlık konulur. Bu yolla tuz çözeltisinin jele doğru sızması ve DNA parçacıklarının kılcallık olayı yardımıyla zara geçiş hareketi gerçekleştirilmiş olur (Şekil 3.15). Blota tutunan tek iplikçikli DNA'nın pozisyonu, jeldeki ile birebir aynıdır. Alternatif olarak DNA'yı naylona aktarmada basınç veya vakumdan yararlanan blotlama cihazları kullanılabilir. DNA'nın naylon üzerine kalıcı bir şekilde tutunabilmesi için naylon blot ısıtılarak kurutulur veya UV ışığına maruz bırakılır. Daha sonra blot koloni hibridizasyonlarında gerçekleştirilen tekniğe çok benzer bir teknikle etiketlenmiş bir probla inkübe edilir. Southern blotta ve diğer hibridizasyon tekniklerinde radyoaktif olmayan probların kullanımı giderek artmaktadır.

Blot yıkanarak bağlanmayan problar uzaklaştırılır ve eğer ışın yayan veya radyoaktif bir prob kullanılmışsa, otoradyografi ile bir filme maruz bırakılır. Probun blota bağlandığı yerlerde, prob tarafından yayılan radyoaktivite veya ışıma, film üzerinde, blottaki bantları gümüş tanecikleri şeklinde gösteren otoradyogram oluşturur (Şekil 3.15). Işın yayan problar dijital kameralı görüntüleme sistemleriyle de saptanabilir. Ortaya çıkan bant sayısı, gen kopya sayısının saptanmasında belirleyicidir.

Southern blot, **Northern blotlama** (RNA moleküllerinin ayrıştırılması ve blotlanması) ve **Western blotlama** (proteinlerin ayrıştırılması ve blotlanması) tekniklerinde kullanılan temel ilkeler için model olmuş önemli bir tekniktir. Northern ve Western blot tekniklerinin adlandırılmasında Southern blot tekniğini geliştiren Ed Southern'a şaka yollu bir gönderme yapılmıştır. Southern blot tekniği gen haritalama, ilişkili gen ailelerinin belirlenmesi, genetik mutasyonların saptanması, PCR ürünlerinin doğrulanması ve DNA parmakizi (Bölüm 8'de tartışılacak) gibi pek çok uygulama alanına sahiptir. DNA parmak izinde Southern blot analiz tekniğinin nasıl kullanıldığını gösteren kusursuz bir animasyon Rehber İnternet Sitesi'nden ulaşılacak "Cold Spring Harbor DNA Learning Center" web sayfalarında bulunabilir.

Gen Ekspresyonu Çalışmaları

Gen ekspresyonu ve gen ekspresyonunun düzenlenmesi araştırmaları, moleküler biyologlarca yapılmaktadır. Gen ekspresyonunun çalışılmasında, birçok dokuda üretilen mRNA'ların analiz edilmesiyle gerçekleştirilen farklı moleküler teknikler mevcuttur. Bir dokudaki mRNA miktarı genellikle üretilen proteine eşit olduğundan, bu yaklaşım gen ekspresyonunun ölçülmesinde iyi bir ölçüttür.

Northern Blot Analizi

Northern blotun temel işleyişi Southern blot analizine benzer. İlgilenilen dokudan izole edilen RNA jel elektroforezi yoluyla ayrılır (RNA enzimlerle kesilmez). RNA bir naylon membrana blotlanır ve Southern blotta anlatıldığı gibi bir probla hibridize edilir. Otoradyogram yoluyla ortaya çıkarılan bantlar ilgilenilen gene ait mRNA'ların varlığı ve boyutları hakkında bilgi verir (**Şekil 3.16a**). Buna ek olarak, farklı dokularda üretilen mRNA düzeyleri karşılaştırılıp ölçülebilir.

Ters transkripsiyon PCR

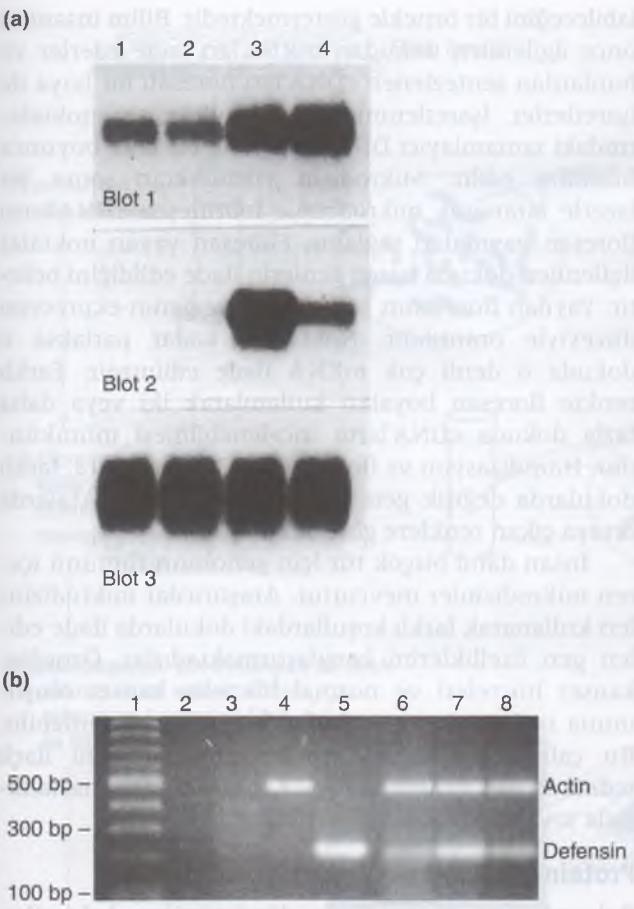
Bir doku tarafından üretilen RNA bazen Northern blot analizi saptama limitlerinin altında olabilir. PCR çok küçük doku örneklerinde çok az miktarlarda mRNA'nın saptanmasına olanak tanır. Örneğin PCR, analiz edilen doku miktarının çok az olduğu embriyolarda ve gelişen dokularda, gen anlatımının çalışılmasında moleküler biyologlar için çok önemli bir araçtır. RNA PCR yoluyla direkt olarak çoğaltılamadığından **ters transkripsiyon PCR (RT-PCR)** adı verilen bir teknikle gerçekleştirilir. RT-PCR'da mRNA ters transkriptaz enzimiyle çift iplikçikli cDNA'ya çevrilir. Burada cDNA kütüphanelerinin oluşturulmasına benzer bir yöntem izlenir. Daha sonra cDNA ilgilenilen gen için tasarlanmış özel primer setleri ile çoğaltılır. Çoğaltılmış DNA parçacıklarının oluşturduğu bantlar agaroz jel elektroforezi ile analiz edilerek genin doku örneklerindeki anlatım özellikleri belirlenir (bakınız Şekil 3.16b). Bir RT-PCR reaksiyonunda ilgilenilen gen için üretilen cDNA miktarı, dokudaki mRNA miktarı ve gen anlatım düzeyini yansıtır.

Eş-zamanlı PCR

Eş-zamanlı veya kantitatif PCR (qPCR) araştırıcılara çoğaltma reaksiyonlarında oluşan ürün miktarını anında (eş-zamanlı = "real-time") ölçme olanağı verir (sayfa 86'daki **Şekil. 3.17**). Eş-zamanlı PCR reaksiyonlarını gerçekleştirmede birçok yöntem uygulanabilir. Ancak temel işleyişi, her bir PCR tüpünün üst veya altından yayılan ışınları bir lazerle tarayabilen özel ısı döngü cihazlarının kullanımına dayanır. Her bir tüpte lazerle ışın verildiğinde floresan yayabilen boya içeren bir prob ya da DNA boyama özelliğine sahip bir boya bulunur. Boyalar tarafından yayılan ışık çoğalan PCR ürün miktarıyla doğru orantılıdır. Tüplerdeki ışıma her bir döngüden sonra bir dedektör aracılığıyla okunarak bilgisayar ortamına aktarılır. Bu okuma verileri bir grafiğe aktarılır ve üretilen PCR ürün miktarını ölçmede kullanılır.

TaqMan probları ve SYBR Green boyama, eş-zamanlı PCR'da en yaygın kullanılan iki yöntemdir. SYBR Green çift iplikçikli DNA'ya bağlanır. Eş-zamanlı PCR reaksiyonu döngülerinde ne kadar çok çift iplikçikli DNA kopyalanırsa o kadar çok DNA SYBR Green tarafından boyanır ve yayılan floresan miktarı da aynı oranda artar.

TaqMan probları, geri ve ileri (reverse ve forward) primerlerin DNA'ya bağlanma yerlerinin arasında bulunan bir bölgenin tamamlayıcısıdır (Şekil 3.17). TaqMan probları iki boya içerir. İlk boya raportör olarak adlandırılır ve probun 5' ucunda bulunur. Raportör boya ısı döngü cihazından lazer gönderildiğinde floresan ışığı yayar. Diğer boya, söndürücü olarak adlandırılır ve probun 3' ucuna bağlıdır. Bu boyalar birbirlerine yakın olduklarında söndürücü boya raportör boya tarafından yayılan floresan ışığını söndürür. Ancak *Taq* DNA polimeraz primerleri uzattı-

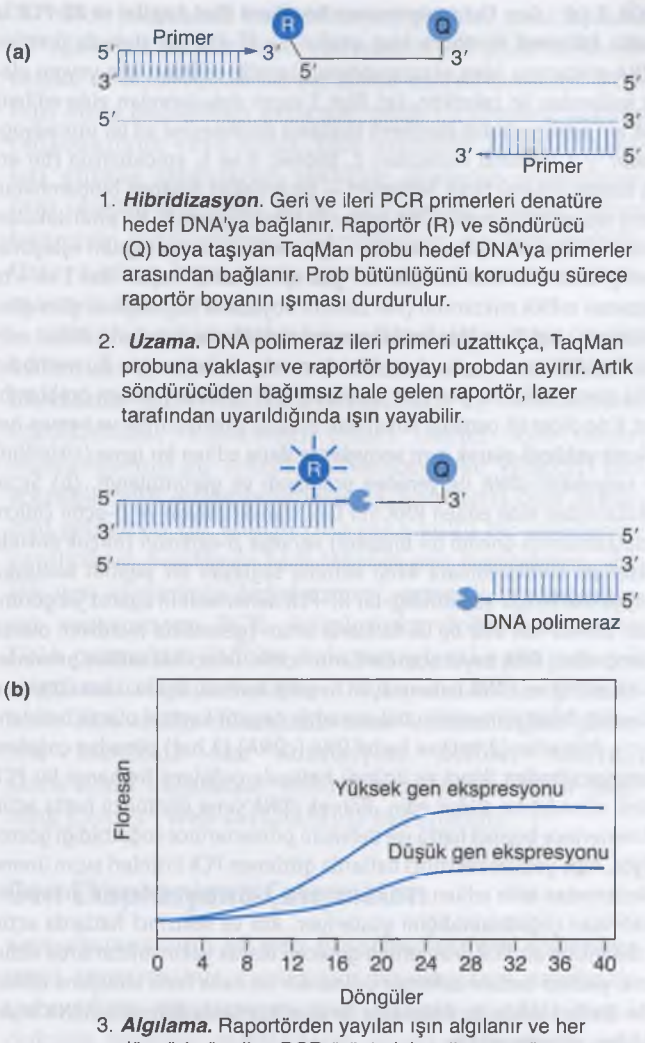


ŞEKİL 3.16 Gen Ekspresyonunun Northern Blot Analizi ve RT-PCR'la Analiz Edilmesi Northern blot analizi ve RT-PCR bir dokuda üretilen mRNA miktarının (gen ekspresyonunun)analiz edilmesi için yaygın olarak kullanılan iki tekniktir. (a) Blot 1 sıçan dokularından elde edilmiş RNA'nın analiz edildiği Northern blotlama denemesine ait bir otoradyogramdır — 1, seminal veziküller; 2, böbrek; 3 ve 4, epididimisin (bir erkek üreme organı) farklı bölümleri — bu örnekler naylona blotlandıktan sonra radyoaktif işaretli cDNA probu ile hibridize edildi. Bu prob dokuları zararlı serbest radikaller, atomlar veya elektronlarının sayıları eşleştirilmemiş moleküllerden koruyan bir gen için tasarlanmıştır. Hat 3 ve 4'te saptanan mRNA miktarının (her bandın boyutu ve koyuluğuna göre gösterilmiştir) hat 1 ve 2'de belirlenenden daha fazla olduğuna dikkat ediniz. Blot 2'de probu çıkarılmış blot 1 membranı kullanıldı. Bu membran daha sonra farklı bir gen için tasarlanmış bir probla yeniden probland. Blot 3'de diğer iki panelde kullanılan problar uzaklaştırıldı ve hemen her dokuda yaklaşık olarak aynı seviyelerde ifade edilen bir gene (siklofilin) ait radyokatif cDNA ile yeniden probland ve görüntülendi. (b) Sıçan dokularından elde edilen RNA'nın ters transkripsiyon ve *β-actin* (hücre sitoplazmasının önemli bir bileşeni) ve/veya *β-defensin* (birçok dokuda bakteriyel enfeksiyonlara karşı koruma sağlayan bir peptidi kodlayan gen) primerleriyle çoğaltıldığı bir RT-PCR denemesinin agaroz jel görüntüsü. Birinci hat 100 bp'lik farklarla artan (genellikle merdiven olarak adlandırılan) DNA boyut standartlarını içerir. İkinci hat sadece primerlerin eklendiği ve cDNA bulunmayan negatif kontrol, üçüncü hat cDNA'nın eklendiği fakat primerlerin bulunmadığı negatif kontrol olarak belirlenmiştir. Primerler (2.hat) ve hedef DNA (cDNA) (3.hat) olmadan çoğalma olamayacağından ikinci ve üçüncü hatlarda çoğalmış herhangi bir PCR ürünü olmadığına dikkat edin. Böbrek cDNA'sının dördüncü hatta actin primerlerince beşinci hatta ise defensin primerlerince çoğaltıldığı gösteriliyor. Altı, yedi ve sekizinci hatlarda gözlenen PCR ürünleri sıçan üreme dokularından elde edilen cDNA'ların hem aktin hem defensin primerleri tarafından çoğaltılabildiğini gösteriyor. Altı ve sekizinci hatlarda actin ve defensine ait PCR ürünlerinin göreceli olarak yakın miktarlarda olduğuna, yedinci hattaki defensin ürününün ise daha fazla olduğuna dikkat edin. Bu farklılıklar bu dokularda farklı miktarlarda defensin mRNA'sı yapıldığını yansıtmaktadır.

ğında raportör boya probun sonundan ayrılır (en sonunda probu tamamen terk eder). Raportör boyanın söndürücü boyadan ayrılmasıyla, raportör boya tarafından yayılan ışıma ısı döngü cihazınca saptanabilir hale gelir. Saptanan ışıma bilgisayar tarafından analiz edilerek her bir döngüde yayılan floresan miktarını gösteren bir grafiğe dönüştürülür. Eş-zamanlı PCR, jel yürütmeye gereksinim duyulmaması nedeniyle gen anlatımındaki değişiklikleri ölçme ve nicelemede, özellikle çok sayıda örneğin ve farklı genlerin aynı anda analizi gerektiğinde, hızlı ve etkin bir tekniktir.

Gen mikrodizinleri

DNA mikrodizin analizleri gen anlatımlarının çalışılmasında kullanılan diğer bir tekniktir. Geçtiğimiz 15 yıl boyunca hızla popüler hale gelmiş ve araştırıcıların bir dokuda anlatılan tüm genleri analiz etmesini mümkün kılmıştır (sayfa 87'deki **Şekil 3.18**). **Gen çipi** olarak da bilinen bir mikrodizin küçük bir mikroskop camı üzerinde oluşturulur. Tek zincirli DNA molekülleri bilgisayarla kontrol edilen, *dizinci* denilen robotik bir kol kullanılarak lam üzerine birçok ince iğne kullanılarak sabitlenir veya "noktalanır". Her bir iğne farklı DNA moleküllerinin milyonlarca kopyasını (farklı genlerin cDNA'ları) içeren bir çözeltiye daldırı-



ŞEKİL 3.17 Eş-Zamanlı PCR (a) Eş-Zamanlı PCR TaqMan yönteminde hedef geni tamamlayıcı bir çift PCR primeri ve bir prob kullanılır. Probun bir ucunda raportör (R) boya diğer ucunda söndürücü boya (Q) bulunur. Söndürücü boya raportör boyaya yakın olduğunda raportörün yaydığı floresan ışığı engellenir. *Taq* DNA polimeraz DNA iplikçiğini sentezleyerek primeri uzattığında raportör boya probdan ayrılarak enerjisini dışarı verir. (b) Takip eden her PCR döngüsü daha çok raportör boyayı uzaklaştırır. Böylece boyanın artarak yaydığı ışıma bir bilgisayar tarafından yakalanarak her döngüde floresan yoğunluğunun ne kadar arttığını gösteren bir okuma üretilmiş olur.

lır. Dizinci DNA moleküllerini lam üzerinde bilgisayar tarafından kaydedilen özel yerlere sabitler. Tek bir mikrodizin üzerinde her biri farklı bir genin özgün bir dizisini bulunduran 10 000'den fazla DNA noktası bulunabilir.

Çok farklı mikrodizin çeşitleri vardır. Şekil 3.18 mikrodizinin gen anlatım çalışmalarında nasıl kullanılabileceğini bir örnekle göstermektedir. Bilim insanları önce ilgilenilen dokudan mRNA'ları izole ederler ve bunlardan sentezlenen cDNA'ları floresan bir boya ile işaretlerler. İşaretlenmiş cDNA, mikrodizin noktalarındaki tamamlayıcı DNA dizileri ile bir gece boyunca hibridize edilir. Mikrodizin yıkandıktan sonra bir lazerle taranarak mikrodizinle hibritleşen cDNA'ların floresan yaymaları sağlanır. Floresan yayan noktalar ilgilenilen dokuda hangi genlerin ifade edildiğini belirtir. Yayılan floresanın yoğunluğu ise genin ekpresyon düzeyiyle orantılıdır. Nokta ne kadar parlaksa o dokuda o denli çok mRNA ifade edilmiştir. Farklı renkte floresan boyaları kullanılarak iki veya daha fazla dokuda cDNA'ların incelenebilmesi mümkündür. Hibridizasyon ve floresan tespitinden sonra, farklı dokularda değişik gen anlatım özellikleri noktalarda ortaya çıkan renklere göre karşılaştırılır.

İnsan dâhil birçok tür için genomun tümünü içeren mikrodizinler mevcuttur. Araştırıcılar mikrodizinleri kullanarak farklı koşullardaki dokularda ifade edilen gen özelliklerini karşılaştırmaktadırlar. Örneğin, kanser hücreleri ve normal hücreler kanser oluşumuna neden olan geni bulmak için karşılaştırılabilir. Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar yeni ilaçlı tedavi stratejileri geliştirerek kanser ve diğer hastalıklarla savaşta kullanılabilir (Bölüm 11).

Protein ekspresyonu ve saflaştırması

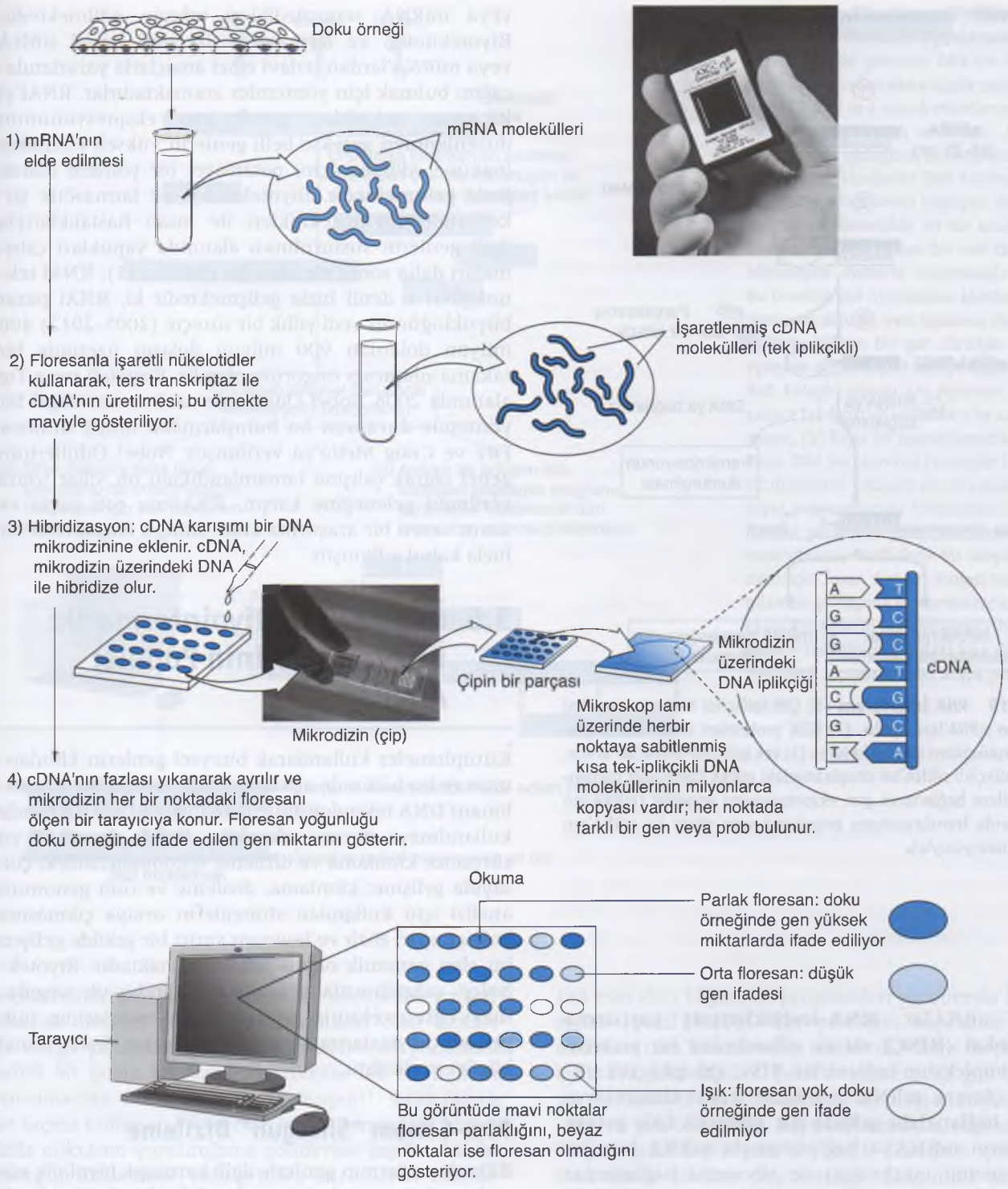
Rekombinant plazmidlerle dönüştürülen bakteriler, izole edilmiş genin protein ürününü üretmede sıkça kullanılabilmektedir. Bakteriler, fermentörlerde yüksek miktarlarda üretildikten sonra proteinler izole edilerek saflaştırılırlar (Bölüm 4).

Gen mutagenez çalışmaları

Bilim insanları klonlanmış genleri çok farklı amaç ve yollarla çalışırlar. Belirli bir gen tarafından üretilen bir proteinin fonksiyonu ve yapısını incelemek için de çok değişik teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan biri **yönlendirilmiş mutagenez** olarak adlandırılır. Bu teknikte bir vektöre yerleştirilen klonlanmış bir gen üzerindeki belli nükleotidlerde mutasyonlar oluşturulur. Bu genin hücrelerde ifade edilmesi mutasyona uğramış proteinlerin translasyonuna neden olur. Bu, araştırıcılara belli mutasyonların protein yapısı üzerindeki etkisini inceleme olanağı verir ve hangi nükleotidlerin protein fonksiyonları için önemli olduğunu gösteren bir yöntem olarak işe yarar. Yönlendirilmiş mutagenez, insan hastalıklarıyla ilgili proteinleri üreten genlerdeki önemli dizilerin belirlenmesinde bilim insanlarına yardımcı olan çok değerli bir yöntemdir.

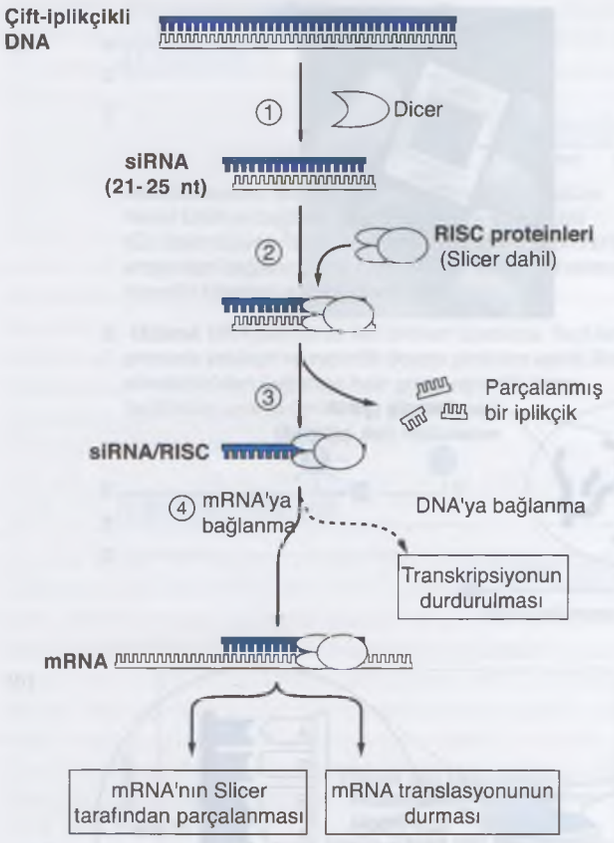
RNA interferans

1998'de, Massachusetts Üniversitesi Tıp Fakültesi'nden Craig C. Mello ve Stanford Üniversitesinden Andrew



ŞEKİL 3.18 **Gen Mikrodizin Analizi**

Z. Fire devrim niteliğinde bir çalışma yayınladılar. Bu araştırıcılar çift iplikçikli bir RNA (dsRNA) parçası kullanarak *Caenorhabditis elegans* solucanında gen ekspresyonunu engellediler/genleri susturdular. Gen ekspresyonunun baskılanmasında doğal olarak gözlenen bu olay **RNA interferans (RNAi)** olarak bilinmektedir. Mello, Fire ve diğer araştırıcılar dsRNA'ya bağlanan bir enzimin (dicer), RNA'yı 21-25 nükleotid uzunlukta **küçük engelleyici RNA (siRNA)** adı verilen parçalar halinde kestiğini bulmuşlardır.



ŞEKİL 3.19 RNA İnterferans (1) Çift iplikçikli RNA dicer enzimi tarafından siRNA'lara ayrılır. (2) RISC proteinleri siRNA'lara bağlanarak iki iplikçikten birisini keserek (3) tek iplikçikli siRNA'lar üretir. (4) Tek iplikçikli siRNA'lar sitoplazmadaki mRNA üzerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanarak gen ekspresyonunu engeller (mRNA'nın ribozomlarda translasyonunu engelleme veya slicer ile mRNA'nın parçalanması yoluyla).

Bu siRNA'lar, **RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC)** olarak adlandırılan bir protein-RNA kompleksine bağlanırlar. RISC, çift iplikçikli siRNA'ları çözerek mRNA moleküllerindeki tamamlayıcı dizilere bağlanabilir şekilde tek iplikçikli hale getirir. siRNA'ların mRNA'ya bağlanmasıyla mRNA bozulur (slicer enzimi tarafından) ve ribozoma bağlanamaz (**Şekil 3.19**). Böylece translasyon durdurulmuş olur. RNAi, Bölüm 2'de açıklanan miRNA'ların gen susturma mekanizmasına benzerlik göstermekle beraber, başlıca farklılığı siRNA'ların dsRNA'lardan oluşturulmasıdır.

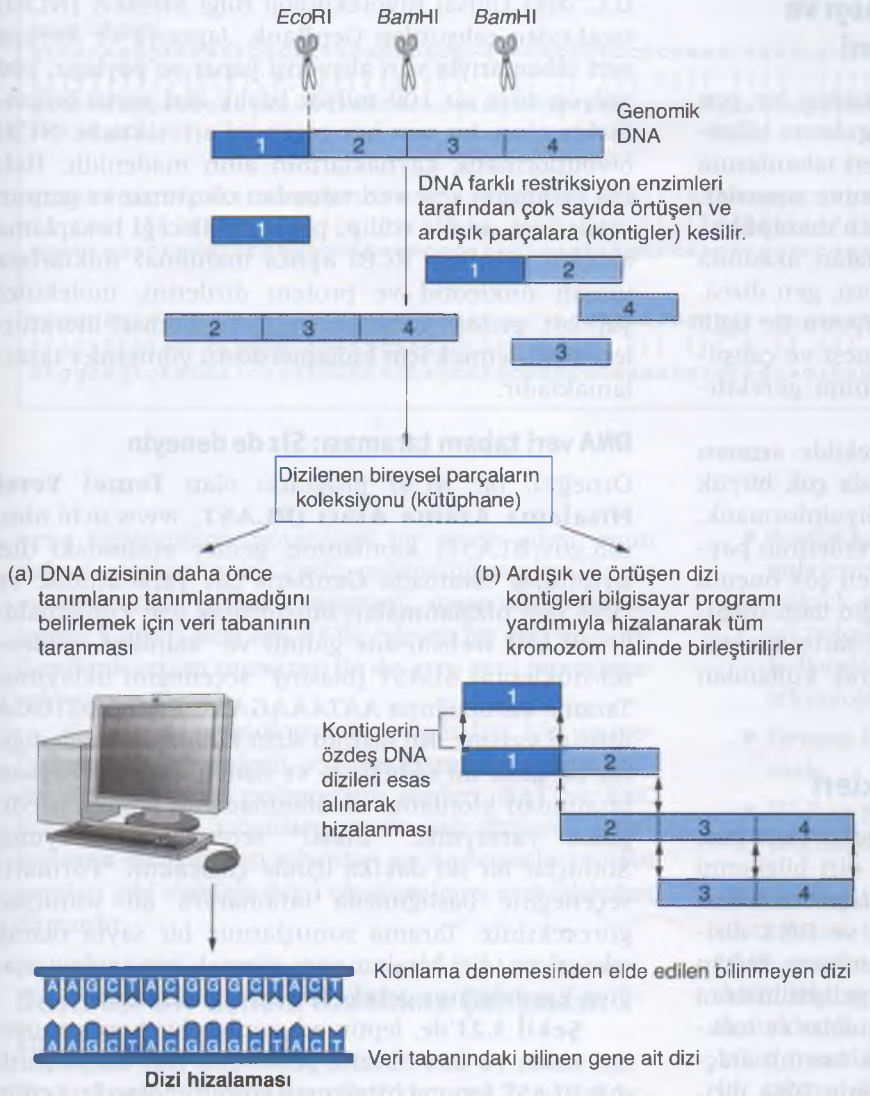
siRNA ve miRNA'ların bulunmasıyla ortaya çıkan bilgilerin başlangıçta kısıtlı bir alana hitap ettiği düşünülmüştü. Ancak şimdi memeli hücrelerinin, yüzlerce genin düzenlenmesine yardımcı olan, binlerce siRNA veya miRNA sentezledikleri tahmin edilmektedir. Biyoteknoloji ve farmasötik şirketleri hangi siRNA veya miRNA'lardan tedavi edici amaçlarla yararlanılacağını bulmak için yöntemler aramaktadırlar. RNAi'yi kapsayan teknikler, gerek gen ekspresyonunun düzenlenmesi gerekse belli genlerin yüksek etkinlikle inaktive edilmesi için, potansiyel bir yöntem olarak hızla gelişmektedir. Biyoteknoloji ve farmasötik şirketlerinin RNAi teknikleri ile insan hastalıklarıyla ilgili genlerin susturulması alanında yaptıkları çalışmaları daha sonra ele alacağız (Bölüm 11). RNAi teknolojileri o denli hızla gelişmektedir ki, RNAi pazar büyüklüğünün yedi yıllık bir süreçte (2005-2012) 400 milyon dolardan 900 milyon doların üzerinde bir rakama ulaşacağı öngörülmektedir. Fizyoloji veya Tıp alanında 2006 Nobel Ödülü, gen anlatımını doğal bir yöntemle durduran bu buluşlarından ötürü Andrew Fire ve Craig Mello'ya verilmiştir. Nobel Ödüllerinin genel olarak çalışma tamamlandıktan on yıllar sonra verilmesi geleneğine karşın, RNAi'nin çok güçlü ve umut veren bir araştırma aracı olduğu olağanüstü bir hızla kabul edilmiştir.

3.5 Genomik ve Biyoinformatik: Biyoteknolojinin Popüler Alanları

Kütüphaneler kullanılarak bireysel genlerin klonlanması ve bu bölümde açıklanan diğer teknikler, rekombinant DNA teknolojisinde uzmanlaşmış yaklaşımlarla kullanılmaya devam edecektir. Ancak geçen 15 yıl süresince klonlama ve dizileme teknolojilerindeki çok sayıda gelişme, klonlama, dizileme ve tüm genomun analizi için kullanılan stratejilerin ortaya çıkmasına yol açmıştır. Hızlı ve heyecan verici bir şekilde gelişen bu alan genomik olarak adlandırılmaktadır. Biyoteknoloji çalıştığınızda genomikle ilgili birçok uygulamayı öğreneceksiniz. Aşağıda bilim insanlarının tüm genom çalışmalarını nasıl yürüttüklerine ilişkin temel bilgiler verilmiştir.

Tüm-Genom "Shotgun" Dizileme

Bilim insanlarının genlerle ilgili karmaşık biyolojik süreçlere (kanser tiplerinin çoğu gibi) olan ilgisi giderek artmaktadır. Geleneksel rekombinant DNA teknikleriyle bir veya birkaç genin bir seferde klonlanması çok zaman almakta ve sadece klonlanan genler hakkındaki bilgilerimizi arttırmaktadır. Bu nedenle bilim insanları tüm genlerin dizi analizi ve klonlanmasına yönelik stratejiler üzerinde çalışmaya başladılar. Bu strateji genel olarak **tüm-genom "shotgun" dizileme** olarak adlandırıldı. Shotgun (tüfek) sözcüğünün



ŞEKİL 3.20 Tüm Genom Shotgun Dizileme ve Biyoinformatik Uygulamalarına İki Örnek Şekilde genomik DNA'nın *Eco*RI ve *Bam*HI tarafından daha küçük parçalar halinde (1, 2, 3 ve 4 olarak etiketlenen) kesilmesi basitleştirilerek verilmiştir. Nasıl bir DNA parçası olduğuna bakılmaksızın, DNA dizi analizi, klonlanan DNA hakkında daha fazla bilgi edinmemizi sağlayan önemli bir araçtır. (a) Genellikle bu tür analizler bilinen dizilerden oluşan bir veri tabanında bilinmeyen dizilerin aranmasıyla başlar. Bu örnekte dizi hizalaması, klonlanmış bilinmeyen dizinin, veri tabanına daha önce girilmiş bilinen bir gen dizisiyle tam bir eşleşme gösterdiğini ortaya koymaktadır. Not: Kolaylık olması için dizilenen DNA'nın sadece tek iplikçiği veritabanı ile karşılaştırılıyor. (b) Diğer bir biyoinformatik uygulaması, DNA parçalarının (kontigler) nükleotid dizilerinin örtüşme esasına dayalı bilgisayar programlarıyla hizalanmasını içerir. Burada gösterilen şema tüm kromozomun tamamlanmış dizilerinin bir araya getirilmesi için İnsan Genom Projesi'nde kullanılan bir yaklaşıma benzemektedir. Her ne kadar kontiglerin tamamı karşılaştırılsa da, sadece kontiğin sonundaki kısa diziler hizalanarak kromozomu bir araya getirirler.

seçilmesinde geleneksel yöntemle (kütüphaneler kullanarak bireysel genlerin klonlanması) olan farklılığa vurgu yapılmak istenmiştir. Geleneksel yöntemde belirli bir genin klonlanması, tüfekle tek bir hedefin vurulmasına benzetilmekte, "shotgun" stratejisinde ise saçma kullanan bir tüfekle hedef üzerindeki birden fazla noktanın vurulduğuna gönderme yapılmaktadır. Shotgun dizilemede, tüm genom, intronlar ve exonların dizi analizi yapılır. Tüm genom dizisi yazılım programları yardımıyla bir araya getirilir ve genler biyoinformatik yoluyla tanımlanır.

Tüm kromozomun dizi analizi için yaygın olarak kullanılan stratejilerden biri restriksiyon enzimleri ile kromozomun parçalanmasını gerektirir (**Şekil 3.20**). Bu süreçte birbirleriyle örtüşen ve **kontig (ardışık diziler)** adı verilen binlerce parça oluşur. Kontiglerin dizi analizi yapıldıktan sonra, birbirleriyle örtüşmelerini esas alan bilgisayar programları yardımıyla hizalanırlar (Şekil 3.20b). Bu yaklaşım sayesinde bilim insanları tüm kromozomu tek bir dizi halinde yeniden bir araya getirebilirler. Şekil'de gösterildiği gibi bilgisayar yardımıyla DNA dizilerinin karşılaştırılarak düzenlenmesi çok önemlidir. **Biyoinformatik,** bilgisayar ve bilişim teknolojilerinin biyolojik süreçleri çözümlemek üzere birlikte uygulandığı, disiplinler arası bir alandır.

İlk shotgun yaklaşımı 1995 yılında Genomik Araştırma Enstitüsü bilim insanları tarafından *Haemophilus influenzae* bakterisinin 1.8 milyon baz çiftlik genomuna başarıyla uygulanmıştır. Birçok kişi shotgun-dizileme stratejilerinin daha büyük genomlarda kullanılabileceğinden şüphe duymuşlar, ancak bu tekniğin geliştirilmesi ve yeni dizileme stratejileri İnsan Genom Projesinin ilerleyişini hızlandırmıştır.

Biyoinformatik: Moleküler Biyoloji ve Bilgisayar Teknolojisinin Bileşimi

Bilim insanları, daha önce tanımlanmamış bir gen veya DNA dizisini saptadıklarında, bulgularını bilimsel yayınlar yoluyla, dizi verisini ise veri tabanlarına koyarak diğer bilim insanlarının erişimine sunarlar. DNA dizi verilerinden oluşan veri tabanı manipülasyonları biyoinformatiğin ilk uygulamaları arasında yer almıştır. Bu veri tabanları gen yapısı, gen dizisi, gen anlatımı, protein yapısı ve fonksiyonu ile ilgili verilerin analizi, paylaşımı, düzenlenmesi ve çalışılması için bilgisayar yazılımı ve donanımı gerektirmektedir.

Genom verilerinin çok hızlı bir şekilde artması nedeniyle açık ve özel veri tabanlarında çok büyük miktarlarda veri depolanmaktadır. Biyoinformatik, bilim insanları için özellikle DNA dizi verilerinin paylaşımına, karşılaştırılmasına olanak veren çok önemli bir araç haline gelmiştir. Biyoinformatiğin basit uygulamaları bu kitabın diğer bölümlerinde tartışılmaktadır. Burada bu alanda çok yaygın olarak kullanılan birkaç uygulamadan söz edeceğiz.

Biyoinformatik Uygulama Örnekleri

Tüm-genom dizileme projeleri başlamadan önce bile, bilim insanları çok farklı canlılara ait dizi bilgilerini toplamaktaydılar. Bu durum giderek araştırıcılar arasında bilgilerin paylaşılmasını, protein ve DNA dizilerinden en üst düzeyde fayda sağlanmasına imkân sağlayacak karmaşık veri tabanlarının geliştirilmesini gerektirdi. Veri tabanları verilerin araştırıcılar ve halkla paylaşılması ve arşivlenmesi için çok önemli araçlardır. Yüksek-hızlı bilgisayar-otomasyonlu DNA dizileme teknikleri hemen hemen İnternetle eş-zamanlı olarak geliştirildiği için, birçok DNA dizi veri tabanı internet yoluyla kullanılmaktadır.

Bir geni klonlayan bilim insanları dizi verisini veri tabanına girdiklerinde, yazılım, yeni girilen diziyi veri tabanındaki tüm diğer dizilerle karşılaştırır ve nükleotid uyumundaki benzerlik düzeylerine göre *hizalanmış* bir veri oluşturur (Şekil 3.20a). Bu tip aramalar, bir genin rekombinant DNA tekniği kullanılarak klonlanmasından sonra hem doğrulanması hem de gen dizisinin yeni olup olmadığının anlaşılması için ilk aşamalardır. Diğer tüm uygulamalar yanında veri tabanları, nükleotid dizisinin kodladığı amino asit dizisinin tahmin edilmesine de olanak tanır. Böylece klonlanmış genin işlevi hakkında bilgi edinilir.

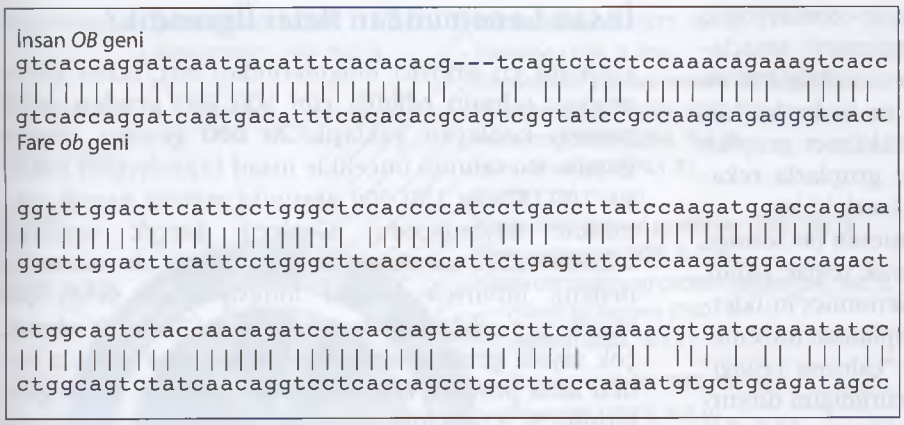
GenBank olarak bilinen DNA dizi veri tabanı, dünyada en yaygın kullanılan veri tabanlarından biridir. Halkın erişimine açık en büyük veri tabanı olmasının yanında, Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) DNA dizi koleksiyonunu da içerir. Washington, D.C.'deki Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI) tarafından çalıştırılan GenBank, Japonya ve Avrupa veri tabanlarıyla veri alışverişi yapar ve paylaşır. 100 milyon türe ait 100 milyar bazlık dizi verisi bulunmakta olup, bu sayı her geçen yıl artmaktadır. NCBI biyoinformatik kaynaklarının altın madenidir. Halkın erişimine açık veri tabanları oluşturur ve genom verilerinin analiz edilip, paylaşılabileceği hesaplama araçları geliştirir. NCBI ayrıca inanılmaz miktarlara ulaşan nükleotid ve protein dizilerini, moleküler yapıları, genom verilerini ve hatta bilimsel literatürleri analiz etmek için kullanıcı dostu yöntemler tasarlamaktadır.

DNA veri tabanı taraması: Siz de deneyin

Örneğin, bir NCBI programı olan **Temel Yerel Hizalama Arama Aracı (BLAST**; www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) klonlanmış genler arasındaki dizi uyumunu taramada GenBank'tan yararlanmak ve DNA dizi hizalanmaları oluşturmak için kullanılabilir. BLAST websitesine gidiniz ve "standart nükleotid-nükleotid BLAST [blastn]" seçeneğini tıklayınız. Tarama kutucuğuna AATAAAGAAC CAGGAGTGGA dizisini yazınız. Bu dizinin sizin klonlayıp, dizilediğiniz bir gene ait olduğunu ve sizden önce bir başkası tarafından klonlanıp klonlanmadığım bilmek istediğinizi varsayınız. "Blast!" seçeneğini tıklayınız. Sonuçlar bir iki dakika içinde çıkacaktır. "Format!" seçeneğine bastığınızda taramanıza ait sonuçları göreceksiniz. Tarama sonuçlarınız bir sayfa olarak çıkacaktır (dizi hizalamasını görmek için sayfayı aşağıya kaydırmanız gerekebilir). Ne buldunuz?

Şekil 3.21'de, leptin adı verilen bir hormon üreten insan ve fare obezite genlerinin (*ob*) karşılaştırıldığı BLAST tarama hizalaması gösterilmektedir. Leptin yağ metabolizmasında rol oynar ve leptin genindeki mutasyonlar obezite oluşumuna katkı sağlar (Şekil 11.1'e de bakınız). Bu iki genin, özdeş nükleotid dizileri arasındaki dikey çizgilerin varlığından anlaşıldığı gibi, benzerliklerinin ne kadar çok olduğuna dikkat ediniz.

NIH tarafında desteklenen İnsan Genomu Terminoloji Komitesi yeni klonlanmış insan genlerine isim veya sembollerin nasıl verileceğine dair kuralları belirlemektedir. GenBank'a girilen her giriş için bilim insanlarının gerektiğinde başvurabilecekleri bir **erişim numarası** verilir. Örneğin Rehber İnternet Sitesinde bağlantısı verilen GenBank web sitesine girip, U14680 yazın ve "GO" ya tıklayın. Bu erişim numarası ile hangi gen belirlendi? Erişim numarası bağlantısına tıklayın. GenBank'ın bu diziyi yayınlayan orijinal literatürü, bu gen tarafından kodlanan proteine ait amino asit dizisini (tek harfli kod formatında) ve genin nükleotid dizisini (cDNA) getirdiğine dikkat ediniz. Alternatif olarak, tarama kutucuğuna bir genin



ŞEKİL 3.21 İnsan ve Fare *ob* Genlerinin Karşılaştırılması Bu iki gen için kısmi diziler insan gen dizisi yukarıda, fare gen dizisi altta olacak şekilde gösterilmiştir.

veya ilgilendiğiniz potansiyel bir genin adını onun daha önce GenBank'a girilip girilmediğini görmek için yazabilirsiniz. (BLAST taraması, insan erken-devre meme kanseri geni *BRCA1* ile eşleşen bir veri bulacak; GenBank erişim numarası ile de aynı geni tanımlayacaktır).

GenBank, biyoinformatik çalışmaları için vazgeçilmez olan çok değerli veri tabanlarından sadece biridir. Tek-nükleotid polimorfizm verileri, BAC ve YAC kütüphane veri tabanları, amino asit dizilerini kataloglayan protein veri tabanları ve üç-boyutlu protein yapıları gibi alanlara özgü oluşturulmuş veri tabanları da vardır.

Destansı Bir Genom Klonlama Çalışması: İnsan Genom Projesi

Biyoteknoloji çalışmaları yönünden çok heyecan verici bir dönemde bulunmaktayız. Bu bölümde tanımlanan tekniklerden birçoğunun kullanıldığı **İnsan Genom Projesi (HGP)** gibi eşi görülmemiş bir projenin tamamlanmasına tanık olduğumuz için şanslıyız. HGP 1990'larda ABD Enerji Bakanlığı (DOE) tarafından başlatıldı. Başlangıçta 80 000-100 000 olarak tahmin edilen insan genlerinin tamamının uluslararası bir işbirliğine dayalı, 15 yıl sürecek bir çalışma ile tanımlanması hedeflendi. 24 insan kromozomundan (kromozom 1-22, X, Y) yaklaşık olarak 3 milyar baz çiftinin dizilemesi yapılacaktı. HGP aynı zamanda aşağıdaki hedefleri gerçekleştirmek için de tasarlanmıştır.

- İnsanlar arasındaki genetik farklılıkları tek-nükleotid polimorfizmlerini de (SNP'ler; bakınız Şekil 1.12) içerecek şekilde analiz etmek.
- Bakteri, maya, solucan, meyve sineği, fare ve benzeri **model organizmaların** genomlarını haritalamak ve dizilemek.
- Analiz kapasitemizi, gen yapısı ve fonksiyonu anlayışımızı geliştirmek için kullanılabilecek, yüksek-güçte otomatik dizileyiciler, bilgisayar teknolojileri, genom bilgileri için yaygın olarak kullanılabilen veri tabanları gibi yeni laboratuvar teknolojileri geliştirmek.
- Genom bilgilerini bilim insanları ve halkla paylaşmak.
- HGP ve genetik araştırmalarla ilgili sosyal, hukuki ve etik konuları değerlendirmek.

HGP'nin ABD'deki koordinasyonu NIH'in alt birimi olan İnsan Genom Araştırmaları Ulusal Merkezi ve DOE tarafından gerçekleştirildi. Proje mali olarak ABD'deki yedi büyük dizileme merkezi tarafından desteklendi. İlerleyen dönemlerde proje, 18 ülkeden bilim insanlarının katkılarıyla büyüyerek uluslararası bir çabaya dönüştü. Çalışma büyük ölçüde altı ülkedeki (Çin, Fransa, Almanya, İngiltere, Japonya ve ABD) 20 merkezde çalışan yaklaşık 3 000 bilim insanının katılımıyla Uluslararası İnsan Genom Dizi Konsorsiyumu tarafından gerçekleştirildi. Genomu tamamlamak için tahmin edilen bütçe 3 milyar dolardı (bir nükleotid için 1 dolar). Zaman içinde HGP'deki hükümet payı azalarak, tüm hedefler ve ilave hedefler zamanından iki yıl önce ve ayrılan bütçenin altında bir maliyete gerçekleştirildi. Bu başarı kısmen özel şirketlerin rekabetine, bilgisayar-otomasyonlu DNA dizileyicileri (Şekil 3.12'de gösterilen gibi) ve biyoinformatiğin gelişimine bağlı olmuştur.

Projenin en atılgan ortağı, *H. influenza* genomunu bu bölümde daha önce anlatılan shotgun klonlama ile dizileyen Genom Araştırma Enstitüsü'nün eski yöneticisi Dr. J. Craig Venter'in yönettiği, Celera Genomics adlı özel bir şirketti. Celera (şirketin adı "hız" anlamına gelen Latince sözcükten uyarlanmıştır) tüm insan genomunu, *H. influenza* genomu için uyguladıkları yönteme benzer, yeni bir shotgun tekniğiyle ve

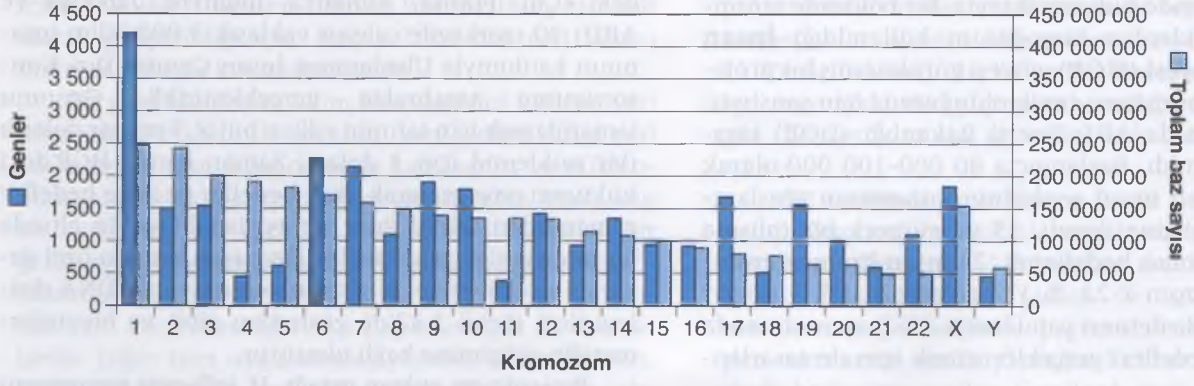
yeni geliştirilen yüksek-hızlı, bilgisayar-otomasyonlu bir dizileyici ile 3 yıl içinde gerçekleştirmeyi amaçladıklarını duyurdu. Özel şirketlerin genom bilgilerinin yayımını kontrol altına almaları her ne kadar korkutucu olsa da, HGP'ye katılan ABD hükümet grupları genomu tamamlamak pahasına özel gruplarla rekabetçi yarışa ayak uydurmak zorunda bırakıldılar.

1998 yılında, hızlandırılmış ilerlemenin bir sonucu olarak, Projenin bitiş tarihi 2003 olarak revize edildi. 26 Haziran 2000'de HGP ve Celera Genomics'in liderleri Başkan Bill Clinton ile bir basın toplantısı düzenleyerek insan genomunun kabaca bir "çalışma taslağı" olarak yaklaşık % 95'inin bir araya getirildiğini duyurdular (proje takviminden yaklaşık 4 yıl önce). 12 Şubat 2001 tarihinde düzenlenen ortak basın toplantısında, NIH Ulusal İnsan Genomu Araştırma Enstitüsü ve İnsan Genomu Projesi'nin yöneticisi Dr. Francis Collins ve Celera'dan Dr. J. Craig Venter, sırasıyla *Nature* ve *Science* gibi saygın dergilerde yayınlanan ve genom çalışma taslağı dizisinin ilk analizlerini tanımlayan makalelerin duyurusunu yaptılar. Bilim insanları sonraki 2 yılı, henüz tamamlanmamış parçacıkları dizileyerek genomdaki binlerce boşluğu doldurmakla, yanlış hizalanmış parçaları düzeltmekle ve genomun doğruluğunu sağlamak için dizileri karşılaştırarak geçirdiler. 14 Nisan 2003 tarihinde, Uluslararası İnsan Genomu Dizileme Konsorsiyumu çalışmalarını tamamladığını duyurdu. İnsan genomunun haritası hemen hemen tüm bazların doğru sıralarında tanımlanmasıyla ve her bir potansiyel genin hangi kromozoma ait olduğunun belirlenmesiyle büyük ölçüde tamamlanmıştı (**Şekil 3.22**).

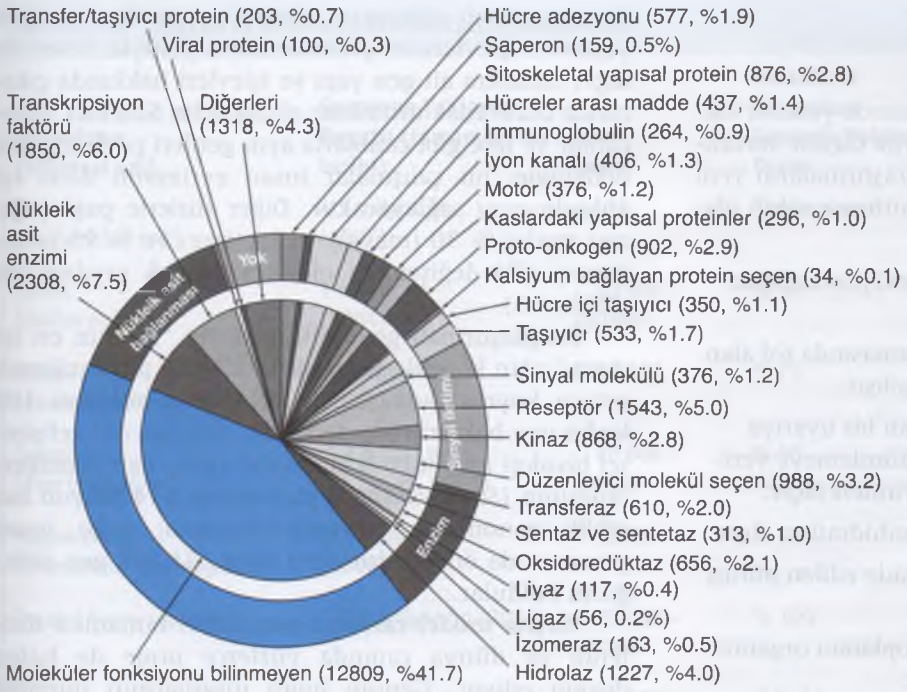
İnsan Genomundan Neler Öğrendik?

Projenin en şaşırtıcı bulgularından biri, insan genomunun tahmin edildiği gibi 100 000 genden değil, protein kodlayan yaklaşık 20 000 genden oluştuğuydu. Bu tahmin öncelikle insan hücrelerinin yaklaşık 100 000 ile 150 000 arasında protein yaptığı tahminine dayanıyordu. Genlerin gerçek sayısının tahmin edilen sayıdan çok daha düşük olmasının bir nedeni, birbiriyle benzer fonksiyonlara sahip çok sayıda gen ailelerinin bulunmasıydı. Buna ek olarak, çok sayıda genin alternatif uç birleştirme yoluyla birden fazla proteini kodladığı bulunmuştur. İnsan genlerinin % 92-95'inin alternatif uç birleştirme yoluyla birden fazla protein ürettiği tahmin edilmektedir.

Fonksiyonel kategorilere göre insan genlerinin analiz edilmesi genom bilimcilere farklı moleküler fonksiyonlara sahip genlerin sayıları hakkında bir fikir vermiştir. **Şekil 3.23** insan genlerine atfedilen fonksiyonlar için önerilen bir yorumun, fonksiyonu bilinen genlerin dizileri arasındaki benzerliğe dayandığını göstermektedir. Birçok gen enzim kodlarken, diğer büyük kategorilerdeki genlerin hücre içi, hücreler arası sinyalizasyon ve iletişimde rol oynayan proteinlerle, DNA ve RNA bağlayan proteinleri kodlaması şaşırtıcı değildir. Bu tahminin ayrıca şunu gösterdiğine de dikkat çekmeliyiz; son kanıtlar genlerimizin yarıdan fazlasının işlevinin bilinmediğini göstermesine rağmen, bu tahmine göre insan genlerinin yaklaşık % 42'sinin bilinen bir fonksiyonu bulunmamaktadır. Eğer genetik araştırmalarda bir kariyer yapmayı düşünüyorsanız bunu aklınızda tutmalısınız, çünkü bu genlerin fonksiyonu



ŞEKİL 3.22 İnsan Kromozomlarındaki Tahmini Gen Sayıları ve Baz Çifti (bp) Olarak Yaklaşık Boyutları Şekildeki insan kromozomları hakkındaki veriler Sanger Enstitüsü, Omurgalı Genom Notları (VEGA - Vertebrate Genome Annotation) veri tabanındaki bilgilere dayanmaktadır. Gen sayısını gösteren değerin genelde insan gen sayısı olarak kabul edilen 20 000'den daha yüksek olmasının nedeni, gen sayılarının bir ölçüde tahminlere dayanmasındandır. Toplam kromozom uzunlukları da genomun dizilenmemiş, kodlama yapmayan bölümlerinin boyutuna dayanarak yapılan bir tahmindir.



ŞEKİL 3.23 Farklı Fonksiyonel Kategorilerdeki İnsan Genlerinden Bazıları İçin Atfedilen Fonksiyonlar Parantezlerde gösterilen yüzdeler Venter ve arkadaşları tarafından 2001 yılında yayınlanan 26 383 genden elde edilen verilere dayanmaktadır.

üzerinde yapılacak çalışmalar önümüzdeki yıllarda heyecan veren kariyer olanakları sağlayacaktır.

Aşağıda bilim insanlarının HGP sayesinde öğrendiği bazı temel kavramların önemli noktalarının özetini bulabilirsiniz:

- İnsan genomu yaklaşık 3.1 milyar baz çiftinden oluşur.
- Tüm ulusların bireyleri arasındaki genom benzerliği yaklaşık % 99.9 dur.
- Tek nükleotid polimorfizmleri (SNP'ler) ve **kopya sayısı varyantları (CNVs)** — genomdaki uzun silinmeler, eklenmeler ve duplikasyonlar gibi — insanlarda belirlenen genom farklılığından sorumludur.
- Genleri kodlayan genom oranı % 2'den daha azdır.
- DNA'mızın büyük çoğunluğu protein kodlamaz ve bunların en az % 50'si tekrarlayan DNA dizilerinden oluşur.
- Genom yaklaşık 20 000 protein kodlayan genden oluşur.
- İnsan genlerinin çoğu birden fazla proteini kodlayabilir. Böylece 20 000 genle en az 100 000 proteinin kodlanması mümkün olur.
- İnsan genlerinin yarıdan fazlasının fonksiyonları bilinmiyor.
- En çok gen kromozom 1'de bulunmaktadır. En az gen Y kromozomunda bulunur.
- İnsan genomundaki genlerin çoğu diğer organizmalardaki genlerle yüksek derecede benzerlik gösterir.
- İnsan hastalık genlerinin binlercesi tanımlanmış ve kromozomlardaki yerlerine haritalandırılmışlardır.

HGP'den nasıl faydalanacağız? İnsan genomunun tam dizisi, biyolojimiz ve davranışlarımızın bilimsel anahtarlarını içeren, insanlığın genetik "planı" ("blueprint") olarak tanımlanmaktadır. İnsan genlerinin *nasıl* ve *ne* yaptıklarının anlaşılması bunların tümünün belirlenmesinden daha önemlidir. Uzun zamandan beri insanların tüm genlerinin fonksiyonları tam olarak anlaşılamadı. HGP'nin ilk katkılarından biri insanlarda genetik hastalıklarla ilişkili genlerin belirlenmesi olacaktır. HGP'nin genetik hastalıkların tanı ve tedavilerini nasıl değiştirdiğine dair bazı örnekleri Bölüm 11'de vereceğiz. Birçok hastalığın genetik temelinin daha iyi anlaşılması, hastalıkların saptanması ve yenilikçi tedaviler için yeni stratejilerin geliştirilmesine olanak sağlayacaktır. HGP'yle ilgili güncel bilgiler, seçkin hedefleri gözden geçirmek, dizileme ve haritalama teknolojileri, HGP ile ilgili etik, yasal ve sosyal konulara göz atmak için Rehber İnternet Sitesinde listelenen insan genom sitelerini ziyaret ediniz.

İnsan Genom Projesi "Omik" Devrimini Başlattı

HGP ve genomik, biyolojik araştırmalarda yeni bir alanın – "omik"lerin – doğuşundan büyük ölçüde sorumludur. Neredeyse her yıl biyolojik araştırmaların yeni veya mevcut alanları bir omik bağlantısına sahip olarak tanımlanmaktadır. Örneğin:

- Proteomik — bir hücrenin içindeki proteinlerin hepsini çalışır.
- Metabolomik — hücre metabolizmasında rol alan proteinleri ve enzimatik yolları çalışır.
- Metabonomik — hücre tarafından bir uyarıya (ilaç tedavisi gibi) ve genetik güdümlemeye verilen yanıtla üretilen metabolik ürünleri ölçer.
- Glikomik — bir hücredeki karbonhidratları ölçer.
- Transkriptomik — bir hücrede ifade edilen bütün genleri çalışır.
- Metagenomik — bir ortamdan toplanan organizmaların genomlarını analiz eder.
- Farmakogenomik — özel bir durum için kişinin genetik profilini temel alarak ilaç tasarlar.

Omik alanlarından herhangi biri ilginizi çektiyse, bu konular üzerinde İnternet taraması yaptığınızda ne kadar çok bilgi olduğunu göreceksiniz. Bu kitapta omik alanlarından pek çoğuna değineceğiz. Genomiğin etkilerine diğer bir kanıt, beslenme genomiği veya **nütrigenomik** olarak adlandırılan, gıda biliminde yeni bir alanın ortaya çıkmasıdır. Nütrigenomik diyet ve genler arasındaki etkileşime odaklanmıştır. Bazı şirketler farklı tıbbi durumlarla veya besin metabolizmasıyla ilişkili olduğu düşünülen genler için mikrodizin veya diğer genetik testlerle genotipinizin analizini yaparak nütrigenomik testleri oluştururlar. Bu şirketler daha sonra genlerinizden temel alan hastalıkları önlemek ve sağlığınızı iyileştirmek için uygulayabileceğiniz diyet değişikliklerini içeren, size özel, bir beslenme raporu oluştururlar. Nütrigenomiğin bilimsel olarak geçerli bir yaklaşım olup olmadığı konusu bilim insanları arasında tartışma konusudur.

Karşılaştırmalı genomik

İnsan genomunun çalışılmasına ek olarak, HGP'nin birçok model canlı genomlarının haritalanması ve dizilenmesini kapsadığını öğrenmek sizi şaşırtabilir. Bu modeller arasında *E. coli*, *Arabidopsis thaliana* olarak adlandırılan model bir bitki, maya *(Saccharomyces cerevisiae)*, meyve sineği *(Drosophila melanogaster)*, solucan *(Caenorhabditis elegans)* ve fare *(Mus musculus)* gibi canlılar vardır. Bu model canlılara ait tüm genom dizileri, **karşılaştırmalı genomik** çalışmaları için son derece yararlı olmuştur. Model genomlardaki gen yapısı ve işlevlerinin çözümlenmesi yoluyla, insan ve diğer canlılara ait gen yapı ve işlevleri hakkında çıkarımda bulunmak mümkün olmaktadır. Sinekler, solucanlar ve fare gibi canlılarla aynı genleri paylaşmamız nedeniyle, bu çalışmalar insan evriminin daha iyi anlaşılmasını sağlayacaktır. Diğer türlerle paylaştığımız genler % 30 (maya), % 80 (fare) ve % 95 (şempanze) gibi değişebilen oldukça yüksek sayılardadır (Tablo 3.3).

Karşılaştırmalı genomik analizler "insanın en iyi dostu" olan köpekle yaklaşık % 75 geni paylaştığımızı ortaya koymaktadır. İnsan DNA'sında bulunan 100 kadar gen bakterilerde de vardır. Araştırıcılar gelişimsel biyoloji için önemli bir model canlı olan denizkestanesinin *(Strongylocentrus purpuratus)* 814 milyon baz çiftlik genomunu tamamladıklarında; çoğu insan genomunda önemli işlevlere sahip, 23 500 gen olduğunu buldular.

Birçok model canlının genomları tamamen dizilendi ve dünya çapında yüzlerce proje de halen devam ediyor. Genom bilim insanlarının önerdiği 10 000 vertebralı genomunun dizilemesi, **Genom 10K planı** olarak adlandırıldı. Bu iddialı plan, yaklaşık her güne bir genom olmak üzere 5 yıl içerisinde 10 000 genomu tamamlamayı önermektedir. İlk ağaç genomu dizilemesi, bir kavak türü olan siyah kavakta, birkaç yıl önce tamamlandı. Bugüne kadar bir genomda bulunan en fazla sayıda gen 45 555 olarak bu ağaçta saptandı. Bilim insanları bu projeden elde ettikleri verilerin ormancılık sektöründe daha iyi ürünlere (biyoyakıtlar ve atmosferdeki karbondioksidi daha yüksek düzeylerde yakalayabilen genetiği değiştirilmiş kavaklar) katkı sağlayacağını bekliyorlar. Balarısı genomu da tamamlandı ve bu proje bilgileri arı genetiği ve davranışlarının anlaşılması ile bal endüstrisine yardımcı olmanın yanı sıra, arı toksinlerinin nasıl alerjik tepkilere yol açtığını anlamamıza da katkı sağlayacaktır.

Genomik projeleri bu kitabın diğer bölümlerinde de tartışılacak ve birçok genomik uygulamasını öğreneceksiniz. Örneğin 5. Bölümde içinde yaşadığımız hava, su ve toprakta **(metagenomik)**, insanlarda **(İnsan Mikrobiyom Projesi)** yaşayan mikroplar dâhil, kelimenin tam anlamıyla, yüzlerce yeni tanımlanan mikroba ait genomların dizilenmesini tartışacağız. Yapay olarak yapılandırılmış genomlardan, yeni yaşam formları yaratmak üzere tasarlanmış **yapay genom** yaklaşımlarını da tartışacağız.

Taş Devri Genomiği

Birkaç laboratuvarın "antik" DNA analizi yapmaya başlaması genomikle ilgili diğer bir ilginç örnektir. Bu çalışmalar onbinlerce yıllık fosil örneklerinden, kemik ve diğer dokulardaki eser miktardaki antik DNA'dan

TABLO 3.3 SEÇİLMİŞ GENOMLARIN KARŞILAŞTIRILMASI

Organizma (bilimsel adı)	Genomun Yaklaşık Boyutu (tamamlanma tarihi)	Gen Sayısı	İnsanlarla Paylaşılan Genlerin Yaklaşık Oranı	Genom Veri Tabanları Web Erişimi
Bakteri (*Escherichia coli*)	4.1 milyon bp (1997)	4 403	Saptanamadı	www.genome.wisc.edu/
Tavuk (*Gallus gallus*)	1 milyar bp (2004)	~ 20 000 – 23 000	% 60	http://genomeold.wustl.edu/projects/chicken
Köpek (*Canis familiaris*)	6.2 milyar bp (2003)	~ 18 400	% 75	http://www.ncbi.gov/genome/guide/dog
Şempanze (*Pan troglodytes*)	~ 3 milyar bp (ilk taslak, 2005)	~ 20 000 – 24 000	% 96	http://www.nature.com/nature/focus/chimpgenome/index.html
Meyve sineği (*Drosophila melanogaster*)	165 milyon bp (2000)	~ 13 600	% 50	www.fruitfly.org
İnsan (*Homo sapiens*)	~ 2.9 milyar bp (2004)	~ 20 000 – 25 000	% 100	www.doegenomes.org
Fare (*Mus musculus*)	~ 2.5 milyar bp (2002)	~ 30 000	~ % 80	www.informatics.jax.org
Bitki (*Arabidopsis thaliana*)	119 milyon bp (2000)	~ 26 000	Saptanamadı	www.arabidopsis.org
Tavşan (*Rattus norvegicus*)	~ 2.75 milyar bp (2004)	~22 000	% 80	www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/rat
Yuvarlak solucanlar (*Caenorhabditis elegans*)	97 milyon bp (1998)	19 099	% 40	genomeold.wustl.edu/projects/celegans
Maya (*Saccharomyces cerevisiae*)	12 milyon bp (1996)	~5 700	% 30	genomeold.wustl.edu/projects/yeast.index.php

şaşırtıcı veriler üretmektedir. 2 400 yaşındaki Mısırlı mumya, mamutlar, ornitorenkler, Pleistosen dönemi mağara ayıları ve Neandertallere ait DNA'ların analizi **paleogenomik** olarak da bilinen **Taş Devri genomiğinin** en belirgin örnekleridir.

Kanada McMaster Üniversitesi ve Pennsylvania Eyalet Üniversitesi'nden araştırıcılar, 27 000 yaşında tüylü bir mamuta ait kısmi dizi verilerini (yaklaşık 13 milyon baz çifti) yayınladılar. Bu çalışma mamutlar ve Afrika filleri arasında yaklaşık % 98.5 dizi benzerliği olduğunu gösterdi. Başka bilim insanları tarafından mamut genomuna veri sağlamak amacıyla yapılan bir sonraki çalışmada, tüm-genom shotgun dizileme ile Sibirya mamutu mitokondriyal ve nüklear DNA'ları analiz edildi. Bu çalışmalar mamut ve Afrika fili genomları arasında sadece % 0.6 farklılık olduğunu gösterdi. Bulgular DNA'nın doğru koşullarda (donmuş olarak) saklandığında ne kadar dayanıklı olduğuna dair en önemli kanıt olarak gösterilmektedir. Ayrıca insan ve mamut genomları arasında çok şaşırtıcı bir benzerlik ortaya çıktı! İnsan kromozomundan elde edilen dizilerle mamut genomundan elde edilen diziler hizalandığında otozomlardaki insan genleriyle mamut genleri arasında yaklaşık % 50'lik bir benzerlik görüldü.

2009 yılında, Alman Max Planck Evrimsel Antropoloji Enstitüsü'nden Svante Pääbo liderliğinde bilim insanlarından oluşan bir ekip ve 454 Life Sciences, Neandertal (*Homo neanderthalensis*) genomunun yaklaşık üçte ikisini kapsayan 3 milyar baz çiftinden fazla Neandertal DNA'sım taslak bir rapor olarak sundular. 2006 yılında, Pääbo ekibi, Amerika Birleşik

Devletleri'nden bir grup bilimci ile birlikte, Hırvatistan'da bulunan 38 000 yaşındaki Neanderthal kemik örneğinden elde edilmiş hücresel DNA'nın yaklaşık 65 000 baz çiftlik ilk dizisini bildirdiler. Neandertaller ve insanlar yakın akraba olduklarından, Neandertal genomunun dizilenmesi karşılaştırmalı genomik yardımıyla insanlar arasındaki evrimsel ilişkileri anlayabilmemiz için büyük bir fırsat sunmaktadır.

İnsan ve Neandertal genleri % 99 benzerlik gösterir. Bu dizilerin bazıları bilişsel gelişimi ve sperm hareketliliğini kapsamaktadır. Bu türler arasında paylaşılan, *FOXP2*, konuşma ve dil becerisi ile bağlantılı bir gendir. Konuşmayı etkileyen çok sayıda gen olduğundan, bu bulgu Neandertallerin bizim gibi konuştuğunu göstermez. Ancak Neandertallerin modern insandaki *FOXP2* ile aynı gene sahip olması nedeniyle, bilim insanları Neandertallerin dil yeteneğine sahip olduklarını tahmin etmektedir. Modern insan ve Neandertallerin 30 000 yıl önce birbirine yakın dönemlerde yaşamış olmaları aralarında etkileşimler olduğunu düşündürmektedir. Genom çalışmaları Neandertaller ve modern insanların yaklaşık 45 000 ila 80 000 yıl önce doğu Akdeniz'de birbirleriyle çiftleştiğini göstermektedir. Bu heyecan verici araştırmaların, daha önce imkânsız olduğu düşünülen, insan evriminin pek çok alanında etkileri ortaya çıkacak ve bu çalışmaların gelişimini izlemek gerçekten ilginç olacaktır.

HGP'den 10 Yıl Sonra: Sırada Ne Var?

İnsan genomunun taslak dizisinin tamamlanmasından bu yana 10 yıl geçti ve insan genomu ile ilgili çalışmalar çok hızlı bir tempoda devam ediyor. HGP'nin bir sonucu olarak, insan genomu araştırmaları için diğer birçok önemli alan ortaya çıkmıştır. Bunlar; kanser genom projeleri, epigenomun analizi (farklı doku ve hücrelerde yüzlerce epigenetik harita oluşturarak epigenetiğin karmaşık hastalıklardaki rolünün değerlendirilmesini amaçlayan **İnsan Epigenom Projesi**), SNP'lerin karakterizasyonu (**Uluslararası HapMap Projesi**), genom varyasyonu, hastalık ve farmakogenomik uygulamalarda CNV'lerin rolünün incelenmesidir. HGP tamamlanırken, yaklaşık üç düzine araştırıcıdan oluşan bir ekip **DNA Elementleri Ansiklopedisi Projesini (ENCODE)** başlattı. ENCODE'un temel amacı; deneysel yaklaşımlar ve biyoinformatiğin yardımıyla insan genlerinin ekspresyonunu düzenleyen işlevsel elementleri (örneğin transkripsiyonel başlangıç noktaları, promotörler ve hızlandırıcılar gibi) tanımlamak ve çözümlemektir. Burada insan genomu ile ilgili iki önemli araştırma projesi alanını tartışacağız: kişiselleştirilmiş genom projeleri ve kanser genom projeleri.

Kişiselleştirilmiş Genom Projeleri

Dizileme teknolojilerindeki hızlı gelişmeler nedeniyle bazı şirketler, tek tek insanlar için bile, genom dizilemesi ya da **kişiselleştirilmiş genomik** önermektedir. 2006 yılında X Ödülü Vakfı, 10 milyon dolarlık Genomik Archon X Ödülü'nü ilan etti. Vakıf 100 insan genomunu yüksek doğruluk derecesiyle 10 gün içerisinde dizileyecek teknolojiyi geliştiren ilk grubu ödüllendireceğini açıklamıştı. Başka gruplar ise kişiselleştirilmiş genom dizileme maliyetini genom başına 1 000 dolara düşürmeye çalışıyorlar. Genom dizileme maliyetini makul düzeylere getirme çabaları artık insanların kendi genetik planlarını bilmeyi istediklerinin bir kanıtıdır.

2007 yılında 454 Life Sciences şirketi Baylor Üniversitesinden araştırıcılarla birlikte James Watson'un (DNA yapısını bulan kişilerden) genomunu yaklaşık 1 milyon dolara dizilediler (Jim Projesi). 454 Life Sciences Jim Projesi'nin yeni nesil dizileme teknolojilerini geliştirmek ve tanıtmak için çok iyi bir yol olduğuna karar verdi. James Watson 2005'de 454 bilim insanlarına kan verdi. 2007'nin ortalarında yaklaşık 1 milyon doların altında bir maliyete genom dizilemesi tamamlanarak iki DVD halinde kendisine teslim edildi. Watson, apolipoprotein E geni *(ApoE)* hariç kendine ait dizilerin araştırıcıların erişimine açık olmasına izin vermiştir. *ApoE* gen mutasyonları Alzheimer hastalığına yatkınlığı gösterebilir. İnsan genomu öncüsü Craig Venter da kendi genomunu Craig J. Venter Enstitüsü bilim insanlarına dizilettirdi.

George Church ve Harvard Üniversitesi'ndeki meslektaşları, ortaya çıkan genom verilerinin kamuya açık olacağını bildirerek **Kişisel Genom Projesini (PGP)** başlattı ve DNA sağlamak üzere gönüllüleri toplamaya başladılar. Church'un genomu tamamlandı



KARARI SİZ VERİN

Dizilemek veya Dizilememek?

2010 yılı başından itibaren, onüç bireysel insan genom dizisi rapor edilmiştir. Bunlar bir Yoruba Afrikalısı, kuzeybatı Avrupa kökenli iki kişi, bir Han Çinlisi, iki Koreli, Afrikalı Başpiskopos Desmond Tutu, dört kişilik bir aile ve diğerleri olmak üzere rapor edilmiştir. Siz de genomunuzun dizilenmesini ister miydiniz? Bunun için ne kadar para öderdiniz? Dizi bilginizle ne yapardınız? Dizi bilginize kimler erişebilmeli? Kararı siz verin.



KARİYER PROFİLİ

Biyofarmasötik Sektöründe Kariyer Seçenekleri: Bir Lisansüstü Mezunundan Öneriler

Biyofarmasötik şirketleri yeni ilaç tedavileri keşfeder ve bunları ticari üretim, pazarlama ve nihayet satışla bağlantılı olan araştırma ve geliştirme aşamalarıyla geliştirirler. Geleneksel ilaç endüstrisini biyofarmasötik sektöründen ya da "biyo-ilaç"tan farklı kılan nedir? Genel olarak ilaç firmaları, hastalıkları genel yollarla tedavi eden kimyasal temelli ilaç bileşikleri geliştirirler. Buna karşın biyofarma, biyolojik sistem bilgilerini kullanarak, biyolojik olarak türetilmiş ve hastalık tedavisi için çok özel olan ilaç bileşikleri geliştirir. Biyofarma henüz ilaç endüstrisinden çok daha küçüktür. Ancak hastalıkların tedavisindeki potansiyel etkinliği ve çaresiz olduğu düşünülen hastalıklar için alternatif olabileceğine dair artan bilinç, büyümesini tetiklemektedir. Geleneksel ilaç şirketleri ve biyofarma arasındaki çizgiler bulanıktır. Birçok büyük ilaç şirketi biyofarma alanında çalışan biyoteknoloji bölümlerine sahiptir. Örneğin Roche ilaç şirketi 2009'da Genentech'i satın almıştır.

Biyofarmasötik sektöründe kariyer yolları, ilaç geliştirme yöntemlerinin benzerliği nedeniyle ilaç sektöründekine benzer. Kariyer olanakları geniş kapsamlı olmakla birlikte, bir biyofarmasötik şirketinde iş bulmak kolay değildir. Bir kişi, bir konum için ne kadar uygun olursa olsun, her zaman onun kadar nitelikli bir başkasının varlığı rekabeti sertleştirmektedir. Bu nedenle, alanınızı seçtikten hemen sonra kariyer seçenekleri hakkında düşünmeye başlamalısınız. Başlamak için en iyi yol sektöre aşina olmaktır. Rehber İnternet Sitesinde anılan web siteleri birçok farklı iş olanakları hakkında bilgi edinmek için mükemmel kaynaklardır. Bu bilgi eğitiminizi belirli bir iş fonksiyonuna daha iyi hizmet verecek şekilde özelleştirerek rekabetin önünde yer almanızı sağlayacaktır.

Birçok başlangıç seviyesi pozisyonları, ön lisans ve lisans derecesi olanlar için uygundur; ancak bir lisans derecesine sahip olmak, biraz daha yüksek bir başlangıç maaşını garanti edecektir. Birçok yüksek ücretli giriş seviyesi pozisyonlar yüksek lisans ya da doktora gibi ileri dereceler gerektirir. Bunları bilmek işgücüne girmeden önce eğitime devam etme konusundaki kararınızı büyük ölçüde etkileyebilir. Ancak işverenler için akademik eğitim kadar önemli olan diğer şey, sürekli talep ettikleri deneyimli elemanlardır. Çalışmalarınızı tamamlarken gönüllü çalışma, bağımsız araştırma çalışması veya bir stajla gerçek yaşam deneyimi kazanmak, seçeneklerinizi keşfetmeniz için çok iyi fırsatlar sunabilir. Endüstri stajları bir şirketteki farklı rolleri öğrenmek ve neyi istediğinizi anlamak için mükemmel bir yol olmasının yanında, mezuniyet sonrası iş bulmanızı da sağlayabilir.

Eğer mezun olduktan sonra sektörde ideal bir iş bulamazsanız, diğer bir seçenek bir biyofarmasötik şirketinde geçici olarak işe başlamaktır. Birçok iş ve işçi bulma servisi iş arayanlar ve biyoteknoloji şirketleri ile kısa süreli pozisyonlara eleman bulmak için çalışmaktadır. Ancak bu geçici pozisyonlarda işinizi iyi yaparsanız, şirket sizin için kalıcı bir pozisyon oluşturabilir.

Bir iş konumu göz önüne alındığında, iş tanımını anlamak kadar o pozisyonun neleri gerektirdiğini anlamak da önemlidir. Birçok şirket elemanlarını laboratuvar teknisyeni olarak işe alır, ancak bazı pozisyonlar için iş tanımları oldukça karmaşıktır. Örneğin, kalite kontrol laboratuvar teknisyenleri bir ürünün kalitesini test etmek için çok kontrollü ve son derece hassas yöntemleri izleyerek, ana görevleri olan, iyi bir ürünün elde edilmesini güvence altına alırlar. Bir tanı sistemini çalıştıran teknisyenler, yeni bir ürünün veya yöntemin test edilmesinden sorumludurlar. Önce doğru çalışıp çalışmadığını kontrol ederler, eğer doğru çalışmıyorsa geliştirilmesi için öneriler getirirler. Araştırma geliştirme veya keşif alanlarında çalışan teknisyenlerin ana işlevi; yeni bir ürün geliştirmek ve mevcut ürünler için yeni kullanımlar bulmaktır. Bir laboratuvar teknisyeni olarak işe başlarken her deneysel testi veya laboratuvar uygulamasını bilmek gerekli değildir. İyi bir şirket her zaman belirli bir işi yapmak için bilmeniz gerekenleri öğretecektir. Ancak tüm laboratuvar teknisyenleri, iyi laboratuvar becerilerine sahip, organize, motive, detay odaklı ve en önemlisi istekli olmalıdır.

Biyofarmasötik sektöründe çalışmanın olası bir dezavantajı, tüm işin geliştirme, üretim ve ürünün satışı çerçevesinde tasarlanmış olmasıdır. Yaratıcılık ve özgünlük her zaman yaşamın günlük rutinine dâhil değildir. Tüm çalışmaların FDA kuralarına göre yapılması ve titizlikle belgelenmesi gerektiğinden, çalışma ortamı genelde çok iyi kontrol edilir. Ayrıca ürünler çalışma programlarının doğrudan bağlı olduğu biyolojik süreçlerle üretilir (örneğin, hücrelerin istenilen sayıya ulaşmalarının beklenmesi gibi). Bazı durumlarda bu kısa bir çalışma haftası veya daha az yapılandırılmış çalışma saatleri anlamına gelebilir.

Biyofarmasötik sektöründe her zaman değişen ve çalışanlardan çok ve verimli çalışmalarını talep eden yüksek tempolu bir iş ortamı vardır. Her yeni günün yeni engeller ve zorluklar getirmesi bu sektörde çalışmayı heyecan verici kılar.

Katkı: Robert Sexton (BS, Biology, MBA, Monmouth Üniversitesi), Onkoloji Geliştirme Operasyonları, Novartis İlaç Şirketi.

ve online erişime açıldı. Watson ve Venter genomları tamamlandığından bu yana, yaklaşık 4 000 yaşındaki bir Paleo-Eskimo'nun donmuş toprakta korunmuş saçlarından elde edilen ilk bireysel "antik" insan genomu dizilendi. Bu çalışmada diploid genomun % 78'i kurtarıldı ve birçok ilginç SNP ortaya çıktı (bunların % 7'si daha önce rapor edilmemişti).

Kanser genom projeleri

Kanser pek çok genetik bileşeni olan bir hastalıktır. NIH, kanser oluşumunda rol oynayan önemli gen ve genetik değişiklikleri haritalamayı amaçlayan **Kanser Genom Atlası Projesi (TCGA)** olarak adlandırılan bir proje üzerinde çalışmaya başladı. TCGA projesi bugüne kadar çeşitli kanserler için 100'den fazla kısmi genomu diziledi. Uluslararası Kanser Genom Konsorsiyumu (JCGC) olarak adlandırılan 11 ülkeden bir grup araştırıcı ile birlikte, 20'den fazla farklı kanser türünü temsil eden 500'ün üzerinde tümör örneğine ait genomları dizilemeyi planladılar. Beklendiği gibi en yaygın kanserler meme, akciğer, kolon, pankreas, beyin ve yumurtalık kanserleriydi ve ilk bunlar analiz edildiler. Sonuç olarak tümör oluşumu ve yayılmasında (metastaz) kilit rol oynayan genlerin tanımlanmasıyla, kanser saptanmasında kullanılan tanı yöntemlerinin geliştirilmesi ve kanser tedavisi için daha etkili tedavi yöntemleri mümkün olacaktır (Bölüm 11'de bu durumların gerçekleştiği örnekleri tartışacağız).

BİR FARK YARATMAK

Rekombinant DNA teknolojisinin yaşam kurtarmadaki başarılı örneklerinden biri, insan hastalıklarının tedavisindeki ilk uygulamalarıdır. Bu bölümün başlarında Humilin olarak adlandırılan, insülinin rekombinant formunun, FDA tarafından onaylanan ilk rekombinant DNA teknolojisi ürünü olduğu tartışıldı. Rekombinant insülinden önce insülin hayvanlardan elde edilirdi. Hayvan kökenli insülin birçok diyabetlide etkisizdi ve bir dizi komplikasyonlara yol açardı. Rekombinant insülini üretmek kolay değildi (bakınız Şekil 5.9). İnsülin iki farklı polipeptid zincirinden oluşur. Her iki polipeptid rekombinant formda ifade edildikten sonra aktif form için birleştirilmek zorundaydı. Bu teknolojinin ilk ürünü olarak, böyle zorlu bir rekombinant proteinin başarıyla oluşturulmasının çok önemli bir beceri olduğunu söylemeye gerek yok. Kompleks bir proteinin rekombinant yaklaşımla üretilebileceğinin gösterilmesi, bilim insanlarını rekombinant DNA yaklaşımlarının tedavi değeri taşıyan başka proteinlerin üretimine de uygulanabileceği konusunda son derece iyimser yaptı. Humilin ilk olarak Genentech tarafından geliştirildi ve Eli Lilly ve Company şirketi tarafından üretilerek pazarlandı ve günümüzde hala üretilmektedir. 1982 yılında kullanılmaya başlandığından bu yana, Humilin milyonlarca hastanın tedavisinde başarı ve güvenle kullanılmaktadır. Dünyada insüline bağımlı diyabet hastalarına uygulanan insülinin büyük çoğunluğu rekombinant insülindir. Günümüzde Humilin'in birçok varyasyonları vardır. Bunlar, insülinin enjekte edildikten sonra yavaş veya hızlı emilmesini belirleyen farklı karışımlar halindedir. Son zamanlarda araştırıcılar, rekombinant insülinin biyoüretim maliyetlerinde dramatik düşüşler sağlayacağı beklenen, bitkilerde üretim teknikleri üzerinde çalışmaktadırlar. İnsülinin öyküsü rekombinant DNA tekniklerinin insanların ağrı ve acılarının hafifletilmesinde nasıl fark yarattığına dair seçkin bir örnektir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz..

1. Gen klonlama, rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliği arasındaki farkları ve ilişkileri her bir süreci tanımlayarak tartışınız. Her bir yaklaşım için bu bölümde tanımlanan örneklerden veriniz.
2. Rekombinant DNA deneyinde DNA ligazın önemini tanımlayınız. Bu enzimin görevi nedir ve hangi yönlerden restriksiyon enzimlerinden farklıdır?
3. Laboratuvarınız dölleme yeteneği kontrolünde etkili olduğu düşünülen bir rat geninin dizilemesiyle görevlendirildi. Erkeklerde (insan) fertiliteyi kontrol eden benzer bir gen olabileceğini düşünüyorsunuz. Bu rat geni hakkında bildiklerinizi PCR testiyle komplementer insan genini klonlamak için nasıl kullanacağınızı kısaca açıklayınız. Deneysel yaklaşımınızı ve gereken laboratuvar malzemelerini belirtiniz. Ayrıca klonladığınız rat geninin bir insan genine karşılık geldiğini doğrulamak için gerekli prosedürleri ayrıntılı olarak açıklayınız.
4. DNA klonlamada plazmid klonlama vektörlerinin hangi özellikleri onları yararlı kılar? Plazmid vektörlerinin farklı tiplerine örnekler vererek biyoteknolojideki uygulamalarını tartışınız.
5. PCR deneyine çift iplikçikli DNA'nın tek bir kopyasıyla başladığınızı varsayarsak, amplifikasyonun 15. döngüsünden sonra yaklaşık kaç molekül üretilmiş olur?
6. Genomik ve cDNA kütüphanelerini karşılaştırınız ve karşıt yönlerini belirtiniz. Adiposit (yağ) hücrelerinde obeziteye katkı sağladığı düşünülen bir proteini kodlayan geni klonlamayı hedeflediğinizde hangi kütüphane tipi ilk seçeneğiniz olurdu? Yanıtınızı açıklayınız. Promotör ve hızlandırıcılar gibi gen düzenleyici elemanların klonlanmasıyla ilgilendiğinizde ne tür bir kütüphane seçersiniz?

7. Online "Mendelian Inheritance in Man Site (OMIM)" sitesinde "Search the OMIM database" seçeneğini tıklayınız. Arama kutusuna *diabetes* yazın ve "Submit Search" seçeneğine tıklayınız. Ne buldunuz? Arama kutusuna 114480 yazarak tekrar tıklayınız. Şimdi ne oldu? Alternatif olarak ilginizi çeken bir geni tarayın ve OMIM'de neler bulabileceğinize bakın. Eğer OMIM sonuçlarınız çok karmaşıksa Rehber İnternet Sitesindeki NCBI adresinden "Genes & Disease" bölümünü ziyaret ediniz.

8. DNA dizilerinin yazılım analizi, gen yapısı üzerinde çalışan moleküler biyologların işini çok daha kolay hale getirmektedir. Bu etkinlik DNA analizi yazılım uygulamaları deneyiminizi geliştirmek için tasarlandı. Aşağıdaki çok kısa nükleotid dizisinin (GGATCCGGCCGGAATTCGTA) bir araştırma projesi için size gönderilen önemli bir genin bir iplikçiğini temsil ettiğini varsayın. Araştırmanıza devam etmeden önce bu DNA parçacığını kesen herhangi bir restriksiyon enzimi olup olmadığına bakabilirsiniz. Rehber İnternet Sitesinden Webcutter sitesine gidiniz. "Paste the DNA Sequence into the Box Below" cümlesini görene değin sayfayı aşağıya kaydırınız. DNA dizinizi bu bölümdeki kutucuğa yazınız. Sayfayı aşağıya doğru kaydırırken biri hariç tüm parametreleri olduğu gibi bırakınız. "Please Indicate Which Enzymes to Include in the Analysis" parametresinde ise "Only the following enzymes" seçeneğini tıklayınız. Açılan menüden *Bam*HI'i seçiniz. Sayfanın alt kısmına gidin ve "Analyze sequence" butonuna tıklayınız. Diziniz *Bam*Hl tarafından kesiliyor mu? Aşağıdaki soruları yanıtlamak için diziyi diğer kesim yerleri yönünden de analiz ediniz. Bu dizi *Eco*Rl ve *Sma*I tarafından kesilir mi? Veri tabanındaki tüm enzimlerin kesim yerlerini tararsanız ne olur?

9. Arizona Üniversitesi moleküler biyoloji bölümü "Biology Project" web sitesine gidiniz (adresini Rehber İnternet Sitesinde de bulabilirsiniz). Burada bulunan "Recombinant DNA Technology" bağlantısına erişip, rekombinant DNA teknolojisi sorularını çözerek bilginizi sınayınız.

10. Nütrigenomik için MyCellf DNA değerlendirme kiti pazarlayan Sciona firmasını Web'de arayınız. Büyük ölçüde kanıtlanmamış bilgilere dayanmasına rağmen, bu gibi kitlerin kullanılması gerektiğini düşünüyor musunuz?

11. Bir deoksiribonükleotid (dNTP) ve DNA dizi analizi için kullanılan bir dideoksiribonükleotid (ddNTP) arasındaki yapısal fark nedir?

12. İnsan Genom Projesi'nin çeşitli bulgularını anlatınız.

13. Modern biyolojide bir "omik" devrim yaşanıyor. Bu ne demektir?

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

4

Ürün Olarak Proteinler

Çeviren: Deniz EKİNCİ

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Endüstride biyoteknolojik olarak üretilen bazı enzimlerin kullanımını açıklayabilmelisiniz.
- Proteinlerin tıbbi uygulamalarına üç örnek verebilmelisiniz.
- Terkibinde üretilmiş proteinleri içerebilecek evde tüketilen ürünleri listeleyebilmelisiniz.
- Protein üretiminde bakteriyel, fungal, bitkisel ve hayvansal kaynakların avantaj ve dezavantajlarını tartışabilmelisiniz.
- *Escherichia coli*'nin protein üretiminde neden sıkça kullanıldığını açıklayabilmeli ve *E. coli*'nin sınırlamalarını tanımlayabilmelisiniz.
- Protein glikozilasyonunun neden bir protein ekspresyon sisteminin seçimini belirleyebileceğini açıklayabilmelisiniz.
- Hemoglobin gibi bir protein için genel bir protein saflaştırma şeması çizebilmelisiniz.
- Hedef bir proteinin verilen spesifik bir saflaştırma yoluyla diğer hücre proteinlerinden nasıl saflaştırıldığını açıklayabilmelisiniz.
- DNA dizisinden protein yapısını tahmin edebilmenin (proteomik) yararlarını tartışabilmelisiniz.



Laboratuvar şefi ticari bir biyolojik ürünü ayırmak için saflaştırma kolonu hazırlarken.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Biyoteknolojik olarak üretilen ilaçların tümü proteinlerdir. Yakın zamana kadar, saflaştırılmış protein molekülünün kimyası ilaç iletim yöntemini belirlemiştir (enjeksiyon, absorbsiyon, emilim veya diğer yollarla). Maalesef, bu iletim yöntemleri ciddi sistemik ve otoimmün yan etkilere yol açabilir. Geleneksel olarak enjeksiyonla verilen ve melanom, hepatit C ve insan papillomavirüsün (HPV) yol açtığı durumların tedavisinde onaylanmış olan interferon alfa-2b, süregelen sorunlu bir iletim yöntemi olan bir ilaca güzel bir örnektir. Yakın zamanda bu problemi ele almak amacıyla *HelixBioPharma* firması bir deri kremine uygulanmış proteinin zamanlanmış ve kontrollü bir şekilde salınımına imkân veren multilameller bir nanovezikül geliştirdi (vücut tarafından kolayca parçalanabilen çok katmanlı submikroskopik bir parçacık). Bu yüzeysel salınım, diğer geleneksel salınım yöntemlerinin yol açtığı ciddi yan etkileri gidermeye yardımcı olan interferon alfa-2b gibi büyük hidrofilik moleküllere uyarlanmıştır. Gelecekte, protein biyomolekülünün kimyasına adapte olmuş taşınma yöntemlerinin tasarımı biyomolekülün kendisinin keşfi kadar önemli olabilir.

Tropikal yağmur ormanları, okyanusların en derin noktaları, Yellowstone Ulusal Parkı'nın kaynayan gayzerleri ve balina iskeletleri gibi konular proteinlerin bilimsel araştırma sahasına girmektedir. **Proteinler**, canlı hücrelerin yapı, işlev ve düzenlenmesinde gerekli olan büyük moleküllerdir. Her protein molekülü hayatı devam ettiren biyokimyasal reaksiyonlarda eşsiz bir fonksiyona sahiptir. Araştırıcıların keşfettiği üzere, doğada oluşan proteinler büyümeyi yönetmede, kimyasal bozunma hızında ve hastalıktan korunmada sırları çözüyor.

Proteinlerin uygulamaları proteinlerin kendileri kadar çoktur. Balina iskeletlerine dikkat edilirse, doğal bozunma sürecinde kemikler çoğunlukla bakteriler tarafından kolonize edilir, bazısı özellikle kemiklerdeki yağ kalıntılarını sindirmek için özelleşmiştir.Yağları parçalamak için bakterilerin ürettikleri proteinler derin denizlerin soğuk sularına uyum sağlamaktadır. Araştırıcılar düşük sıcaklıklarda yağları çözebilecek bir maddenin ticari çamaşırhane deterjanları için harika bir katkı maddesi olacağını belirtmektedir.

Doğada bir proteinin keşfedilmesinden ve karakteriyle örtüşen bir uygulama bulunmasından sonra bile istenilen kalite ve miktarda ihtiyaç duyulan proteini üretmek bir hayli hüner ister. Örneğin, yeni bir soğuk su deterjanını seri olarak üretmeyi planlıyorsak, sadece balina iskeletleriyle iş yapamayız, onun yerine ihtiyaç duyulan proteinler için başka kaynaklar bulmalıyız. Neyse ki, biyoteknoloji hemen hemen tüm proteinlerin üretimine imkân vermektedir. Bu bölümde işte bu üretim süreçlerini ele alacağız.

2000 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), insan proteinlerinin yapısını aydınlatmak için 10 yıllık çaba ve 600 milyon dolarlık harcama sonucu oluşturulan Protein Yapı Girişimi'ni (PSI) ortaya koydu. PSI, üç boyutlu protein yapılarını belirlemede harcanan zamanı ve maliyeti azaltmak için amaçlanmış federal bir üniversite-endüstri işbirliğidir. PSI'nin başlangıçtaki hedefi, çoğu proteinin yapılarını onlara karşılık gelen DNA dizisi bilgilerinden kolayca elde edilmesini sağlamaktı. Bugünkü aşamada, 2010'dan bu yana araştırıcılar önemli biyolojik ve biyomedikal sorunları geniş bir yelpazede çalışmak için PSI'nin erken dönemlerinde başarıyla geliştirilmiş yüksek işlem hacimli protein yapı belirlemesini kullanmaktadır.

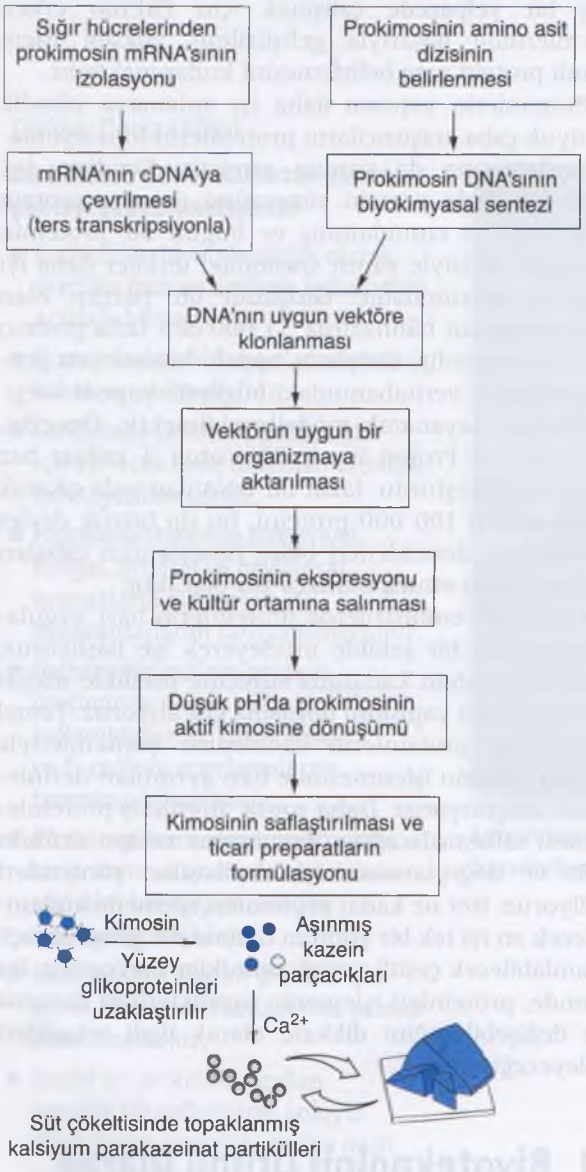
Proteinlerin yapısını daha iyi anlamaya yönelik bu büyük çaba araştırıcıların proteinlerin fonksiyonlarını anlamasına da yardım etmiştir. Şimdiye dek 1 200'den fazla protein süperailesi (benzer protein yapılı gruplar) tanımlanmış ve bugün bir proteinin amino asit dizisiyle yapısı arasındaki ilişkiler daha iyi anlaşılmış durumdadır. Girişimin bir parçası olan genel veritabanı hâlihazırda 33 000'den fazla protein dizisi içermektedir. Girişimin hedefi, bilinmeyen protein yapılarını veritabanındaki bilgilerle yapısal karşılaştırmalara dayanarak modelleyebilmektir. Örneğin, İnsan Genom Projesi insan DNA'sının 3 milyar baz çifti dizisini oluşturdu; fakat bu DNA'dan yola çıkarak tahmin edilen 100 000 proteini, bu tip büyük devlet girişimleriyle desteklenen bilim insanlarının çabaları olmadan tespit etmek oldukça zor olacaktır.

Biz çeşitli endüstrilerde proteinlerin bazı uygulamalarını hızlı bir şekilde inceleyerek işe başlıyoruz. Ardından, protein katlanma sürecine özellikle dikkat ederek, protein yapısının doğasına göz atıyoruz. Temel bilgi olarak, proteinlerin ifadelenme yöntemleriyle başlayıp, protein işlenmesinde bazı ayrıntıları derinlemesine araştırıyoruz. Daha sonra, üretilmiş proteinlerin nasıl saflaştırılacağını öğreniyoruz ve son ürünün analiz ve doğrulanması için kullanılan yöntemleri inceliyoruz. Her ne kadar proteinleri işlemede kullanılabilecek en iyi tek bir yöntem olmasa da, genel amaçlı kullanılabilecek çeşitli yararlı teknikler mevcuttur. Bu bölümde, proteinleri işlemenin inceliklerinin duruma göre değişebileceğini dikkate alarak ilgili teknikleri inceleyeceğiz.

4.1 Biyoteknoloji Ürünü Olarak Proteinler

Üretim süreçlerinde proteinlerin kullanımı zamanla kendini kanıtlamış bir teknolojidir. Örneğin, proteinlere dayalı çok eski gıda işleme çabalarından ikisi, bira mayalamak ve şarap üretmektir. Fermantasyon sadece

mayaların ürettiği enzimlere dayanmakla kalmaz, ayrıca ortama doğrudan eklenen diğer maddeler de önemlidir. Peynir yapımı daima proteinlerin kullanıldığı diğer bir gıda işleme endüstrisidir. Biyomühendislik sayesinde, eskiden protein kaynağı olarak peynir yapıcı enzimin temin edildiği danaların mideleri yerine, artık özel üretilmiş bakteriler kullanılmaktadır (**Şekil 4.1**).



ŞEKİL 4.1 Peynir Üretimi Peynirin temel bileşeni kazein, kimosin varlığında kimyasal bir dönüşüm ürünüdür. Bu enzim yüzyıllarca sütten kesilmemiş danaların mide duvarlarından elde edilmiştir. Bugün, kimosin imalatının % 80'i genetiği değiştirilmiş hücreler aracılığıyla yapılmaktadır.

Proteinlerin üretimdeki değeri uzun zamandır belirgin olmasına rağmen, rekombinant DNA teknolojisinin ilk olarak geliştirildiği ve talep üzerine istenilen spesifik proteinleri üretmenin mümkün hale geldiği 1970'lere kadar bu bilgi ilerletilememiştir. O zamandan beri protein üretimi geniş ve çeşitli endüstrilerde yeni ürünlerin geliştirilmesinde itici güç olmuştur.

Diğer endüstriler de biyomühendislik yoluyla işlenmiş proteinlerin hazır kullanımından yararlanmaktadır. Bu uygulamaların çoğu **enzimler** adı verilen protein grubunun kimyasal tepkimeleri hızlandırabilme yeteneklerine dayanır. Enzimler, deterjanların etkinliğini artırmak, sondaj işlemlerinde yağın akışkanlığını artırmak ve kontak lensleri temizlemek gibi sayısız amaçlara hizmet ederler. Enzimler üretimde büyük molekülleri-**depolimerizasyon** adı verilen bir işlemle- parçalamak için kullanılır. Bu enzimlere nişastayı parçalayan **amilaz** gibi glikozidazları (karbohidrazlar), diğer proteinleri parçalayan **proteazları** ve yağları parçalayan **lipazları** örnek verebiliriz (Tablo 4.1). Bu tarz enzimler (peynir için kimosin gibi) gıda ve içecek üretiminde ve endüstrilerde toptan üretimde kullanılır (bakınız Şekil 4.1).

Kimyasal mesajları taşıyan **hormonlar** ve organizmayı hastalığa karşı koruyan **antikorlar** ticari olarak öncelikle tıp endüstrisi için üretilen diğer iki protein grubudur. Hormonlar tarımda da kullanılmaktadır. Örneğin, hormonlar bitki köklenmesini uyarabilmekte ve damızlık hayvanların büyümesini hızlandırabilmektedir. Tarımda kullanılan hormonları daha sonra (Bölüm 6 ve 7) detaylı olarak tartışacağız.

TABLO 4.1 BAZI ENZİMLER VE ENDÜSTRİYEL UYGULAMALARI

Enzim	Uygulama
Amilazlar	Karbohidratları fermantasyonda ve işlemede parçalama
Proteazlar	Proteinleri sindirme, deterjanlar, et/deri, peynir, mayalama/pişirme, hayvan/insan sindirime yardım
Lipazlar	Süt ürünlerindeki lipitleri (yağları) ve bitkisel yağ ürünlerini sindirme
Pektinazlar	Meyve suyu/posadaki enzimleri sindirme
Laktazlar	Süt şekerini sindirme
Glukoz izomerazlar	Yüksek fruktoz şuruplarının üretimi
Selülazlar/ hemiselülazlar	Hayvan besinleri üretimi, meyve suları, mayalamada çeviriciler
Penisilin açilaz	Penisilin üretimi

Biyoteknolojik İlaçlar ve Diğer Tıbbi Uygulamaları

Biyoteknolojik proteinler geçtiğimiz yirmi yılda sağlık hizmetleri ve farmasötik sektörlerde köklü değişikliğe yol açmıştır. Şeker hastalığı gibi yaygın durumlardan Gaucher hastalığı gibi nadir vakalara kadar pek çok rahatsızlık eksik proteinin takviyesiyle tedavi edilebilmektedir. Diyabet durumunda insülin hormonu eksik olan proteindir. İnsülin önceleri domuz ve ineklerden elde edilirdi. Bu durum ideal değildi, çünkü insan vücudu çoğu zaman yabancı proteinleri reddetmektedir. Araştırıcılar *E. coli* bakterisi gibi farklı bir kaynağa yönelerek problemin üstesinden geldiler. *E. coli*'ye insan genleri ekleyerek mikroskopik insülin fabrikaları oluşturdular. (Proteinlerin bir kaynağı olarak genetiği düzenlenmiş organizmaların önemli kullanım alanlarına bu bölümde daha sonra ayrıntılı değineceğiz.) ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ilk rekombinant DNA ilacı olarak bu yeni insülini 1982'de onayladı. Bol miktarda insan insülini üretimi milyonlarca insanın sağlığını ve hayatını iyileştirmiştir. (Tablo 4.2'de diğer bazı protein tabanlı farmasötik ürünler listelenmiştir.)

Monoklonal antikorlar, kan proteinleri ve hastalıklarla savaşmada canlı organizmaların ürettiği enzimler gibi terapötik proteinler de biyoteknolojik ilaç olarak düşünülebilir. Diğer ilaçlardan farklı olarak bu ilaçlar sentetik olarak üretilmez (örneğin; bir bileşiğin belli zamanda eklenip kimyasal sentez yapılması), fakat genellikle mikrobiyal fermantasyon veya memeli doku kültürü yoluyla üretilir. Bugün, hâlihazırda 400'e yakın biyoteknolojik tedavi çalışması bulunmaktadır ve bunların büyük kısmı protein içermektedir. Eğer bu tedavi çalışmalarının küçük bir yüzdesi bile başarı sağlarsa, mevcut kullanımda olan yaklaşık 40 biyoteknolojik ilaca önemli katkılar sağlayacaktır.

Biyoteknolojik ilaç üretmek karmaşık ve zaman alıcı bir süreçtir. Araştırıcılar ilgili terapötik proteini sadece tanımlamak, gen dizisini saptamak ve biyoteknoloji kullanarak protein moleküllerini yeterli miktarda üretmek için bir yöntem geliştirmek için bile yıllar harcayabilir. Bu yöntem belirlenince, teknisyenler biyoreaktörlerde hassas ayarlı şartlarda terapötik geni içerecek şekilde transforme edilen konak hücrelerin büyütülmesiyle, protein ürünlerini geniş çapta imal edebilir (biyoreaktör, biyolojik materyal üretmek için tasarlanmış steril bir üretim tankıdır). Hücreler dengeli sıcaklık, oksijen, asitlik ve diğer değişkenlere sahip hassas kültür koşullarında hedef proteini üretmek için uyarılır. Uygun zaman aralığında proteinler kültür ortamlarından izole edilirler, tüm saflaştırma adımlarında test edilirler ve farmakolojik aktif ürünler olarak formüllendirilirler. Biyoreaktörleri denetleyen üretici teknisyenler sürecin her aşamasında FDA'nın düzenlemelerine ödünsüz bir şekilde uymalıdırlar (Bu düzenlemelerle ilgili örnekler için Bölüm 12'ye bakınız).

Sağlık sektöründe proteinlerin potansiyel kullanımına etkileyici diğer bir örnek olarak hasarlı korneaların tedavisi verilebilir. Kanada ve İsveçli araştırıcıların bir çalışması, biyosentetik kornealarının hasarlı göz

TABLO 4.2 BAZI PROTEİN TABANLI FARMASÖTİK ÜRÜNLER (ÇOĞU REKOMBİNANT PROTEİNDİR)

Protein	Uygulama Alanı
Eritropoetinler	Anemi tedavisi
İnterlökin 1, 2, 3, 4	Kanser tedavisi, AIDS; radyasyon veya ilaçla kemik iliğinin baskılanması
Monoklonal antikorlar	Kanser, romatoidartrit tedavisi; teşhis amaçlı
İnterferonlar (α, β, γ, mutabakatla)	Kanser, alerjiler, astım, artritis ve bulaşıcı hastalıkların tedavisi
Koloni-uyarıcı faktörler	Kanser tedavisi, düşük kan sayımı; destekleyici kemoterapi; AIDS terapisi
Kan pıhtılaşma faktörleri	Hemofili ve benzer pıhtılaşma hastalıklarının tedavisi
İnsan büyüma faktörü	Çocuklarda büyüme bozukluğu tedavisi
Epidermal büyüme faktörü	Yaralar, deri ülserleri ve kanser tedavisi
İnsülin	Tip 1 ve 2 şeker hastalığı tedavisi
İnsülin-benzer büyüme faktörü	Tip 1 şeker hastalığı tedavisi
Doku plazminojen faktörü	Kalp krizi tedavisi, inme (felç)
Tümör nekroz faktörü	Kanser tedavisi
Aşılar	Hepatit B, sıtma, uçuklara karşı aşılama

dokusunun yenilenmesine, onarılmasına ve görmeyi iyileştirmeye yardımcı olabileceğini göstermiştir. Bu keşif önemlidir, çünkü bu yaklaşım bağışlanmış insan kornealarının nakli için bekleyen milyonlarca insanın tekrardan görmesine yardımcı olabilir. İlgili çalışmada, hasarlı kornea dokusunun alınıp, çapraz bağlanmış rekombinant insan kollajeninden yapay olarak üretilmiş biyosentetik korneayla yer değiştirmesi için her hasta tek gözünden ameliyat olmuştur. Protein maya hücrelerinde üretilmiş ve denemeler için kimyasal olarak çapraz bağlanmıştır. 2 yıldan fazla süren gözlem sonucunda, araştırıcılar hastaların kendi kornealarının hücre ve sinirlerinin implantın içinde geliştiğini gözlemledi ve sonuç olarak normal, sağlıklı dokulara benzer "yenilenmiş" kornea oluştu. Biyosentetik kornealar ayrıca dokunmaya karşı hassasiyet geliştirmiştir. Pek çok hastada görme ilerlemiş ve kontakt lens taktıktan sonra da görme, klasik kornea nakliyle karşılaştırmaya değer bir nitelik kazanmıştır.

Arizona Devlet Üniversitesi Biyodizayn Enstitüsü'nden Joshua LaBear ve çalışma arkadaşları hastalıkla ilgili moleküllerin hızlı görüntülenmesinde yeni bir yöntem kullanarak, ileride meme kanserinin erken teşhisinde yardımcı olabilecek 28 biyomarkör proteini tanımladı. Yapılan çalışmalar kanserde üretilen proteinlerin vücudu sağlıklı bireylerde bulunmayan antikorları üretmede tetikleyebileceğini gösterdi. Bu "otoantikorlar" kanda ölçülebilir ve kanserin varlığını ortaya çıkarmada kullanılabilir. Meme kanseri çalışmasında küçük bir mikroskop slaytında binlerce farklı potansiyel biyomarkör proteinini çalışmak için protein mikroçipleri (mikrodizin) kullanıldı. Kanserli hastalarda antikorların tanıdığı fakat sağlıklı kadınlarda olmayan bu proteinleri aramak için küçük bir damla kan mikroçipe uygulanmıştır (bakınız kısım 4.4). Başlangıç çalışmalarından elde edilen sonuçlar potansiyel biyomarkör aday sayısını 5 000'den 761'e düşürmüştür. Sonuçta, bu 761 protein son 28 biyomarör proteini bulmak için kör araştırmada test edilmiştir. Hastalarda otoantikor biyomarkörleri yumurtalık, prostat, akciğer ve diğer pek çok kanseri tespit etmede kolayca kullanılabilir.

Gıda İşleme

Mutfağınızda proteinlerin endüstriyel kullanımlarına dair pek çok örnekler bulabilirsiniz. Onyıllardan beri gıda işleme endüstrisi bebek maması, konserve meyve, peynirler, pişmiş gıdalar, bira, tatlılar ve perhiz gıdaları geliştirmede enzimlere güvenmektedir. Zenginleştirmeler oldukça çeşitlidir.

Örneğin, ekmekte hamurun daha çabuk kabarmasına olanak vermede enzimler mayanın etkimesi için nişastayı uygun hale getirmede kullanılabilir. Sonuç olarak ekmek hamurunu işlemek daha kolay olur ve son malzeme daha kıvamlı olur.

Tekstil ve Giyim

Endüstriyel proteinlerin diğer örnekleri gardrobunuzun içindedir. Bir yüzyıldan uzun süredir enzimler tekstil endüstrisinde üretim işleminde kumaşları sertleştirmek için kullanılan şekerlerin yıkımında kullanılmaktadır. Enzimler ayrıca kumaşların rengini açmak ve yumuşatmak için kullanılan sert kimyasalların ve yöntemlerin yerini de almaktadır.

Proteinlerin tekstilde kullanımına ilgi çekici bir örnek, yakın zamanda örümcek ağı üzerine yapılan bir araştırmadır. Örümcek ağı iplikçikleri şaşırtıcı mekanik özelliklere sahiptir; çelikle karşılaştırılabilecek sağlamlıkta, Kevlardan daha dayanıklı ve pamuk veya naylondan daha az yoğundur. Fakat örümcekler endüstriyel ürünlerde kullanılmak üzere yeterli miktarda ipek üretemezler. Almanya'da araştırıcılar yakın bir tarihte örümcek ipliğinin harika özelliklerinden protein altbirimlerinin sorumlu olduğunu keşfetti. Bu bulgular örümcek ağı fiberlerinin mekanik doğasının daha iyi anlaşılmasını sağlamıştır ve bu ipeğe benzer yeni yapıların tasarlanmasında yararlı olabilir. Örümcek ağı genlerinin ihtiyaç duyulan proteinlerin üretilmesini sağlayabilecek konukçu organizmalara transferi gerçekleştirilmiştir ve yeni yapısal bilgiler yakında yeni ürünlere yol gösterecektir.



KARARI SİZVERİN

En İyi Ürün İçin Test: Ödemeyi Kim Yapmalı?

Bir ilacın markete çıkması yaklaşık 800 milyon dolara mal olmaktadır. Yan etkiye sahip veya tesirsiz olan onaylanmamış ilaçların araştırma bedelleri de bu fiyata dâhildir. Genellikle bu durumda saflaştırma süreci çoktan geliştirilmiştir ve ürün insan deneklere uygulanmış olur. İlaç fiyatlarının genelde yüksek olmasıyla birlikte, kısmen de olsa kabul edilmemiş ürünlerin araştırılma masraflarının bu fiyatlara yansıyacağı pek çok kişi tarafından hesaba katılmaz. Eğer bir ilacın pazara çıkış maliyetine her hasta için hangi ilacın en etkili olacağının belirlenmesinin (farmakogenetik) masraflarını da katarsak, maliyet oldukça yükselir (bakınız Bölüm 1). Biyoteknoloji firmalarının kendi hissedarları için kâr elde etmesi beklendiğinden, ilaç her hasta için tamamen uygun olmasa bile, ilaçların herkes tarafından alınması firma için daha kârlıdır. En iyi çözüm yolu nasıl olabilir; yüksek fiyatlar ve iyi ilaçlar mı, yoksa düşük fiyatlar ve her zaman işe yaramayabilen hatta negatif yan etkilere sahip olabilecek ilaçlar mı? Kararı siz verin.

Deterjanlar

Daha önceden belirtildiği gibi deterjanlara enzimatik içerik eklenince temizlik işini daha iyi yapmakta ve biyoparçalanabilirliği artırmaktadır. Çamaşırhane deterjanları proteazların, lipazların ve amilazların özgün rollerinden faydalanarak daha soğuk suda boyaları çözebilmektedir. Çoğu çamaşırhane boya çıkarıcılarının etiketlerine bakılırsa enzimlerin ilk sırada ve bazen de yalnızca aktif içerik olarak yazıldığı görülür.

Biyoremediyasyon: Çevre Kirliliğinin Proteinlerle Temizlenmesi

Endüstriyel işlemler sırasında üretilen kirlilik miktarını azaltmasının yanında, proteinler zararlı atıkların temizlenmesinde de kullanılabilir. Besiyerlerinin, evlerin ve iş yerlerinin organik atıkları, çevre için ve özellikle sucul ekosistemler için büyüyen bir tehlikedir. Enzimler böyle organik atıkları sorun oluşturmadan önce parçalamada kullanılabilir.

Proteinlerin umut vaadeden diğer bir uygulaması da civa ve kadmiyum gibi ağır metal kirliliğini nötralize edebileceğidir. Bu tehlikeli elementler doğada kararlılığını sürdürebilir ve besin zinciri yoluyla canlılara zarar verebilirler. Bu metaller enzimatik parçalanmaya direnç gösterirler, fakat bu durum proteinlerin metalleri nötralize etmede kullanılamayacağı anlamına gelmez (bakınız Bölüm 9). Bazı mikroorganizmalar **metallotiyonein**ler adı verilen ağır metalleri yakalayabilen tutucu yapılara sahiptir. Bu durumda kirleticiler parçalanmaz veya sindirilmez, fakat basitçe daha az tehlikeli hale gelirler. Zehirli metaller bakteriye bağlandığında bitki ve hayvanlar tarafından alınma olasılıkları azalır.

Araştırıcılar toksik maddelere saldırıp yok etmede yeni ve gelişmiş biyolojik yollar bulmak için genetik mühendisliğinin gücünü kullanmaktadır. Araştırma sürecinde bazen bakterideki genlerin yerleri rastgele değiştirilir ve bu durumda yeniden düzenlenmiş genlerden sentezlenen enzimler doğal olanlara göre daha az veya çok reaktif olabilir. Yani bilim insanları yeni ve daha etkili kirlilik-temizleyen proteinleri bulma umuduyla rastgele mutasyon ve değişim sürecini hızlandırmaktadır (Bölüm 9'da daha ayrıntılı anlatılmaktadır).

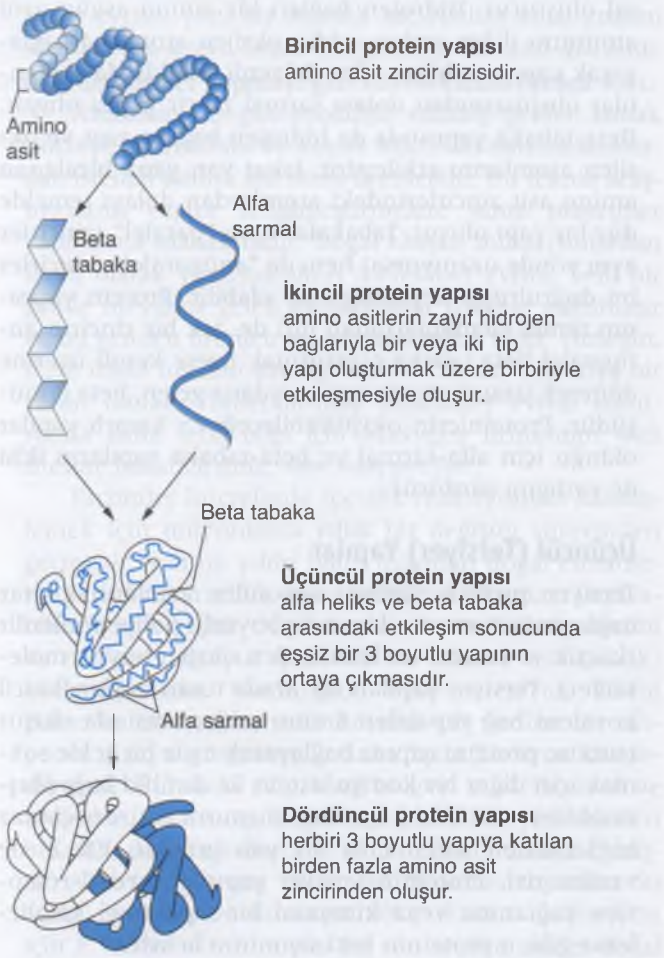
4.2 Protein Yapıları

Ribozomlar protein üreten fabrikalardır (Bölüm 2). Proteinlerin ekspresyon ve oluşumlarını anlayabilmek için proteinlerin moleküler yapılarına daha yakından bakmak gerekir.

Proteinler amino asit zincirlerinden oluşan kompleks moleküllerdir. Diğer moleküller gibi proteinler de özgün moleküler kütleye sahiptir. Diğer moleküllerle etkileşmesini sağlayan elektrik yüküne de sahiptirler. Bu etkileşme özelliği proteinlerin biyolojik aktifliğinin temelidir. Örneğin, bir amino asitin kimyasal yapısı ve elektrik yükü su ile etkileşimini belirler: Moleküller **hidrofilik** (suyu seven, su molekülleri tarafından çekilen) veya **hidrofobik**tir (su moleküllerinin ve amino asitlerin birbirini itmesi, suyu sevmeyen).

Yapısal Düzenlenme

Proteinler dört çeşit yapısal düzenlenmeye sahiptir. Bunlar birincil (primer), ikincil (sekonder), üçüncül (tersiyer) ve dördüncül (kuaterner) yapılardır (bakınız **Şekil 4.2**). Bir proteinin en son yapısı amino asitlerinin özgün kimyasal dizisine ve bu amino asitlerdeki yan grupların çeşitlerine göre şekillenir. (Bakınız Ek 2, amino asitlerin yan grupları).



ŞEKİL 4.2 Protein Yapısının Dört Düzeyi Tam bir işlevsel yetenek için proteinlerin uygun katlanması gereklidir. Saflaştırma yöntemleri bu uygun katlanmayı bozmamalıdır.

Birincil (Primer) Yapılar

Yaygın olarak bulunan 20 amino asit, proteinleri oluşturan temel elemanlardır. 10 ilâ 10 000 sayıda amino asit kuyruk gibi uzayarak bir protein dizisi oluşturmak üzere birbirine bağlanabilir. Ribozomda amino asitlerin birbirine bağlanarak oluşturdukları diziye birincil (primer) yapı adı verilmektedir. Dizideki tek bir amino asidin değişmesi proteinin tüm işlevini yitirmesine sebep olabilir. Genetik hastalıklar genellikle bu tip protein mutasyonları sonucu oluşur.

İkincil (Sekonder) Yapılar

İkincil protein yapıları, hidrofobik amino asitler arasında hidrojen bağlarının oluşmasından kaynaklanan, yeni şekillenmeler vermek üzere özel noktalardan amino asit zincirlerinin katlanması veya kıvrılması sonucunda oluşur. En yaygın iki şekillenme olan alfa sarmal (alfa heliks) ve beta tabaka (beta sheets) protein katlanması bölümünde tanımlanmıştır. Alfa sarmal düzenlenmesinde amino asitler sağ el yönünde bir spiral oluşturur. Hidrojen bağları bir amino asidin azot atomunu diğer amino asidin oksijen atomuna bağlayarak yapıyı stabilize eder. Düzenli aralıklarda bağlantılar oluşmasından dolayı sarmal zincir yapısı oluşur. Beta-tabaka yapısında da hidrojen bağları azot ve oksijen atomlarını etkileştirir, fakat yan yana hizalanan amino asit zincirlerindeki atomlardan dolayı temelde düz bir yapı oluşur. Tabakalar hem "paralel" (zincirler aynı yönde uzanıyorsa) hem de "antiparalel" (zincirler bu doğrultuyu değiştiriyorsa) olabilir. Protein yapısının temel elemanlarından biri de, tek bir zincirin antiparalel beta tabaka oluşturmak üzere kendi üzerine dönerek uzanması sonucu meydana gelen, beta dönüşüdür. Proteinlerin oluşturabileceği en kararlı yapılar olduğu için alfa-sarmal ve beta-tabaka yapıların ikisi de varlığını sürdürür.

Üçüncül (Tersiyer) Yapılar

Tersiyer protein yapıları sekonder yapıların çapraz bağlanması sonucu oluşan üç boyutlu polipeptidlerdir (küçük ve benzer moleküllerden oluşan büyük moleküller). Tersiyer yapıları bir arada tutan bağlar ikincil kovalent bağ yapabilen amino asitler arasında oluşur (sistein, proteini çapraz bağlayarak eşsiz bir şekle sokmak için diğer bir komşu sistein ile disülfid bağı oluşturabilir). (Disülfid köprüleri oluşturmak üzere çapraz bağlanabilen sisteinlerin SH yan grupları EK 2' de verilmiştir). Proteinin tersiyer yapısı, hücresel reseptöre bağlanma veya kimyasal bir tepkimeyi katalizleme gibi, o proteinin fonksiyonunu belirler.

Protein hangi senkonder ve tersiyer yapıya sahip olursa olsun, bu yapıların dayanıksız olduğunu bilmek gerekir. Hidrojen bağları kolayca kırılabilir ve bu durum önemli bir proteine zarar verebilir.Yumurta ısıtıldığı zaman sıvı halde bulunan yumurta proteinleri (albumin) ısıyla beraber hidrojen bağları ve tersiyer yapıyı koruyan çapraz bağların kırılmasıyla hızlıca şekil değiştirir (yumurta beyazı). Laboratuvarda kullanılan çoğu protein narin yapılarının korunması ve ortamın ısısından bozulmasının önlenmesi için buz üzerinde muhafaza edilir.

Dördüncül (Kuaterner) yapılar

Kuaterner protein yapıları pek çok polipeptitten oluşan eşsiz, küresel (globüler) ve üç boyutlu komplekslerdir. Kanda oksijeni taşıyan hemoglobin kuaterner yapıya sahip proteinlere bir örnektir ve iki tersiyer proteinin bağlanması sonucu oluşur.

Protein Katlanması

Yapı ve fonksiyon gibi bir protein için önemli olan her şey katlanmaya bağlıdır. Katlanma, farklı amino asit dizilerinin şekli nasıl etkilediğini belirler; örneğin, orak hücre anemisi birincil (primer) yapıda stratejik bir noktada tek bir amino asidin yer değiştirmesinden dolayı hatalı katlanma sonucunda oluşur. Eğer bir protein yanlış katlanırsa sadece işlevini kaybetmekle kalmaz, ayrıca yanlış katlanmış protein zararlı da olabilir. Örneğin, Alzheimer hastalığında oluşan plaklar beyinde birikir, çünkü beyin hücrelerinde bulunan enzimler yanlış katlanmış proteinleri parçalayamaz.

Proteinlerin temel yapılarının anlaşılmasında öncül buluş, protein yapısının en yaygın bileşenleri olan alfa sarmalının ve beta tabakanın Pauling ve Corey tarafından tanımlanmasıyla 1951'de gerçekleşti. Her iki yapı da amino asit zincirlerinin hidrojen bağlarıyla bağlanması sonucu oluşur. Alzheimer hastalığının yanısıra kistik fibroz, deli dana hastalığı (sığır süngerimsi beyin iltihabı, BSE), çeşitli kanser türleri ve bazı kalp krizleri yanlış katlanmış protein kümeleriyle ilişkilidir. Protein katlanması kendiliğinden olduğundan, üretim aşamalarında protein katlanmasını anlamak ve kontrol etmenin biyoteknoloji açısından ne kadar büyük bir sorun olduğu açıktır.

Glikozilasyon

Ökaryotik bir hücrede 100'den fazla **posttranslasyonel modifikasyon** (glikozilasyon gibi) oluşur. Glikozilasyonda karbohidrat üniteleri (şeker molekülleri) proteinlerin belli bölgelerine eklenir (bakınız **Şekil 4.3**). Bu değişim proteinin aktivitesine önemli derecede etki eder; çözünürlüğü artırabilir, proteinleri membranlarla etkileştirebilir ve organizmada bir molekülün aktif ömrünü uzatabilir.

Glikoproteinler, Scripps Araştırma Enstitüsü'nden bilim insanlarının keşfettiği üzere, hastalıkların tedavisinde kullanılabilirler (*Blood* dergisinde 10 Haziran



ŞEKİL 4.3 Glikozilasyona Uğramış Yan Zincirlere Sahip Bir Proteinin Üç-Boyutlu Yapısı Glikozilasyon, ökaryotik hücrelerde oluşur ve muhtemelen proteinleri imha eden doğal hücresel mekanizmalardan koruyarak proteinin ömrünü uzatmaktadır.

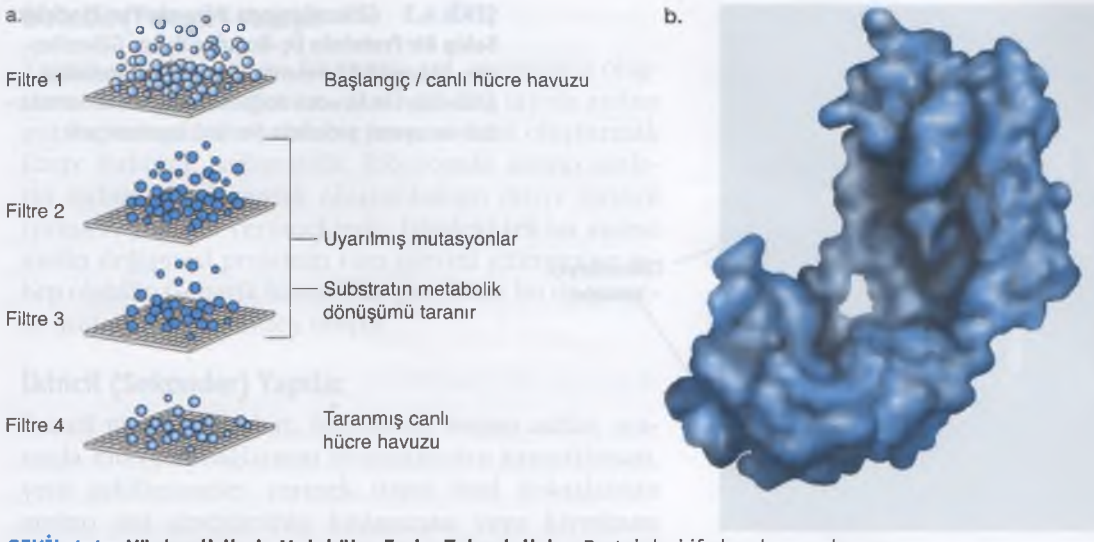
2010'da yayınlanmıştır). Bu keşif bir çeşit kanserli hücrenin hedeflenip yok edilmesinde yeni bir yöntem sunmaktadır. Bir glikoprotein kemoterapötik ilaç ile yüklü bir nanopartiküllle (küçük bir sentetik molekül) kombine edilebilir ve kanser hücrelerinin hedeflenip yok edilmesinde yeni bir yol açabilir. Terapötik etkili nanopartiküllerle B lenfoma kanserlerinin hedeflenmesiyle ilacın etkili dozu normal dokuları koruyup eş zamanlı olarak artar (Sayfa 101'de *Geleceği Öngörme* kısmında açıklandığı gibi). Scripps'deki bilim insanlarının bulgularının lösemi, lenfoma ve ilgili kanserlerin tedavisinde, glikozilasyona dayanan diğer yeni ilaç terapilerinin geliştirilmesine öncülük edebileceği açıktır.

Yönlendirilmiş Moleküler Evrimle Protein Mühendisliği

Biyoteknoloji, amino asit dizisinde özel ve önceden tanımlanmış değişimlerin gerekli olduğu zamanlarda protein mühendisliğine sıkça başvurmaktadır. Bu durum yönlendirilmiş moleküler evrim teknolojisiyle yapılabilmektedir. Örneğin, önemli bir biyoteknoloji firması genler üzerinde rastgele mutasyonlar yapmakta ve en yüksek aktiviteye sahip protein ürününü (enzim) içeren bakterileri seçmektedir. Bu yolla firma, çoğu bakterinin yaşayamayacağı düzeyde yüksek olan 1.0 molar derişimden daha yüksek konsantrasyonda, siyanüre toleranslı organizmalar (ve endüstriyel enzimler) üretebilmiştir. Hiçbir "doğal" ortam bu düzeyde siyanürle başa çıkamamıştır. Sonuçta seçilmiş organizmalar madencilik ve diğer endüstriyel atık birikiminden kaynaklanan siyanür kontaminasyonunu gidermede kullanılabilir. Bu tip bir organizmaya neden olan mutasyon doğal seleksiyonla mümkün değildir, çünkü doğal çevre bu tip hayatta kalabilen bakterileri seçmede yeterince değişmiş değildir. Yönlendirilmiş moleküler evrim, yeni bir arsenik metabolize edici enzimi oluşturmak üzere belirli bir genin nükleotid dizisinde özel değişimler yapmayı gerektirmektedir (**Şekil 4.4**).

Ardından bu gibi modifiye edilmiş genler konak hücreye aktarılabilir ve konak hücrenin sistemi tarafından istenen amino asit dizisi üretilebilir. Bu teknik araştırıcıların özgün zenginleştirmelere sahip proteinler yapmasına olanak tanır. Doğal oluşan mutasyonlardan farklı olarak yönlendirilmiş moleküler evrim, belli bir gende meydana gelen mutasyonlar üzerine yoğunlaşır ve bu genden üretilen en iyi proteinleri seçer. Örneğin, *E.coli* insan insülini ürettiği zaman bunun bakteriye bir yararı olmaz. Yönlendirilmiş moleküler evrim konusunda daha fazla bilgi için Maxygen firmasının web sitesine bakabilirsiniz, www.maxygen.com.

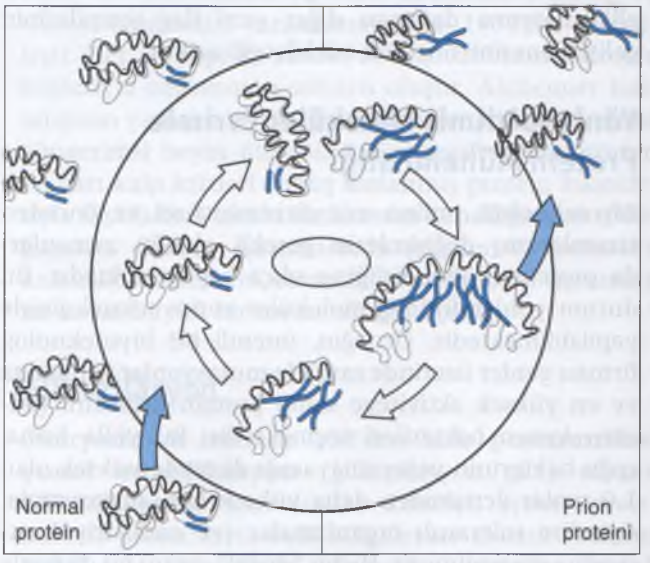
Enzimler hücrelerde spesifik reaksiyonları katalizlemek için milyonlarca yıllık bir değişim sürecinden geçmiştir. Son on yıldır bilim insanları doğal enzimlerin aktivite, kararlılık ve seçimliliğini artırmayı başarabilmek için çeşitli derecelerde yönlendirilmiş evrimi ve rasyonel dizaynı (proteini bir yüzeye uyarlamak) kullanmaktadır. Washington Üniversitesi'nde David Baker'in laboratuvarında Rosetta adı verilen bir rasyonel dizayn programıyla daha fazla ilerleme kaydedilmiştir. Buradaki ekip, aktif bölgeyi modelleyerek ve ardından bu kısıma bağlamak üzere bir yapı iskeleti bularak, doğada bulunmayan bir enzimi dizayn etmiştir. Aktivite için test edilen 84 denemeden sonra 50 tanesi seçilmiş ve bunların DNA dizileri ekspresyon için *E. coli*'ye aktarılmıştır. En son seçilen enzim doğal enzimler kadar olmasa da işlev göstermiştir. Bu durum daha iyi aktivite göstermesi için aktif bölgenin pek çok kez daha modifiye edilmesini gerektirdi. Bu araştırma proteinlerin rasyonel olarak tasarlanabileceği günün



ŞEKİL 4.4 Yönlendirilmiş Moleküler Evrim Teknolojisi a. Proteinleri ifade eden genler mutasyonlara maruz bırakılarak yeni gen dizileri elde edilebilir. Mutant genler içeren organizmalar benzersiz özellikler açısından taranır. Protein fonksiyonunda bir ilerleme sağlandıktan sonra bu süreç en üst fonksiyon elde edilene kadar tekrarlanabilir. Doğal seleksiyondan farklı olarak bu süreç organizmaya değil proteinin özelliklerine odaklanlanır ve doğada oluşamayacak değişikliklere sebep olabilir. Canlıya evrimsel bir avantaj sağlamaz ama ürettiği proteinler daha fazla ticari değere sahip olacaktır. b. Bilim insanları protein katlanmasını geliştirmek için bakteriler tarafından kullanılan bir protein keşfetti. "Spy (Casus)" proteini bakteride genellikle ilaç ve endüstriyel kullanımlar için rekombinant proteinler üretilirken meydana gelen yanlış katlanmaları azaltmaktadır. Araştırma grubu, antibiyotiklere karşı koruyan proteinleri geri katlama yetenekleri olan bakterileri başarılı bir şekilde seçmek için, yönlendirilmiş evrimden yararlanmışlardır.

henüz gelmediğini, fakat bu alanda ilerleme kaydedildiğini göstermiştir.

Doğal olarak oluşan ve mutasyon ürünü proteinlere ek olarak, biyoteknoloji tamamıyla yeni protein molekülleri de tasarlayabilmektedir. Laboratuvarda tasarlanan ve üretilen bu moleküller belli uygulamalar için uygun hale getirilmiş proteinlerin icat edilebileceğini göstermektedir. Kusurlu protein katlanmaları, genellikle **prion** olarak adlandırılan (Şekil 4.5) enfekte edici protein partiküllerinin neden olduğu bir hastalığa da yol açmaktadır. Prionlar normal hücresel proteinlerle etkileşime girmekte ve yapılarında değişiklik meydana getirerek hücrelere hasar veren faydasız proteinlerin birikimine yol açmaktadır. Prion koyun, keçi (scrapie) ve sığırlarda (sığır süngerimsi ensefalopati veya "deli dana" hastalığı) oluşabilir. Beyne hasar veren bu hastalığın insanda görülen çeşitleri "kuru" ve "**bulaşıcı süngerimsi ensefalopati (TSE)**" olarak adlandırılır. Bütün bu hastalıklar, normalde memeli nöronlarında bir membran glikoproteini olarak bulunan, öncül bir prion proteininde meydana gelen yapısal değişikliklere dayanmaktadır. Enfekte olmuş hayvanın hasta olması veya ölmesi durumuna kadar bu hastalığı tespit etmek güç olduğu için, bu durum hastalığın kontrolünü zorlaştırmaktadır. Biyoteknoloji bu tür vakaların tespit ve kontrolünde yardımcı olabilecek sentetik enfekte edici partikülleri yapmanın yolunu aramaktadır.



ŞEKİL 4.5 Hatalı Katlanmış Prion Proteinleri Prion hastalıklarında oluşan hatalı protein katlanması laboratuvarda taklit edilerek geniş çapta prion proteini üretilebilir ve teşhis yöntemleri geliştirmede kullanılabilir. Okları takip ediniz, soldan prion proteini normal proteine bağlanıp onu kendi gibi bir priona çevirmekte ve hücrede prionların birikimine neden olmaktadır.

4.3 Protein Üretimi

Buraya kadar iki şey anlaşılmış olmalıdır: (1) proteinler değerlidir ve (2) karmaşık, narin yapılı ürünlerdir. Bu iki şeyi bilerek protein üretiminde biyoteknolojiyi inceleyebiliriz.

Bir proteini laboratuvarda üretmek uzun ve zahmetli bir iştir, ayrıca üretim için her adımda seçilmesi gereken pek çok yöntem bulunmaktadır. Proteinlerin üretiminde iki temel işlem olan **akış yukarı (upstream) süreç** ve **akış aşağı (downstream) süreç**lere değineceğiz. Upstream süreci, proteinlerin hücrede gerçek ekspresyonunu içerir. Downstream süreçte ise protein önce hücrenin diğer kısımlarından ayrılır ve öteki proteinlerden ayrıştırılır. Saflık ve aktiviteler sonradan kontrol edilir. Son olarak proteinin kararlı şekilde saklanacağı bir yöntem geliştirilir. Upstream sürecinde yapılan tercihler downstream sürecini de kolaylaştırabilir.

Protein Ekspresyonu: Akış yukarı (Upstream) Süreç

Upstream sürecinde yapılan ilk tercihe, yani protein kaynağı olarak kullanılacak hücrenin seçimine bakarak protein işlemenin detaylı bir incelemesiyle başlayacağız. Mikroorganizmalar, funguslar, bitki hücreleri ve hayvan hücreleri doğru şartlar altında iyi bir tercih olmalarını sağlayan benzersiz niteliklere sahiptir.

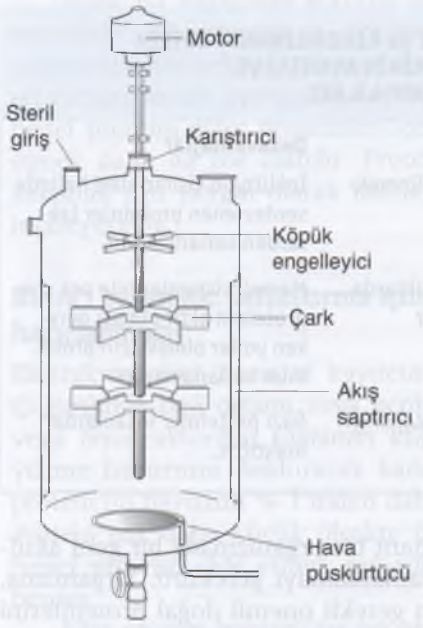
Bakteriler

Bakteriler pek çok nedenden ötürü çekici bir protein kaynağıdır. Öncelikle, bakterilerin fermantasyon işlemleri iyice anlaşılmıştır. Ayrıca, kısa zamanda geniş çapta kültüre alınmaları mümkündür. Endüstriyel uygulamalarda istenen ürünü geniş ölçüde üretebilme yetenekleri oldukça önemlidir. Bakterilerin genetiğini modifiye etmek nispeten daha kolaydır.

Bakteriyel bir proteinin üretim seviyesini yükseltmek için pek çok rekombinant DNA teknolojisi kullanılabilmektedir. Bunlardan biri, ilgili genin pek çok kopyasını konak hücreye aktarmaktır. Çoğu durumlarda organizmaya aktarılan ilgili genin ekspresyonu daha güçlü bir transkripsiyonel düzenleyicinin (promotör) kontrolü altındadır (bakınız Bölüm 3).

Genetik mühendisliğiyle proteinleri üretmek için kullanılan en yaygın bakteri türü *E. coli*'dir. Bakteri genetiği üzerine ilk araştırmalar bir model sistem olarak *E. coli* üzerinde yoğunlaştığı için şimdi *E. coli*'nin genetik özelliklerini oldukça iyi anlamış bulunmaktayız.

Bazı durumlarda, istenen protein ürününe ait yabancı gen (**cDNA** veya **komplementer DNA** formunda) doğrudan, tam veya kısmi olarak *E. coli* genine bağlanır. Böyle durumlarda genetiği değiştirilmiş *E. coli* istenen proteini üretir fakat protein **füzyon proteini** formundadır. Füzyon proteinlerinde, hedef protein bakteriyel bir proteinle birleşmiştir ve dolayısıyla oluşan proteini iki parçaya ayırmak için ek bir adım gereklidir. Birleşik olan bakteri proteini genellikle bir enzimdir, dolayısıyla substratına bağlanarak bir saflaştırma kolonuna tutunabilir (aşağıda affinite kolonlarının açıklamasına bakınız). *E. coli* tarafından doğal yolla sentezlenen proteinlerin büyük kısmı intraselülerdir (hücre içi). Çoğu zaman oluşan yabancı protein, **inklüzyon cisimcikleri** olarak adlandırılan çözünmeyen kümeler halinde hücre sitoplazmasında birikir ve kullanımları için diğer hücre proteinlerinden ayrılarak saflaştırılmaları gerekir.



ŞEKİL 4.6 Biyoreaktör Büyük hacimli hücre kültürü genellikle ürünler elde edilene kadar kapalı (steril) ve kendine yeterli sistemlerde gerçeleştirilir. Steril bağlantı noktalarından işçiler içteki sensörler yardımıyla alınan verilere dayanarak pH, gaz derişimi ve diğer değişkenleri ayarlayabilirler. Paslanmaz çelik biyoreaktörlere alternatif olarak sallamalı masalar üzerinde 2000 litreye kadar steril kaplar kullanılabilir.

Protein üretiminde mikroorganizmaların kullanımında bazı kısıtlamalar mevcuttur. *E. coli* dâhil tüm bakteriler prokaryottur. Prokaryotlarda glikozilasyon gibi bazı işlemler gerçekleşmez. Bu nedenle, Tablo 4.3'te görüldüğü gibi, bazı proteinler sadece ökaryotik hücreler tarafından üretilebilirler.

Bütün bir protein üretim sürecini laboratuvarda küçük bir erlenmayerde yürütmek mümkün olmakla birlikte, genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar geniş ölçekli fermentörlerde anaerobik veya **biyoreaktörlerde** aerobik olarak da geliştirilebilirler (**Şekil 4.6**).

Bilgiyarda biyoreaktörün iç koşulları görüntülenir ve oksijenle sıcaklık hücre büyümesi için ideal seviyede tutulur. Hücre büyümesi dikkatlice izlenir çünkü büyüme fazı çok hızlıysa, düzenleyici (promotör) bölge yabancı gen ekspresyonunu aktifleştirmesi için

TABLO 4.3 *E. COLİ*'de REKOMBİNANT PROTEİN ÜRETİMİNİN AVANTAJ VE DEZAVANTAJLARI

Avantajlar	Dezavantajlar
E. coli genetiği iyi bilinmektedir	İnklüzyon cisimcikleri halinde sentezlenen proteinler tekrardan katlanmalıdır
Neredeyse sınırsız miktarda protein ürettirilebilir	Memeli sistemlerinde pek çok proteinin aktif olması gereken yollar olmaksızın proteinler katlanamazlar
Fermantasyon teknolojisi iyi bilinmektedir	Bazı proteinler insanlarda inaktiftir.

uyarılır. Rekombinant bir organizmada bir geni aktifleştirmek doğru zamanlamayı gerektirir. Organizma, metabolizması için gerekli önemli doğal proteinlerini sentezledikten sonra bu girişim yapılmalıdır.

Mantarlar

Mantarlar, hayvan yemi ve bira gibi çeşitli ürünlerde kullanılan proteinler açısından geniş yelpazeli bir kaynaktır. Bazı mantarlarda doğal olarak bulunan proteinler besleyicidir ve gıda olarak kullanılırlar. Doğal proteinlere ek olarak mantarların pek çok türü mühendislik ürünü proteinler için iyi bir konaktır. Bakterilerden farklı olarak mantarlar ökaryotiktir ve bazı post-translasyonel modifikasyonları (insan proteinlerini doğru katlama gibi) yapabilmektedir ve dolayısıyla Tablo 4.4'te gösterildiği gibi bu tarz sentezlerde kullanılmaktadır.

Bitkiler

Bitki hücreleri de protein ekspresyonu için kullanılabilirler. Bitkiler doğal oluşan biyolojik aktif moleküllerce zengin bir kaynaktır ve mevcut ilaçların % 85'i bitkilerden elde edilmektedir. **Proteolitik** bir enzim olan **papain** endüstriyel ölçekte üretilen bitki türevli proteinlere bir örnektir. Bir proteaz olan papain veya diğer adıyla bitkisel pepsin, etleri yumuşatıcı bir ajan olarak kullanılır. Eti sert yapan, bağ dokuda ve kan damarlarında bulunan kollajeni sindirir. Bitkiler tarafından üretilen enzimler hiç şüphesiz yakın bir gelecekte artan ilaç imalatında yerini alacaktır.

TABLO 4.4 FUNGUSLARDAN ELDE EDİLEN BAZI REKOMBİNANT PROTEİNLER

Protein	Mantar
İnsan interferonu	*A. niger, A. nidulans*
İnsan laktoferrin	*A. oryzae, A. niger*
Sığır kimosin	*A. niger, A. nidulans*
Aspartik proteinaz	*A. oryzae*
Trigliserid lipaz	*A. oryzae*

Bitkilerin genetiği doğal olarak oluşturmadıkları özel proteinleri üretmeleri için değiştirilebilir. Bu işlem, bitkilerin hızlı büyümesi ve çoğalma miktarları göz önüne alınırsa oldukça avantajlı olabilir. Örneğin genetiği değiştirilmiş ilk bitki olan tütün, tek bir bitkiden bir milyon tohum üretebilir. Gıda harici bir bitki olarak tütün biyoteknolojik protein üretimi için iyi bir tercih olmaktadır. Genetik materyal entegre olduktan sonra, bir milyon yeni "bitki protein fabrikası" tarlaları kaplayabilir (Bölüm 6' da açıklandığı gibi).

Protein üretimi yapmak için bitkileri kullanmanın bazı sakıncaları da vardır. Bitkilerde bütün proteinler sentezlenmediği ve sıkı hücre duvarları mevcut olduğu için proteinlerin ekstraksiyon süreçleri zaman alıcı ve zor olabilmektedir. Sonuçta bitki hücreleri de genellikle uygun bir şekilde proteinleri glikozilleyebilmesine rağmen, bu işlem hayvan hücrelerinden biraz farklıdır. Bu durum bitkilerin bazı proteinlerin ekspresyonunda biyofabrika olarak kullanılabilmesine imkân vermez. Transgenik bitkilere daha sonra detaylı olarak değineceğiz (Bölüm 6).

Memeli hücre kültür sistemleri

Bazen hayvan hücrelerinin uygun bir ortamda büyütülerek proteinlerin istenen miktara ulaşmasına kadar kültüre alınmaları mümkündür. Bu zorlu bir işlemdir, çünkü hayvan hücrelerinin besin gereksinimleri karmaşıktır. Memeli hücreleri nisbi olarak daha yavaş büyürler ve memeli hücre kültürlerinin bulaşma (kontaminasyon) olasılığı diğer kültür sistemlerinden daha fazladır. Tüm bunlara rağmen eğer proteinler sadece insanlarda kullanılacaksa memeli hücreleri en iyi seçenektir.

Hayvan biyoreaktör üretim sistemleri

Hücrelerin kültür ortamına alınması hayvan hücrelerinin kullanılmasının tek yolu değildir; bazen canlı hayvanlar da protein üreteçleri olabilir. Örneğin, monoklonal antikorların eldesinde kullanılan teknik düşünülebilir. Monoklonal antikorlar tek bir hedefe karşı reaksiyon gösterir ve bu durum onları teşhis ve terapötik uygulamalar açısından değerli kılar (bakınız Bölüm 7). Antikorlar, **antijenlere** (çoğunlukla istilacı virüsler veya bakteriler) karşı bir reaksiyon olarak üretilen proteinlerdir. Antikorlar antijenle birleşip onu etkisizleştirerek organizmayı korur. Antikorların üretimi canlıların bulaşıcı hastalıklara karşı direnmesine yardımcı olan immün tepkinin bir parçasıdır. Monoklonal antikorlar üretilmek istendiğinde farelere bir antijen enjekte edilir. Bu durumda fare beklenen antikorları oluşturur veya farenin antikor oluşturan dokusu kanser hücreleriyle birleşir (böylece ölümsüz olurlar).

Oluşan tümörden çekilen sıvı biriktirilerek buradan monoklonal antikorlar saflaştırılabilir.

Hayvan biyoreaktör protein üretiminde diğer bir yöntem, transgenik hayvanların (diğer organizmalardan aktarılan genleri içeren hayvanlar) sütünü veya yumurtasını kullanmaktır. Bu tip hayvansal ürünler, aktarılan rekombinant genden üretilen proteinleri içerir ve sütten veya yumurta proteinlerinden saflaştırılabilir. 2009 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bir keçiden üretilen ilk insan ilacını onayladı: ATryn, insanlarda nadir görülen bir kanama hastalığını tedavi etmektedir (bakınız Bölüm 7).

Böcek sistemleri

Böcek sistemleri hayvan hücrelerinden protein üretmenin diğer bir yoludur. **Bakülovirüsler** (böcekleri enfekte eden virüsler) DNA'nın taşınmasında araç olarak kullanılırlar, böylece istenen proteinlerin böcek hücreleri tarafından üretimi sağlanır. Fakat böceklerde proteinlerin posttranslasyonel modifikasyonlarının memelilerden biraz farklı olduğu örnekler mevcuttur; dolayısıyla böcek üretim sistemlerinin kullanımı sınırlı olmaktadır. Şimdilik, böcek üretim sistemleri araştırma amaçlı küçük miktarda proteinlerin ihtiyaç duyulması halinde kullanılmaktadır.

Protein Saflaştırma Yöntemleri: Akış aşağı (Downstream) Süreç

Bir protein üretildikten sonra downstream süreci başlar (Şekil 4.7). Öncelikle protein elde edilmelidir. Eğer protein hücre içindeyse (intraselüler) bütün hücre parçalanır; eğer hücre dışında ise (ekstraselüler) protein kültür ortamına salınmıştır. Hücrelerin harmanlanması akış aşağı sürecin sadece başlangıcıdır. Ardından asıl işlem başlar; protein saflaştırılmalıdır. Bu işlem hedef proteinin, üretildiği kompleks biyolojik molekülleri içeren karışımdan ayrıştırılması işlemidir.

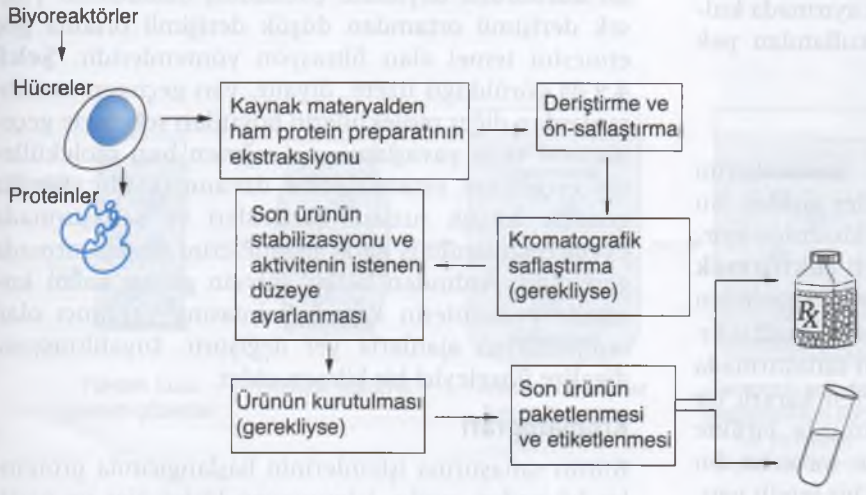
Saflık bu bağlamda göreceli bir kavramdır. FDA genellikle, bir örneğin % 99,99 hedef proteinden oluşmasını istemektedir. Proteinleri diğer tüm hücresel elemanlardan ayırmak kolay bir işlem değildir ve hedef proteini diğer proteinleri içeren örnekten izole etmek daha da zor olabilir. Proteinleri saflaştırmayı anlamak için yaygın olarak izlenen bazı basamakları inceleyeceğiz.

Birinci basamak: Saflaştırma için bir ekstrakt hazırlanması

Ekstraktın nisbi hacmini kaydetmekte yarar vardır. Çoğunlukla besi ortamı veya geniş bir fermentörden veya biyoreaktörden toplanan kültür süzüntüsü, bir yüzme havuzunu dolduracak kadar çoktur ve hedef protein bu havuzun % 1'inden daha azını temsil eder. Protein çok daha küçük ölçekte üretiliyor olsa dahi, hedef proteini elde etmek samanlıkta iğne bulmaya benzer.

Eğer protein intraselüler ise yapılacak ilk iş proteini serbest bırakmak için hücre duvarının yıkılması yani **hücre lizisi**dir. Bunu yapmak için pek çok yöntem bulunmaktadır; dondurup eritme (bu sayede hücre membranları parçalanır ve hücresel içerik açığa çıkar), deterjanlar (hücre duvarlarını parçalamada kullanılır) ve mekanik yöntemler (ultrasonik ses dalgaları veya küçük cam boncuklarla parçalama). Proteinlerin hassas yapısı düşünüldüğünde hiç hasar görmeden hücreden saflaştırılmasının zorluğu anlaşılabilir. Parçalama işlemi ilgili proteinin yanında tüm hücre içi elemanları da hücreden serbest bırakır.

Hücreler parçalandıktan sonra organik alkoller veya tuzlar karışıma eklenebilir. Bunların her ikisi de proteinlerden suyu çekerek hidrofobik oryantasyonlarından yararlanır ve bir araya gelmelerini sağlar. Bu ajanlar protein molekülleri arasındaki etkileşimi artırarak karışımdan ayrılmalarına olanak verir.



ŞEKİL 4.7 Biyoişlemenin Temel Basamakları Saflaştırma kaba materyalden veya biyoreaktörlerden yapılabilir. İşlem adımları tasarlanmalıdır ve bunlar genellikle benzersiz olmaktadır (bazen de patentlenebilir).

İkinci basamak: Proteinleri çözeltide stabilize etmek

Daha sonra, proteinler kararlı halde tutulmalıdır. Proteinlerin biyoaktivitesini sürdürmesinin önemli olduğu ve proteinlerin diğer moleküllere nisbeten daha hassas yapılı olduğu unutulmamalıdır. Neticede saflaştırma işlemi sürecinde proteini korumak için önlemler alınmalıdır.

Proteinleri korumada düşük sıcaklığı sağlamak önemlidir, dolayısıyla çoğu saflaştırma düşük sıcaklıkta gerçekleştirilir. Oda sıcaklığı proteinlerin aktifliğini kısıtlar. Proteinin aktivitesi için uygun pH'nın da sağlanması oldukça önemlidir ve çoğu aktif proteinler azami fonksiyonlarının korunması için tamponlayıcı maddelerin içinde bekletilir.

Bir örnekteki hedef proteinleri sindirebilecek doğal proteazlar da diğer bir tehdittir. Proteaz inhibitörleri ve antimikrobiyal maddeler protein moleküllerinin parçalanmasını engellemek için ortama katılabilir, fakat daha sonra saflaştırma sürecinde kullanılan herhangi bir katkı maddesi gibi uzaklaştırılmaları gerekir. Diğer bir potansiyel problem ise köpürme veya kırpma gibi mekanik parçalanmayla proteinlerin işlevsiz fragmentlere ayrılması durumudur. Yine, katkı maddeleri proteini bozacak köpürmeyi ve makaslamayı engelleyebilir, fakat bu maddeler daha sonradan uzaklaştırılmalıdır.

Gördüğümüz gibi bazı saflaştırma yöntemleri hedef proteine zarar verebilir. Proteinleri başarılı bir şekilde ayırmak ve saflaştırmak denge gerektiren bir işleyiştir. Proteinin saflaştırılmasının esas olmasıyla birlikte, biyolojik aktivitesini sürdürmesi de aynı oranda önemlidir.

Üçüncü basamak: Ekstrakttaki bileşenlerin ayrılması

Saflaştırma süecindeki son adım en önemlisi olabilir. Proteinler arasındaki benzerlikler, onları hücre parçalandığı zaman açığa çıkan lipidler (yağlar), karbohidratlar ve nükleik asitler gibi maddelerden ayırmamıza imkân tanır. Özgün proteinler arasındaki farklılıklar daha sonra hedef proteini diğerlerinden ayırmada kullanılır. Aşağıda proteinleri ayırmada kullanılan pek çok yöntem verilmiştir.

Proteinlerin çöktürülmesi

Proteinler genellikle yüzeylerinde su moleküllerini çeken ve etkileşen hidrofilik amino asitler taşırlar. Bu özellik proteinleri ekstrakttaki diğer maddelerden ayırmada temel teşkil eder. Tuzlar, proteinleri **çöktürmek** için protein karışımına eklenebilir (bu sayede çözeltiden ayrılırlar). Bu tuzlardan en yaygını amonyum sülfatdır.

Amonyum sülfat çöktürmesi protein saflaştırmada sıklıkla ilk adım olarak seçilir ve nispeten kararlı bir protein çökeleği meydana getirir. Bununla birlikte amonyum sülfat çöktürmesine ilişkin sorunlar bu yöntemi bazı endüstriyel şartlarda zayıf bir tercih yapmaktadır. Örneğin amonyum sülfat paslanmaz çeliğe değdiğinde oldukça reaktiftir ve pek çok endüstriyel saflaştırma birimleri de paslanmaz çelikten yapılmıştır. Protein çöktürmesinde sıklıkla kullanılan diğer çözücüler arasında etanol, izopropanol, aseton ve dietil eter vardır. Amonyum sülfatta olduğu gibi bu çözücüler protein molekülleri arasındaki suyu uzaklaştırarak proteinlerin çökelmesini sağlamaktadır.

Filtrasyon (boyut temelli) ayrıştırma yöntemleri

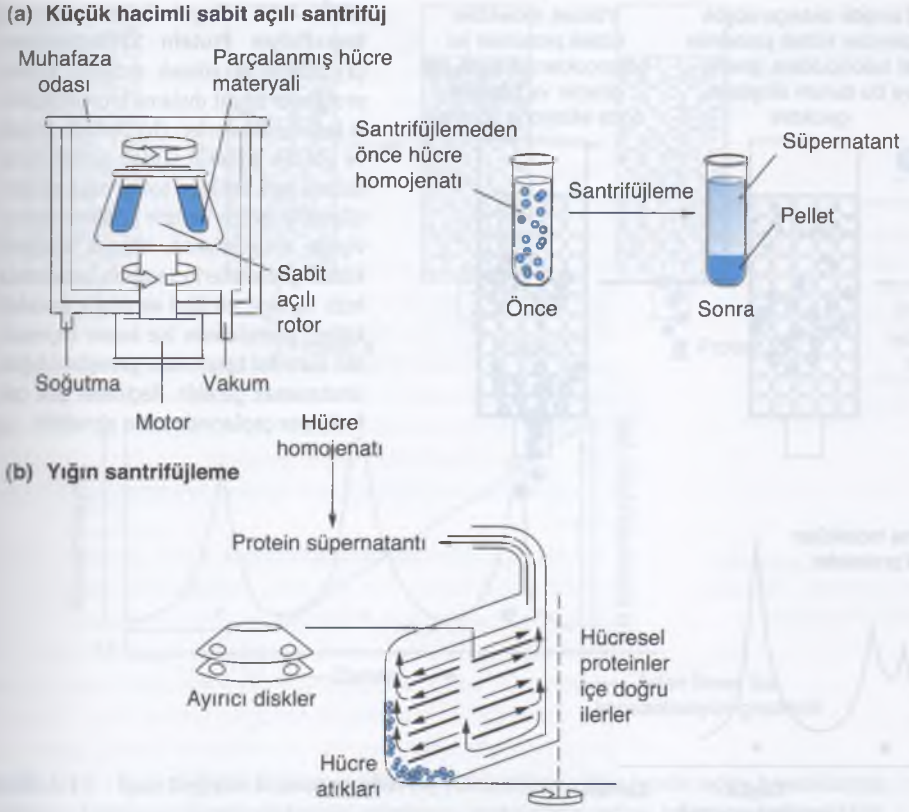
Molekülleri boyut ve yoğunluğa dayalı olarak ayırmanın çeşitli yolları vardır. **Santrifüjleme**, örnekleri yüksek hızda döndürerek ayırır. Bu yolla proteinler sıklıkla tek bir tabaka halinde izole edilebilir veya diğer ağır hücre parçalarından ayrılabilir. Küçük hacimli santrifüjler her seferinde sadece birkaç litrelik işlem yapabilir. Büyük reaktörler yüzlerce veya binlerce litreyi işleyebilir (bakınız **Şekil 4.8**). Endüstriyel ölçekli santrifüjleme bir biyoreaktörün içeriğinin kesintisiz işlenmesine olanak tanıyan sürekli-akışlı santrifüjler sayesinde gerçekleştirilmektedir.

Çeşitli boyut ve tiplerde filtreler de karışımdaki diğer moleküllerden proteinleri ayırmada kullanılabilir. **Membran filtrasyonu** olarak bilinen bu işlemde, naylon veya diğer mühendislik ürünü maddelerden yapılmış değişken por genişliklerine sahip ince membranlar bir çözeltiden hücresel atıkların filtrelenerek ayrılmasında kullanılır. İlk olarak **mikro filtrasyon** çökelekleri ve bakterileri ayırır. Daha sonra **ultra filtrasyonda** protein ve nükleik asitler gibi molekülleri tutabilecek filtreler kullanılır. Bazı ultrafiltrasyon işlemleri geniş proteinleri küçük olanlardan bile ayırabilmektedir. (bu cihazlardan bazılarını www.amicon.com adresinde bulabilirsiniz). Membranfiltrasyonu sistemlerinin en temel kusurlarından birisi, kolayca tıkanmaya elverişli olmasıdır. Pozitif açıdan ise, bu tip filtreleme sistemlerinin kullanılmasının santrifüjlemeden daha az zaman aldığı söylenebilir.

Diyafiltrasyon ve **diyaliz,** denge halinin kimyasal durumuna dayanan, çözünmüş maddelerin yüksek derişimli ortamdan düşük derişimli ortama göç etmesini temel alan filtrasyon yöntemleridir. **Şekil 4.9**'da görüldüğü üzere, diyaliz, yarı geçirgen membranlardan diğer moleküllerin boyutları sebebiyle geçememesi veya yavaşlamasına rağmen bazı moleküllerin geçebilme yeteneklerine dayanmaktadır. Diyaliz genelde küçük tuzları, çözücüleri ve saflaştırmada evvelce kullanılmış katkı maddelerini uzaklaştırmada gereklidir. Ardından tuzlar sürecin geriye kalan kısmında proteinlerin kararlı kalmasına yardımcı olan tamponlayıcı ajanlarla yer değiştirir. Diyafiltrasyon, diyalize filtreleyici bir bileşen ekler.

Kromatografi

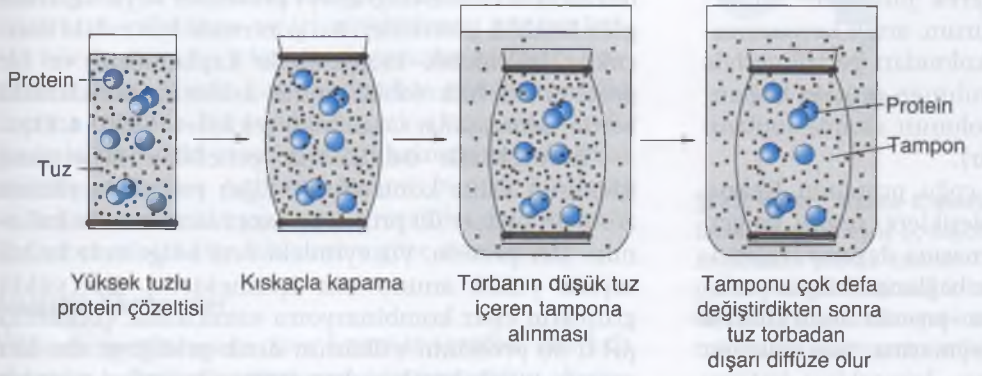
Bütün saflaştırma işlemlerinin başlangıcında proteinler hücreden ayrılır, istenmeyen kirleticiler ve parti-



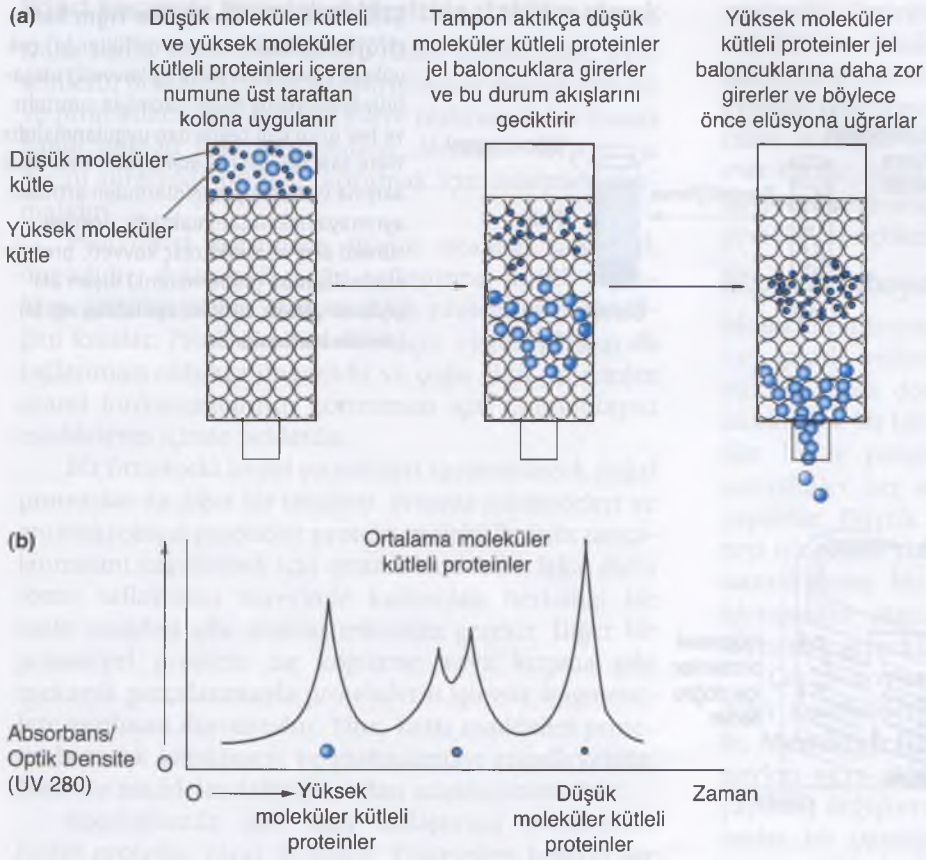
ŞEKİL 4.8 Sabit-Açılı ve Yığın Santrifüjleme Sabit-açılı santrifüjler (a) çok yüksek çekim kuvvetine (g kuvveti) ulaşabilir fakat küçük işlem hacmiyle sınırlıdır ve her grup için tekrardan uygulanmalıdır. Yığın santrifüjler (b) materyalin kesintisiz akışına ve hücre proteinlerinden artıkları ayırmaya imkan tanımaktadır. İçeriye sürekli akış ve merkezkaç kuvveti, protein süzüntüsünün (süpernatant) dışarı akışıyla en yüksek verimle ayrılabileceği bir şekilde ayarlanabilir.

küller uzaklaştırılır ve proteinler konsantre hale getirilir. **Kromatografi** yöntemleri proteinleri büyüklüklerine, diğer maddelerden ayrılma biçimlerine veya tutunma yeteneklerine göre birbirinden ayırmamızı sağlar. Kromatografide uzun cam tüpler mikroskobik reçine boncuklarla ve tampon sıvısıyla doldurulur. Ardından protein ekstraktı cam kolona eklenir ve böylece reçine boncuklar üzerinden akış sağlanır. Kullanılan reçineye göre proteinler boncuklara yapışır veya boncukların bir filtreleme sistemi işlevi görmesiyle proteinlerin kolondan geçişi sağlanır.

Boyut-dışlama kromatografisi (SEC, Size-exclusion chromatography) filtreleme sistemi olarak jel boncuklar kullanır. Büyük protein molekülleri jel boncuklar boyunca daha hızlı ilerlerken, küçük moleküller, **Şekil 4.10**'da gösterildiği gibi, boncuklardaki



ŞEKİL 4.9 Diyaliz Diyaliz difüzyon işlemiyle tuzları (şekildeki küçük noktalar) uzaklaştırmak için ve proteinin kararlılığı için daha uygun olan bir tamponla yer değiştirmek için kullanılır.



ŞEKİL 4.10 Boyut Dışlama Kromatografisiyle Protein Saflaştırılması (a) Düşük ve yüksek molekül kütleli proteinler boyut dışlama kromatografisi kolonunda ilerler. (b) Şemada düşük ve yüksek molekül kütleli proteinlerin kolonu terk ettikten sonra nasıl görüntülendiği gösterilmiştir (280 nm ultraviyole absorbsiyon). Yüksek molekül kütleli proteinlerin tampon ortamında hızlı hareket ettiğini ve düşük molekül kütleli proteinlerin ise kolon reçinesinin matriksi tarafından yavaşlatıldığını unutmamak gerekir. Reçineler pek çok farklı por çaplarında satın alınabilir.

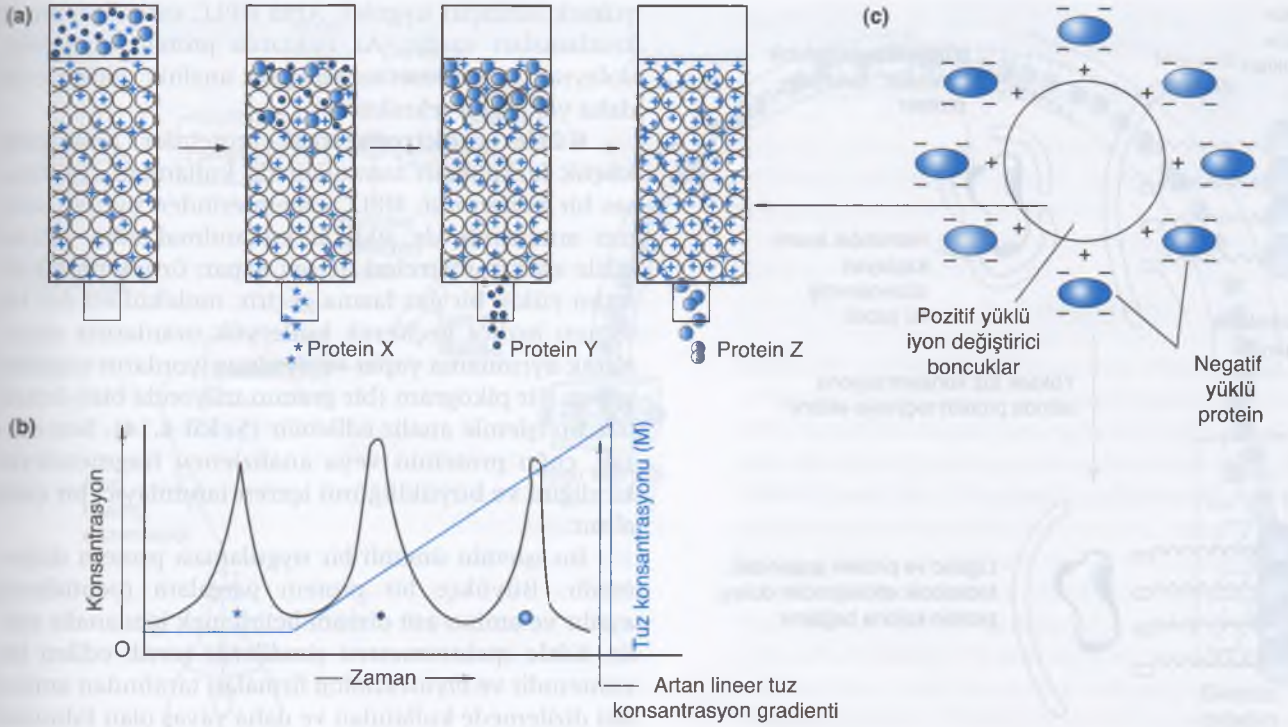
küçük deliklere girebileceğinden daha yavaşça ilerler. Çeşitli por büyüklüklerinde jeller mevcuttur ve uygun bir ayrımlama için gerekli olan jel, kontaminantların veya ayrıştırılacak proteinlerin molekül kütlelerine göre dizayn edilir. Bu yöntem sadece ön saflaştırmalarda kullanılabilir ve ayrıca endüstriyel düzeyde çok büyük kolonlar gerektirdiğinden kullanımı problemler doğurur.

İyon değişim (IonX) kromatografisi elektriksel bir yükle proteinleri bir kolondaki reçine boncuklarına bağlama temeline dayanır. Yüklü proteinler reçineye bağlanırken diğer kirlilikler kolon boyunca ilerler ve kolondan ayrılır (**Şekil 4.11**). Ardından elektrostatik kuvvet değiştirilerek proteinler reçineden ayrılabilir (elüsyon); bu durum, artan konsantrasyonlarda tuz çözeltilerinin kolondan geçirilmesiyle gerçekleşir. Bu sayede, bağlı bulunan protein bağlandığı yerden serbest kalır ve kolonun altında toplanır (280 nm UV altında tayin edilir).

Afinite kromatografisi çoğu proteinin **ligand** adı verilen özel şekle sahip bileşiklere, özgün ve geri dönüşümlü bir şekilde bağlanmasına dayanır. Ligandlar bir proteinde belirli bir yere bağlanan küçük moleküllerdir. Ligandların eşsiz bir protein molekülüyle uyuşması anahtarın kilide uymasına benzetilebilir (**Şekil 4.12**). Proteinlerin reçine boncuklara bağlanmasından sonra bağlanmayan molekülleri yıkayıp uzaklaştırmak için bir tampon çözelti kullanılır. Son olarak özel tampon çözeltileriyle tutulmuş proteinler de geri salınır (desorpsiyon, ligand bağlarının kırılması). Önceki sayfalarda bahsedilen füzyon proteinleri afinite kromatografisinde kullanılabilir, çünkü bakteriyel proteinin substratı (ligand) afinite kolonuna iliştirilebilir ve füzyon proteinini (bakteriyel enzim proteinini) kolona bağlar. Afinite kromatografisi, ara basamakları azaltarak saflaştırma işlemini kısaltabilir.

Bildiğimiz üzere amino asitler su molekülleri tarafından çekilmekte veya itilmektedir. **Hidrofobik etkileşim kromatografisinde** (HIC, hydrophobic interaction chromatography) proteinler suyu itişlerine göre farklılık gösterirler. Bu yöntemde kolondaki boncuklar hidrofobik moleküllerle kaplanmıştır ve bir proteindeki hidrofobik amino asitler boncuklardaki benzer kimyasallar tarafından çekilirler (**Şekil 4.13**).

İzoelektrik odaklama genellikle saflaştırma işleminin kalite kontrolünde diğer yollarla ayrılması zor olan benzer iki proteinin tanımlanmasında kullanılır. Her protein, yüzeyindeki özel bölgelerde belirli sayıda yüklü amino asit içermektedir. Bu yüklü grupların eşsiz kombinasyonu sonucunda, çözeltinin pH'sı ile proteinin yükünün denk geldiği yerde, her protein **izoelektrik nokta (IEP)** adı verilen eşsiz bir



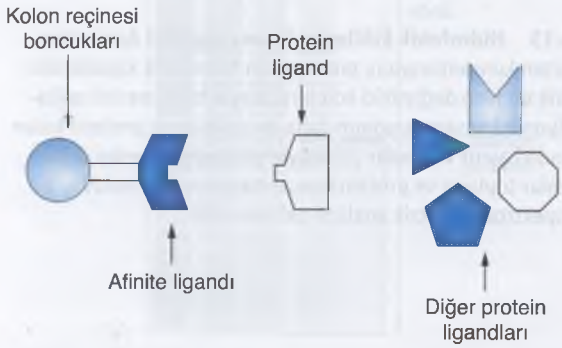
ŞEKİL 4.11 **İyon Değişim Kromatografisi** (a) Yüklü amino asitler iyonik reçine boncuklarına bağlanır. Tamponun iyonik şiddetinin artırılması, proteinlerin reçine kolonuna bağlandıktan sonra ayrılmasını sağlar. (b) En düşük tuz konsantrasyonunda protein X ayrılır; protein Y daha güçlü bağlandığından ikinci olarak ayrılır; protein Z en yüksek bağlanma gücüne sahiptir ve kolonun iyon değiştirici boncuklarından ayrılması için yüksek bir tuz konsantrasyonu gerektirmektedir. (c) Anyon değişim reçinesi pozitif; katyon değişim reçineleri negatif yüklüdür.

elektriksel imzaya sahip olur. İzoelektrik nokta benzer proteinleri biribirinden ayırmada kullanılabilir. İzoelektrik odaklama **iki boyutlu elektroforez**in birinci boyutudur.

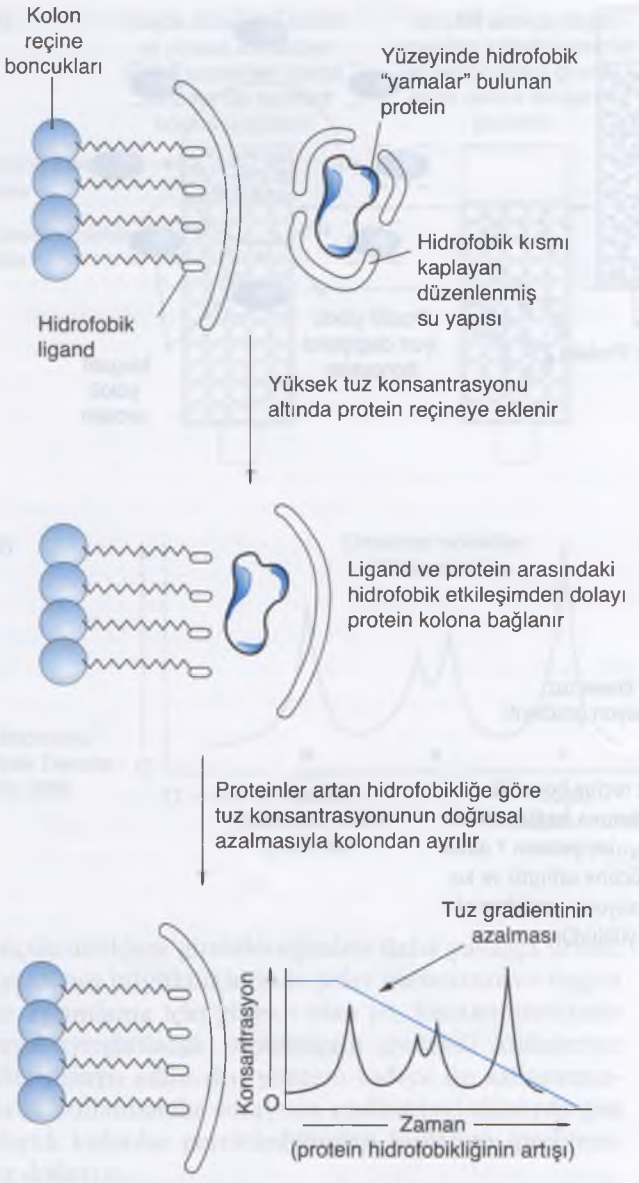
İki boyutlu elektroforez, proteinleri elektrik yüklerine göre ve büyüklüğüne göre ayırmlar. Temelde izoelektrik odaklama ve jel elektroforezi yöntemlerinin bileşkesidir. Bu teknikte araştırıcılar hücresel proteinleri özel olarak hazırlanmış bir polimer şeridin üzerine uygular. Bu şeride elektrik akımı uygulandığında karışımdaki proteinler yüklerine göre tabakalar halinde yerleşirler. Ardından bu şerit bir jelle hizalanır ve tekrar elektrik uygulanır. Proteinler jel boyunca ilerlerken moleküler kütlelerine göre ayrımlanır.

Analitik Yöntemler

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) ekstraktı kolonlardan geçirmek için yer çekimi akışına



ŞEKİL 4.12 **Afinite Kromatografisi** Afinite ligandları saflaştırılacak proteinin eşsiz üç-boyutlu kimyasal bileşenlerine özel olarak bağlanacak şekilde tasarlanır. Bağlanmayan proteinler kolon boyunca yıkanır. Tamponun artan iyonik şiddeti bağlı proteini ayırır ve afinite kolonunun rejenerasyonunu sağlar. Ayrılan (saf) protein toplanabilir ve konsantre edilebilir.



ŞEKİL 4.13 Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi Apolar tamponun artan konsantrasyonu proteinlerin hidrofobik kısımlarının hidrofobik bir iyon değiştirici kolon reçineyle birleşmesini sağlayabilir. İyonik konsantrasyonun daha da azaltılması proteini kolon reçinesinden ayırır ve apolar çözücüyle yer değiştirmesini sağlar. Fraksiyonlar toplanır ve protein konsantrasyonu 280 nmUV ışık altında spektrofotometrik analizle belirlenebilir.

veya çok düşük pompa basıncına dayanan tüm bu açıklanan kromatografi metotlarına yeni bir açılım getirmektedir. Bu tip düşük akışlı yöntemlerde tek bir örneği işlemek saatler gerektirir. Halbuki HPLC sistemleri ekstraktı kısa zamanda kolonlardan geçirmek için yüksek basınçlar uygular. Ama HPLC sistemlerinin de kısıtlamaları vardır. Az miktarda protein ayrılabilir, dolayısıyla seri üretimden çok, analitik ölçümlerde daha yararlı bir tekniktir.

Kütle spektrometresi proteinler arasındaki küçük farklılıkları tanımlamada kullanılan çok hassas bir yöntemdir. HPLC sistemlerinden ayrılan sıvının analizinde de sıklıkla kullanılmaktadır. Bütün kütle spektrometreleri üç şey yapar; örnek moleküllerini yüklü bir gaz fazına geçirir, molekülleri dar bir tüpten hızlıca geçirerek kütle/yük oranlarına dayanarak ayrımlama yapar ve ayrılmış iyonların tespitini yapar. Bir pikogram (bir gramın trilyonda biri) örnek bile bu işlemle analiz edilebilir (**Şekil 4.14**). Son olarak, çoğu proteinin veya analizlenen fragmentlerin kimliğini ve büyüklüğünü içeren tanımlayıcı bir çıktı alınır.

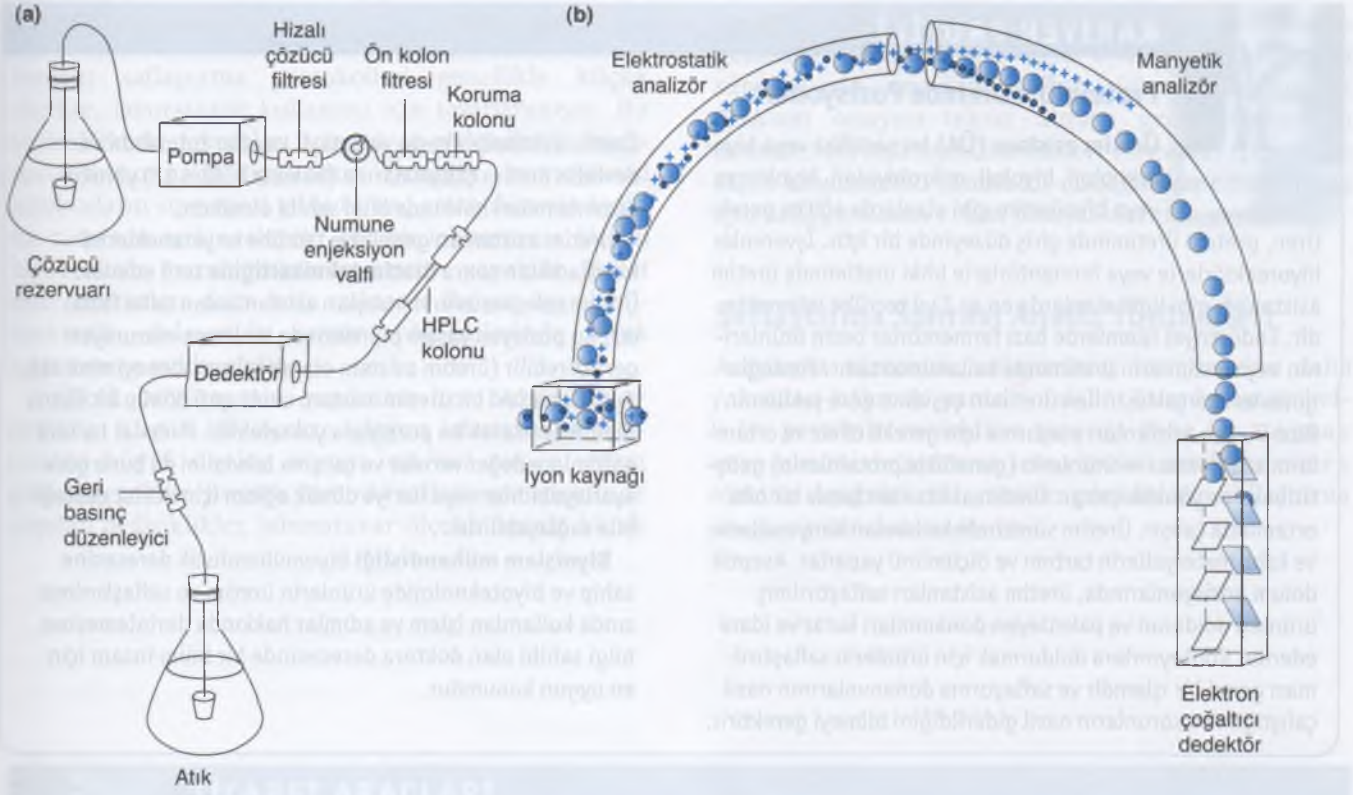
Bu işlemin önemli bir uygulaması protein dizilemedir. Büyükçe bir protein parçalara (peptidlere) ayrılır ve amino asit dizisini belirlemek için analiz edilir. Kütle spektrometresi şimdilerde tercih edilen bir yöntemdir ve biyoteknoloji firmaları tarafından amino asit dizilemede kullanılan ve daha yavaş olan Edmond grup-sonlandırma analizi yöntemiyle geniş çapta yer değiştirmiştir. Kütle spektrometresi aynı proteinin izomerleri arasındaki farkı belirleyebilir ve kritik analizler açısından diğer tüm laboratuvar aletlerine kıyasla kapasitesi daha hızlı gelişmektedir.

Doğrulama

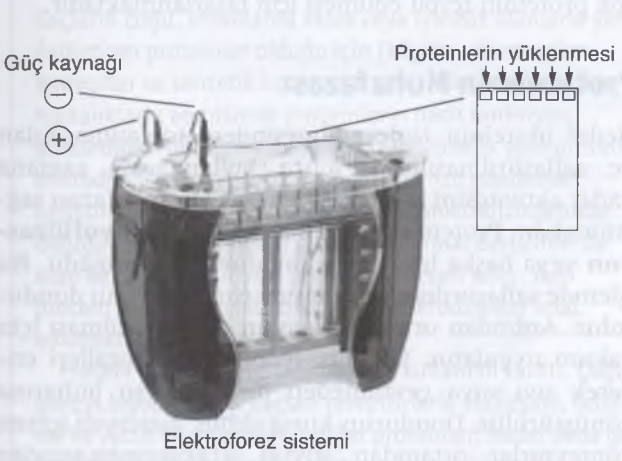
Saflaştırma sürecinin her basamağında hedef proteinin kaybolmadığının ve konsantrasyon çabalarının başarılı olduğunun doğrulanması önemlidir. **SDS-PAGE** (poliakrilamid jel elektroforezi) sıklıkla bu doğrulama için kullanılır. Bu yöntemde sodyum dodesil sülfat (SDS) adı verilen bir deterjan, protein karışımına eklenir ve karışım ısıtılır. Sülfat yükleri denatüre olmuş proteinlere eşit miktarlarda dağılır ve ayrımlamanın sadece proteinlerin büyüklüğüne göre olması sağlanır. Bu uygulamadan sonra protein örneği özel bir jel matriksine (PAGE) yüklenir ve moleküler büyüklük ve kütlesine göre **Şekil 4.15**'de görüldüğü gibi özel bir bölgede tek bir bant oluşturur.

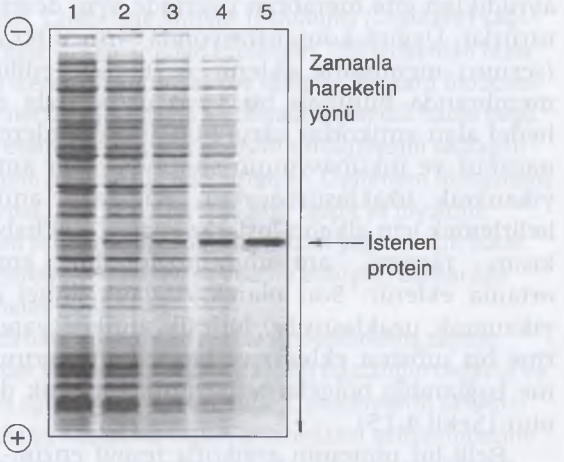
Coomassie boyası gibi proteinlere bağlanan bir boyanın eklenmesiyle renkli bir bant elde edilir ve örnek, molekül ağırlığı bilinen bir markörle karşılaştırılabilir. Örnek ve markörün denk olması, ilgili proteinin gerçekten de konsantre olduğu anlamına gelir. Bu test her bir saflaştırma basamağında yapıldığından, renkli bant giderek koyulaşmalıdır ve bu durum proteinin kaybolmadığını gösterir.

Western Blot yöntemi (Southern Blot yöntemine benzer, Bölüm 3) SDS-PAGE ile ayrılan proteinler için özel bir tayin yöntemidir. Western blot yönteminde protein, jelden nitroselüloz membrana aktarı-



ŞEKİL 4.14 **Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ve Kütle Spektrometresi** Proteinlerin analizinde genellikle HPLC ve kütle spektrometresi birleştirilmektedir. (a) HPLC çok yüksek basınç altında birbirine yakın büyüklükte proteinleri ayırmak için sıkıştırılamaz reçine boncuklar kullanmaktadır. (b) Kütle spektrometrisi bu ön işlemi takip eder, iyonize edilip hızlandırılan proteinler arasındaki küçük farklılıkları belirlemek için analiz edilecek (uzaklık veya zamana göre) proteinler vakum tüpten geçirilir.





ŞEKİL 4.15 **SDS-PAGE** Sodyum dodesil sülfatla ısıtılarak eşit yükler kazandırılmış proteinler poliakrilamid jel elektroforezinde dikey bir elektriksel alanda hareketleri esas alınarak büyüklüklerine göre ayrılabilir. Bu prosedür genellikle her ana saflaştırma basamağından sonra hedeflenen proteine ait bandın daha konsantre olmaya başladığını veya proteinin saflaştırma sürecinde kaybolmadığını doğrulamak için tekrarlanır. 65 kilodalton (kD) proteinin bu prosedürde son safhada (2. sütun) bilinen proteinlerle karşılaştırıldığında (1. sütun) en yüksek konsantrasyona sahip olduğuna dikkat ediniz. (+) kutba en küçük proteinler en önce varacaktır.



KARİYER PROFİLİ

Protein Üretiminde Pozisyonlar

Üretim asistanı (ÜA) bir sertifika veya biyoteknoloji, biyoloji, mikrobiyoloji, biyokimya veya biyoüretim gibi alanlarda eğitim gerektiren, protein üretiminde giriş düzeyinde bir iştir. İşverenler biyoreaktörlerle veya fermentörlerle bitki üretiminde üretim asistanlığı gibi ilgili alanlarda en az 2 yıl tecrübe istemektedir. Endüstriyel işlemlerde bazı fermentörler besin ürünlerinin veya enzimlerin üretiminde kullanılmaktadır. Mesleğin görevleri gerçekleştirilen üretimin çeşidine göre şekillenir. Bazı üretim asistanları araştırma için gerekli cihaz ve ortamların sağlanması ve ürünlerin (genellikle proteinlerin) geliştirilmesine yönelik çalışır. Üretim asistanları temiz bir oda ortamında çalışır. Üretim sürecinde kullanılan kimyasalların ve kaba materyallerin tartımı ve ölçümünü yaparlar. Aseptik dolum pozisyonlarında, üretim asistanları saflaştırılmış ürünleri dolduran ve paketleyen donanımları kurar ve idare ederler. Konteynırlara doldurmak için ürünlerin saflaştırılması genel bir işlemdir ve saflaştırma donanımlarının nasıl çalıştığını ve sorunların nasıl giderildiğini bilmeyi gerektirir. Üretim asistanları kesin ve detaylı kayıtlar tutmalıdır ve devletin üretim çalışmalarına (bakınız Bölüm 12) yönelik düzenlemeleri hakkında bilgi sahibi olmalıdır.

Üretim asistanları genellikle tecrübe ve yeteneklerini kanıtladıktan sonra **üretim teknikerliğine** terfi ederler. Üretim teknikerlerinin maaşları asistanlardan daha fazladır. Bu pozisyon yaşam bilimlerinde bir lisans mezuniyeti gerektirebilir (üretim asistanı olarak çalışma deneyimine ek). Aynı firmadaki bir üretim asistanı okula geri dönüp bir lisans diploması alarak bu pozisyona yükselebilir. Firmalar bu tarz eğitimlere değer verirler ve çalışma takvimini de buna göre ayarlayabilirler veya ileriye dönük eğitim için devlet desteği bile sağlayabilirler.

Biyoişlem mühendisliği biyomühendislik derecesine sahip ve biyoteknolojide ürünlerin üretim ve saflaştırılmasında kullanılan işlem ve adımlar hakkında derinlemesine bilgi sahibi olan doktora derecesinde bir bilim insanı için en uygun konumdur.

lır ve bu proteinin eşsiz yapısına uygun, onu tanıyan özel bir antikor aracılığıyla belirlenir. Antikora bağlanmış bir enzim floresan bir substrata eklenerek tayin için bir sinyal oluşturabilir. Bu işlemde jele bir elektrik akımı uygulanır. Ayrılan proteinler daha sonra jel boyunca ilerler ve SDS-PAGE yönteminde ayrıldıkları gibi membran üzerinde aynı deseni oluştururlar. Uygun konsantrasyonda birincil bir antikor (serum) membrana eklenir ve inkübe edilir. Eğer membranda bulunan bir veya daha fazla antijeni hedef alan antikorlar varsa bunlar proteinlere bağlanacaktır ve inkübasyonun sonunda diğer antikorlar yıkanarak uzaklaştırılacaktır. Bağlanan antikorları belirlemek için alkalin fosfataz enzimi gibi haberci bir kısım taşıyan anti-immünoglobulin antikorlar ortama eklenir. Son olarak, fazlalık ikinci antikor yıkanarak uzaklaştırılır, birleşik antikor yapısı üzerine bir substrat eklenir ve birincil antikorun proteine bağlandığı bölgelerde görünür bir renk değişimi olur (Şekil 4.15).

Belli bir proteinin antikorla tespiti enzim-bağımlı immünosorbent yöntemiyle (ELISA) de yapılabilir. En yaygın olarak kullanılan ELISA iki antikor gerektirir; proteini yakalamak için gerekli olan antikor ve renkli bir tepkime vermesi için bir enzime bağlı olan antikor (bakınız Şekil 4.12). ELISA çok kuyucuklu bir plaka üzerinde afinite kromatografisi kullanılarak gerçekleştirilir. Çok kuyucuklu bir ELISA plakasına proteine özel ilk antikor yayılır, protein daha sonra eklenir ve yıkama-bloklama adımlarından sonra enzime bağlı ikinci antikor eklenir. Eğer antikor bağlanmışsa substratın eklenmesi bir renk reaksiyonunun oluşumunu sağlar. ELISA plakaları, üzerinde araştırma yapılan pek çok proteinin tespit edilmesi için tasarlanmaktadır.

Proteinlerin Muhafazası

Hedef proteinin izole edilmesinden, toplanmasından ve saflaştırılmasından sonra kullanılacağı zamana kadar aktivitesini koruyacağı şartlarda muhafazası sağlanmalıdır. Proteinleri saklamanın bir yolu **liyofilizasyon** veya başka bir deyişle dondurup-kurutmadır. Bu işlemde saflaştırılmış sıvı bir protein solüsyonu dondurulur. Ardından ortamdan suyun uzaklaştırılması için vakum uygulanır. Liyofilizasyonda buz kristalleri eriyerek sıvı suya çevrilmeden doğrudan su buharına dönüştürülür. Dondurup-kurutulmuş materyali içeren konteynırlar ortamdan suyun uzaklaştırılmasından sonra kapatılır ve kurutulmuş proteinler saklanır. Liyofilizasyonun protein yapısını koruduğu gösterilmiştir, bu yüzden biyoteknolojik türevli proteinlerin muhafazasında yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir. Pek çok dondurulup-kurutulmuş protein oda sıcaklığında uzun zaman muhafaza edilebilir.

Protein Saflaştırmada Ölçek Büyütme

Protein saflaştırma protokolleri genellikle küçük ölçekte, laboratuvar kullanımı için tasarlanmıştır. Bu verimlilikteki teknikler ürünün az miktarlarda istenmesi durumunda uygundur. Örneğin, monoklonal antikorların siparişleri yılda birkaç gram düzeyindedir; bu nispeten az bir taleptir. Tek bir laboratuvar ölçekli biyoreaktör yeterli miktarda üretim yapabilir. Fakat bazı proteinlere daha fazla miktarda ihtiyaç duyulabilmektedir, dolayısıyla üretim yöntemlerinde ölçek büyütmeye gidilmelidir.

Ölçek büyütmenin yapılması her zaman kolay değildir. Küçük bir ölçekte işleyen laboratuvar yöntemleri büyük ölçekte üretim için her zaman uyum göstermeyebilir. Bunun yanında saflaştırma işleminde yapılan değişiklikler, laboratuvar ölçekli önceki klinik çalışmaları geçersiz kılabilir. Örneğin FDA bir biyomühendislik proteinini onaylarsa, aynı zamanda üretim sürecini de onaylamış olur. Süreci değiştirmek FDA'nın onayını tekrar almayı gerektirebilir. Bu nedenle, biyoişlem mühendisleri sonradan işlemlerde ölçek büyütmenin mümkün olacağından emin olmak için saflaştırmanın erken basamaklarında yer alırlar.

Saflaştırma Sonrası Analiz Yöntemleri

Araştırma sürecinde saflaştırılmış bir proteine daha yakından bakmak yararlı olabilir. Burada amaç belli bir proteinin moleküler yapısını daha iyi anlamak veya işlevini değiştirmek için yapısını modifiye etmek olabilir. Aşağıdaki iki yöntem proteinlerin saflaştırma sonrası analizinde kullanılır.



TİCARET ARAÇLARI

İnsan Proteomunu Proteinle Birleştirmek

İnsan genomunun keşfinden bu yana proteomlar, yani belli bir yaşam fonksiyonuyla ilişkili protein koleksiyonları, daha önemli hale gelmiştir. Daha önceden belirtildiği gibi bir ilacın pazara çıkması 500 milyon dolara mâl olmakta ve 5 ila 8 yıl sürmektedir. Biyoteknoloji endüstrisinin ürettiği ilaçların çoğu, insanlarda eksik veya işlevsiz olanlarla yer değiştiren proteinler olduğu için (büyüme hormonları, antikorlar ve sentetik hormonlar gibi), firmalar özellikle hastalıkların teşhisinde proteinlerin nasıl fonksiyon gösterdiğini belirlemekle ve tedaviye yönelik yeni protein mikrodizinleri için düşük maliyetli ve hızlı yöntemler geliştirmekle ilgilenmektedirler. DNA mikrodizinlerinde olduğu gibi, bu minyatür cihazlar anormal derişimlerde olan ve hastalıkla ilişkili proteinleri tespit eder. Yeni protein yapıları keşfedildikçe yeni mikrodizinler imal edilmektedir.

Protein mikrodizinlerinin pek çok kullanımı vardır. Çoğu güncel biyoteknoloji ilaçları reseptörlerle etkileşme, tetikleme ve vücut hücrelerindeki diğer proteinleri hedef alma gibi protein düzeyinde işlevler gösterir. Mikrodizinleri kullanarak biyomarkör proteinleri belirlemek pek çok hastalıkta ilaç etkisini izlemede kullanılmıştır. Örneğin, aşıların yararlarını hepimiz tecrübe etmişizdir; aşılar, hastalığı geçirmeden hastalık yapıcı organizmaları tanıması için bağışıklık sistemimizi uyaran proteinlerdir. Aşılamaya bir cevap olarak antikor üretilmesi, bir protein biyomarkörünün etkisine ve pozitif bağışıklık gösterilebileceğine bir örnektir.

Protein mikrodizinleri genellikle proteinleri bağlayan bir materyalle kaplanmış cam slaytlardan yapılır. Tespit edilecek proteine özel antikor tüm slaytlara bağlanır ve proteinlerle eşleşen slaytlarda sinyal oluşturma mekanizması işler. Cambridge Antikor Teknolojisi (İngiltere) sağlıklı bireylerin kanlarından toplanmış 100 milyardan fazla antikor içeren bir kütüphaneye sahiptir. Packard BioScience (Connecticut) kaplama materyaline gömülü halde bağlı olan proteinin üç boyutlu yapısını sürdürmesini sağlayan bir protein mikrodizini geliştirmiştir. Ciphergen Biosystems (California, ABD) çip üzerinde hızlı tespit ve biyolojik örnekten proteinin doğrudan analizini yapmak için kütle spektrometresini mikroçipe adapte etmiştir. Bunlardan başka neler yapılabilir?

Çeşitli hastalıklara dair henüz keşfedilmemiş sayısız proteinler mevcuttur (Bölüm 11). Bir hastalığın tedavisi ve en etkili uygulamanın belirlenmesi, proteinlerin saflaştırılmasına ve hastalıkla ilişkili antikorların geliştirilmesine dayanmaktadır. Yakın zamana kadar şifasız hastalıkların koşullarını değiştirme imkânı, ilgili proteomdaki önemli proteinlerin keşfi ve saflaştırılmasına bağlıdır. Bu önemli teknolojiyi takip etmek için bu tarz cihazlar geliştiren bazı firmaları şu adreslerde inceleyebilirsiniz; www.ciphergen.com, www.packardbioscience.com, www.biacore.com

Protein dizileme

Protein yapılarıyla ilgili konulardan, primer (birincil) dizi adı verilen her proteinin özel bir amino asit dizisine sahip olduğunu hatırlayınız. Proteini tam anlamıyla anlamak için primer yapısının belirlenmesi oldukça önemlidir. Otomatik protein dizileyiciler bu işi yapmaktadır (bakınız Şekil 4.14). Kütle spektrometresinde peptid kütleleri, eşsiz imzaları (tutulma süreleri) sayesinde tanımlanırlar. Peptidlerin iyonlara çevrilmesiyle ve vakumda hızlandırılmalarıyla birkaç dakika içinde pek çok özgün proteinin tanımlanması mümkündür.

X-ışını kristalografisi

X-ışını kristalografisi proteinlerin kompleks tersiyer ve kuaterner yapılarının tayininde kullanılır. Bu yöntem dikkatlice dehidralize edilmiş proteinlerin saf kristallerine ihtiyaç duyar. X-ışınlarıyla bombardıman edilince saf bir protein kendi biçimlenmesine göre özel gölge motifleri oluşturur (bakınız Bölüm 2). Bu motiflerin bilgisayar analizi "ribbon (kurdele)" diyagramları çıkarmaya yarar; bunlar sadece proteinin yapısını göstermekle kalmaz, aynı zamanda fonksiyonunu geliştirmek için potansiyel modifikasyonlar planlamayı da mümkün kılar. Protein kristallendirme genellikle FDA onayı için gerekli tutulur, çünkü bu sayede onay verilecek ürünün bu işlemle üretilmiş olduğu gösterilmiş olur.

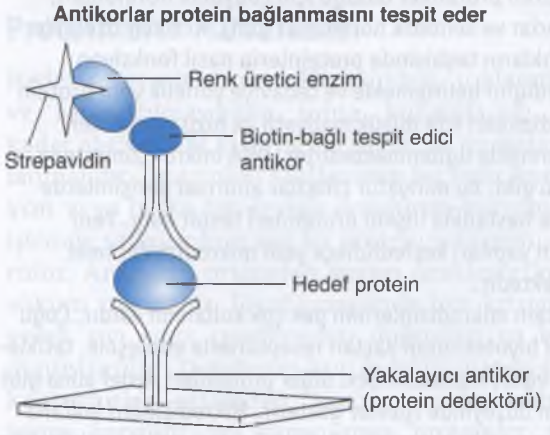
4.4 Proteomik

Pek çok hastalık protein ekspresyonundaki hataların sonucunda oluşur, fakat bu hastalıkların tümü genetik mutasyonla anlaşılamaz. Proteinler posttranslasyonel modifikasyonlar geçirdiği için, bulmaca çok daha karmaşık olabilir. Yeni bir bilimsel disiplin olan **proteomik,** hastalıklarla protein ekspresyonu arasındaki ilişkiyi anlamaya yoğunlaşmıştır.

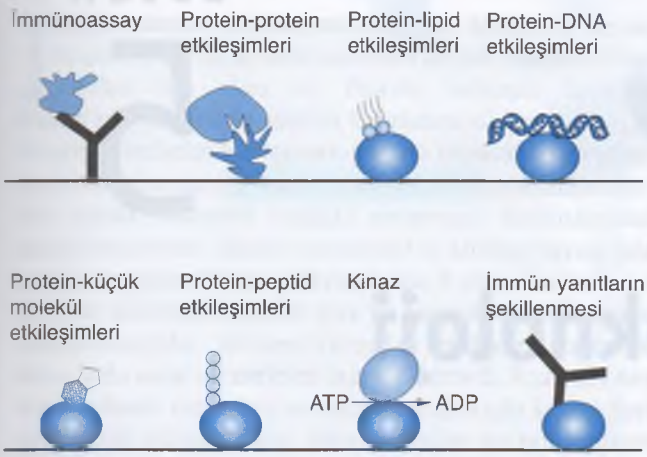
Proteomikte **proteomlar** (PROTEin ve genOM'un birleşimi) sağlıklı ve hastalıklı durumlar için karşılaştırılır. Böylece protein ekspresyonundaki varyasyonlar belli bir hastalığın bağlangıcı veya ilerlemesiyle ilişkilendirilir. Proteomik araştırmaların amacı yeni teşhis yöntemlerinde ve hastalıkların tedavisine yönelik hedef ilaç geliştirilmesinde kullanılabilecek protein markörlerinin keşfidir. Örneğin, Kaliforniya Üniversitesi (Davis) bilim insanları meme kanseriyle ilgili bir onkogen olan BRCA2 geninin ürettiği proteini saflaştırdılar. Daha sonra araştırıcılar DNA tamirinde BRCA2'nin rolünü belirlemek için bu proteini sentezlediler. BRAC2, meme kanserinde yaşama oranını % 70'e yakın artıran trastuzumab adlı ilaca (Herceptin; Genentech, San Francisco) duyarlıdır. Bu yolla sadece BRAC2 biyomarkörlerine sahip hastalar trastuzumab almaktadır ve böylece diğer meme kanseri hastaları ilaçtan kaynaklanan rahatsızlıklardan ve lüzumsuz tedaviden kurtulmaktadır.

BRCA2 geni 1994'de keşfedilmesine rağmen, bu gen tarafından sentezlenen proteinin saflaştırılması zor olmuştur. Çünkü protein oldukça uzundur, iyi bir şekilde eksprese edilmez ve kolay bozunmaktadır. Kaliforniya Üniversitesi'ndeki araştırıcılar farklı hücre kültürlerini test ederek BRCA2 genini bir insan hücre kültürüne aktarmayı başardılar ve tam bir protein olarak ekspresyonunu sağladılar. Diğer araştırıcılar genetik mühendisliği teknikleriyle insan proteinini mayalarda üretmeyi başardılar. Ardından saflaştırılmış proteinin hasarlı DNA tamirindeki işlevini test ettiler. BRCA2 proteini ile yapılan deneyler, hasarlı DNA onarımında rolü olduğunu ve meme kanserinde zarar gördüğü zaman DNA'nın işlev göremediğini onaylamıştır. BRCA2 ve meme kanseriyle ilgili diğer proteinlerin fonksiyonları üzerine araştırmalar devam etmektedir, fakat burada proteomik olmadan ilerleme sağlanamazdı.

Proteomikte daha önceden açıklanan çeşitli teknikler uygulanır; iki boyutlu elektroforez proteinleri ayırmada kullanılır, kütle spektrometresi proteinin kimliğini doğrular ve amino asit dizileme yöntemiyle protein karakterize edilir. Bu gibi yoğun emek isteyen çalışmalar ileride otomasyonla desteklenebilir. Bir **protein mikrodizini (protein mikroçip)** genelde cam bir slayt yüzeye immobilize edilmiş bir dizi protein içerir ve üzeri bağlanmayla renk değiştiren bir



ŞEKİL 4.16 Protein Mikrodizinleri Tek bir proteini benzersiz bir biçimde bağlayan protein mikrodizinleri kusursuzlaştırılmaktadır. Protein bağlandığında floresan bir sinyal üretmektedir. Özgün proteinlerin varlığını saptayabilmek hastalığın tanısında ve izlenecek tedavide uygun seçimlerin yapılmasına olanak sağlayacaktır.



ŞEKİL 4.17 Protein Mikroçipleri Proteinlerden Başka Şeyleri de Belirleyebilir Protein mikroçiplerinin kapasitesi artmıştır. Fonksiyonel protein mikroçipleri yakın zamanda protein etkileşimlerinin (protein-protein, protein-lipid, protein-DNA, protein-ilaç gibi) keşfinde kullanılmıştır ve bu sayede normal hücre fonksiyonlarında protein etkileşimlerinin önemi hakkındaki bilgiler artmıştır. Antikorların ve diğer proteinlerin matrikse bağlanması bunların tespitini sağlar.

maddeyle kaplanmıştır (**Şekil 4.16**). Bu çiplerin kapasitesi artmıştır fakat DNA çipleriyle rekabet edemezler, çünkü üretimlerinde bazı zorluklar vardır. Tek bir DNA çipi tüm genomun ekspresyonunu görüntüleyebilir. Fonksiyonel protein mikrodizinleri yakın zamanda protein etkileşimlerinin keşfinde kullanılmıştır: protein-protein, protein-lipid, protein-DNA, protein-ilaç etkileşimleri (**Şekil 4.17**) gibi.

BİR FARK YARATMAK

Gördüğümüz gibi hastalıkların teşhis ve tedavisi protein saflaştırma teknolojisiyle geniş çapta ilerlemiştir. Buna karşın çözülmesi gereken bazı sorunlar da vardır; biyolojik sıvılar (plazma, antiserum, idrar ve tükürük) çeşitli miktarlarda protein derişimlerine sahiptir ve bazı proteinlerin, hastalıklarda olduğu gibi, yüksek konsantrasyonları biyomarkör denen diğer özel proteinlerin varlığını maskelemektedir. Düşük derişimlerdeki bu biyomarkör proteinleri çoğu zaman doğal enzimler tarafından veya saflaştırma işlemi nedeniyle parçalanır. Bu sorunu ele almak için Virginia Ceres Nanosciences saflaştırma yöntemlerinde nanoteknolojiyi uygulamaktadır. Nanotrap® ise özel biyomarkörleri yakalamak için gözenekli nanoparçacıkları kullanmaktadır. Nanoparçacıklar yüzeydeki porların küçük olması nedeniyle diğer proteinlerin nüfuz etmesini engeller. Nanotrap teknolojisi bir hastalığın işareti olan proteinlerin tespitini mümkün kılmasıyla protein saflaştırma sürecine yeni bir boyut kazandırmaktadır. Nanoteknoloji hastalıkların tedavisine bir farklılık getirmektedir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Proteinlerle ilgili genel veri tabanları ne işe yarar?
2. Yönlendirilmiş moleküler evrim teknolojisi doğal mutasyonlardan nasıl farklılık gösterir?
3. Protein yapısını anlamada PSI'nin nasıl bir yararı olmuştur?
4. Proteinler neden öncelikle cDNA ürünleri üzerinden araştırılır?
5. Eğer organizmalar proteinleri kendileri üretebiliyorsa neden firmalar proteinlerin patentini alabilmektedir?
6. Eğer boyut dışlama kromatografisiyle küçük bir proteini saflaştırıyorsanız hangi fraksiyonları almalısınız?
7. İyon değiştirici bir kolona kuvvetli bağlanan proteinler kolondan önce mi sonra mı ayrılır?
8. Afinite kromatografisi proteinleri ayrıştırmada iyon değişim kromatografisine göre daha mı az yoksa daha mı fazla seçiciliğe sahiptir?
9. Temelde analitik yöntemler için kullanılan protein saflaştırma yöntemlerini yazınız.
10. Protein saflaştırma basamaklarının her birinde SDS-PAGE analizi yaptığınızı ve son saflaştırma basamağı sonucunda beklediğiniz bölgede bir bandın eksikliğiyle karşılaştığınızı düşünün, bunun nedeni ne olabilir?

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden
Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

5

Mikrobiyal Biyoteknoloji

Çevirenler: Deniz EKİNCİ, Ahmet Can OLCAY

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Prokaryotik ve ökaryotik hücre yapılarının nasıl ayrıldığına dair örnekler verebilmelisiniz.
- Biyoteknolojide kullanım için bakterileri yararlı kılan özellikleri tanımlayabilmelisiniz.
- Mayaların biyoteknolojide nasıl kullanıldığına dair örnekler verebilmelisiniz.
- Rekombinant DNA teknolojisi ile bakterilerde üretilen tıbbi öneme sahip protein örneklerini listeleyebilmelisiniz.
- Alkol ve laktik asit fermantasyon süreçlerinin yaygın tüketilen yiyecek ve içeceklerin üretiminde nasıl kullanıldığını açıklayabilmelisiniz.
- Mikroorganizmaların aşı üretimi ve geliştirilmesinde oynadığı rolü açıklayıp, farklı aşı örnekleri verebilmelisiniz.
- Mikrobiyal genom araştırmalarının neden önem taşıdığını tartışabilmelisiniz.
- Bilim insanlarının biyoteknolojik uygulamalar için yapay genom ve yapay biyoloji kullanımına neden ilgi duyduğunu anlayabilmelisiniz.
- Metagenomik biliminin önemini açıklayıp, İnsan Mikrobiyom Projesinin hedeflerini ifade edebilmelisiniz.
- Biyoterörizmi açıklayıp, biyolojik silah olarak kullanılabilecek mikroorganizmaları tanımlayabilmeli ve onlarla savaşım stratejilerini tartışabilmelisiniz.



Bu fotoğrafın merkezinde gösterilen *Escherichia coli* (*E. coli*) hücresi gibi mikroplar, biyoteknoloji uygulamalarında uzun bir geçmişe sahiptir. Bu hücrenin hücre duvarı ve zarı patlatılarak, bakteriyel kromozom açığa çıkarılmıştır.

İtalyan sanat restorasyoncuları, on dördüncü ve on beşinci yüzyıla ait dünyanın en büyük koleksiyonlarından biri olan ve Pisa'da bulunan Leaning Kulesi'nin yakınlarındaki bir kabristanı süsleyen ortaçağ duvar resimlerini kurtarmak için ne yapacaklarını şaşırmış durumdayken; *Pseudomonas stutzeri* olarak adlandırılan toprak bakterisi imdada yetişmişti. Restorasyonu gerçekleştirenler, duvar resimlerini II. Dünya Savaşı'nda meydana gelen hasarı gidermek için kullanılan tutkalın boyalar üzerinde bıraktığı leke ve kirlerden arındırmaya çalışmaktaydılar. Bilinen kimyasal maddeler resimlere daha fazla zarar vermekten öteye gidemedi. *P. stutzeri*'nin azotu, plastik reçineleri ve tetrakloretilen gibi kirleticileri çözebildiği bilindiğinden; bilim insanları bu mikropların bir suşunu laboratuvarda kültüre aldı ve bunları duvar resimlerine uyguladı. Bakteriler 6 ilâ 12 saat içinde tutkal kalıntısının yaklaşık % 80'ini temizledi ve kalanlar da hafif bir yıkamayla giderilebildi. Bu **mikroorganizmalar** için önerilmiş bir sonraki proje ise, Yunanistan'da kireç taşlarından ve mermer anıtlardan siyah tortuların temizlenmesidir.

Mikroorganizmalar veya **mikroplar**, çıplak gözle tek tek görülemeyecek kadar küçük organizmalardır; mikroskop yardımıyla görüntülenmelidirler. En çok bulunan mikroorganizma bakteriler olsa da; virüsler, maya ve küf gibi funguslar, algler ve protozoa denen tek hücreli organizmalar da mikroplara dâhildir. Bakteriler yeryüzünde 3.5 milyarı aşkın yıldır yaşamaktadır ve sayıca insanlardan fazlasıyla üstündür. Dünyadaki canlıların % 50'den fazlasını mikropların oluşturduğu tahmin edilmektedir. Şimdiye dek tüm bakterilerin % 1'inden daha azı tanımlanmış, kültürü yapılmış ve laboratuvarda araştırılmış bulunmaktadır. Bakteriler tam anlamıyla etrafımızı sarmış durumdalar. Onlar derimizde, ağzımızda ve bağırsaklarımızda yaşıyor; onlar havada ve adeta dokunduğumuz her yüzeydeler. Bakteriler aynı zamanda gezegendeki kimi en zorlu ortamlarda yaşamaya adapte olmuşlardır; kutup buzlarının tepeleri, çöller, sıcak su kaynakları ve okyanus yüzeyinden kilometrelerce derinlerde bulunan hava delikleri gibi.

Bakteri ve diğer mikropların bol miktarda bulunması, çok fazla sayıda potansiyel biyoteknoloji uygulamasına olanak sağlamaktadır. Gen klonlama yöntemlerinin geliştirilmesinden çok öncelerde de insanlar mikroorganizmaları biyoteknolojide kullanmaktaydılar. Bu bölümde temel olarak, biyoteknolojinin eski ve yeni uygulamalarında, bakterilerin oynadığı önemli rolleri ele alacak ve biyoterörizmin aracıları olarak mikropların yarattığı tehlikeleri tartışarak sonuçlandıracağız.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Mikrobiyal biyoteknolojinin gelecekteki yönelimi üzerine tahminlerde bulunmak hiç de kolay değildir; çünkü büyük potansiyele sahip olan birçok etkin çalışma alanı bulunmaktadır. En çok ilgi uyandıran alanlardan ikisi yapay genomlar ve biyoyakıtlardır. Bölümde ilerledikçe öğreneceğiniz gibi; bir bakteri suşu için yapay bir genom meydana getirilmiş ve başka bir suşa aktarılmıştır. Bu teknolojinin ve sentetik biyoloji alanının gelecekteki uygulamaları neler olacak? Sonunda yapay bir ökaryotik genomun üretilmesi mümkün olacak mı? Fosil yakıtlara olan küresel bağımlılığımızın azalması ve alternatif enerji kaynakları yaratılması için biyoyakıtlara büyük bir ihtiyaç vardır. Yakıt üretimi için metabolik süreçlerde ya da geniş çapta etkin ve düşük maliyetli kullanım olanağı sunan yakıtlara dönüşebilen bileşenleri açığa çıkaracak materyallerin parçalanmasında mikroplardan yararlanılabilecek mi? Mikrobiyal biyoteknoloji, birçok yeni uygulama üreten dinamik bir alandır. Gelecekte mikrobiyal biyoteknolojinin yeni konuları olabilecek çok sayıda farklı başlık öngörmemiz mümkün, fakat gözümüzü biyoyakıtlar ve sentetik biyolojide meydana gelen gelişmeler üzerinde tutmamızın oldukça ilginç olacağını düşünmekteyiz.

5.1 Mikropların Yapısı

Mikrobiyal biyoteknolojinin birçok uygulamasını değerlendirebilmek için, öncelikle mikroorganizmaları bitki ve hayvan hücrelerinden ayırt edebiliyor olmalısınız. Hatırlayacak olursak, hücreler genel anlamda, hücrede DNA'yı taşıyan çekirdeğin varlığı (ökaryotlar) ya da yokluğu (prokaryotlar) temel alınarak sınıflandırılabilir (Bölüm 2). *Ökaryotik* hücreler; bitki ve hayvan hücreleri, maya gibi funguslar, algler ve aralarında lise biyoloji derslerinde görmüş olabileceğiniz amiplerin de bulunduğu protozoalar denen tek hücreli canlıları içermektedir. Ökaryotik hücrelerin aksine *prokaryotik hücreler*; çekirdek gibi birçok zarlı organelden yoksundurlar. Prokaryotlar, hem ökaryot hem de prokaryotların özelliklerini taşıyan organizmalar olan **Bakteri** ve **Arke domainleri**ni (alem basamağının üzerindeki taksonomik kategoriler – üst alem) içerirler. Mikroorganizmaların hücresel yapısı hem nerede büyüyüp gelişebileceklerinin hem de biyoteknolojide nasıl kullanılabileceklerinin belirlenmesi açısından önem taşımaktadır. Örneğin, çok tuzlu koşullar gibi uç noktadaki ortamlarda yaşayabilen Arkeler halofil, çok sıcak ortamlarda yaşayabilenler ise termofiller olarak adlandırılmakta ve sonuç olarak bunlar benzersiz metabolik özellikler taşımaktadır. Bundan başka, bakterilerin özellikle yapısal özellikleri, onları biyoteknoloji araştırmaları için mükemmel mikroorganizmalar yapmaktadır.

Bakteri hücreleri (1-5 mikrometre ya da µm; 1 µm = 0,001 milimetre) ökaryotik hücrelerden (10-100 µm) daha küçüktür ve çok daha basit bir yapıya sahiptir (prokaryotik hücre yapısı diyagramı için Şekil 2.1'e bakınız). Bakteri hücreleri aynı zamanda şu yapısal özellikleri gösterir:

- DNA bir çekirdeğin bünyesinde değildir ve tipik olarak histon proteinlerinden yoksun, tek ve dairesel bir kromozomdan oluşur.
- Bazı bakteriler plazmid DNA içermektedir.
- Bakterilerde membrana bağlı organeller bulunmaz.
- Hücre zarını çevreleyen hücre duvarı, yapısal olarak bitki hücre duvarından farklıdır. **Peptidoglikan** adı verilen karmaşık bir polisakkarit ve protein maddesinden oluşan hücre duvarı, hücreleri koruyan ve onlara şeklini veren sert bir dış bariyer oluşturmaktadır. Arkelerde bu yapı peptidoglikan içermemektedir.
- Bazı bakteriler, *kapsül* adı verilen bir yapı oluşturan, dışsal bir karbonhidrat tabakasına sahiptir.

Çoğu bakteri, hücre duvarının boyalar kullanılarak renklendirildiği bir yöntem olan **Gram boyaması** ile sınıflandırılmaktadır. Gram-pozitif bakteriler mor renge boyanmakta ve peptidoglikanlarca zengin basit bir hücre duvarı yapısına sahipken, gram-negatif bakteriler pembeye boyanır ve daha az peptidoglikan içeren karmaşık bir hücre duvarı yapısına sahiptir. Bakteriler, hayvan ve bitki hücreleri gibi çok hücreli dokular oluşturmamalarına rağmen, bazıları bitişik hücre zincirleri ya da iplikçikleri oluşturmak amacıyla birbirleriyle bağlantılı olabilmektedir.

Bakteriler boyutlarına ya da şekillerine göre farklılık gösterirler. En yaygın şekil **koklar** (tekili, kok) adı verilen küresel hücreler, **basiller** (tekili, basil) denen çubuksu bakteriler ve sarmal şekilli (spiral) bakterilerdir (**Şekil 5.1**). Mikropları çalıştıkça, bakteri isimlerinin çoğu zaman size o hücrelerin şekilleri hakkında ipucu verdiğini göreceksiniz. Örneğin, *Staphylococci* derimizin yüzeyinde yaşayan küresel bakterilerdir. Bu bakteriler, Yunanca'da üzüm salkımları anlamını taşıyan terimden gelen adlarını yansıtan bir şekilde, üzüm salkımlarına benzer bir görünüm alarak büyümektedir.

Çoğu bakterinin genomunu oluşturan tek dairesel kromozom, nispeten küçüktür. Tipik bir insan kromozomu 200 milyon baz çifti büyüklüğündeyken; bakteriyel kromozomlar 2 milyon ilâ 4 milyon baz çifti arasında değişen büyüklüğe sahiptir. Bölüm 3'te öğrendiğiniz gibi, bazı bakteriler kendi kromozomal DNA'larının yanı sıra plazmidler de içermektedir. Plazmid DNA çoğunlukla yaşam için vazgeçilmez olan genleri taşımaz. Antibiyotiklere dayanıklılık genleri ve *pili* adı verilen bağlantı tüpleri meydana getirerek bakterinin hücreler arası DNA alışverişi yapmasına olanak tanıyan proteinleri kodlayan genler bunlara birer örnektir (Şekil 2.1'e bakınız). Yine de, rekombinant DNA çalışmalarında DNA parçalarının klonlanması için kullanıldığından, plazmid DNA moleküler biyologlar için vazgeçilmez bir araçtır.

Bakteriler hızla gelişip bölünürler. En uygun koşullar altında çoğu bakteri hücresi yaklaşık her 20 dakikada bir bölünürken, ökaryotik hücreler bölünmeden önce 24 saat veya daha uzun bir süre boyunca gelişmeye devam eder. Bu nedenle, laboratuvardaki uygun gelişme koşulları altında küçük bir bakteri populasyonu, her biri özdeş olan milyonlarca hücre oluşturacak şekilde hızlıca bölünebilir. Bakteriler çok küçük olduğundan, milyonlarca hücre küçük agar kaplarında ya da sıvı kültür ortamında kolayca yetiştirilebilir. Kültür kaplarında büyütüldüklerinde, her bir bakteri hücresi binlerce ya da milyonlarca hücre içeren dairesel koloniler oluşturmak üzere bölünür (**Şekil 5.2a**). Biyoteknolojideki birçok uygulama için, bakteriler genellikle yüzlerce veya binlerce litre sıvı kültür ortamı taşıyabilen fermentörlerde yetiştirilmektedir (Şekil 5.2b).

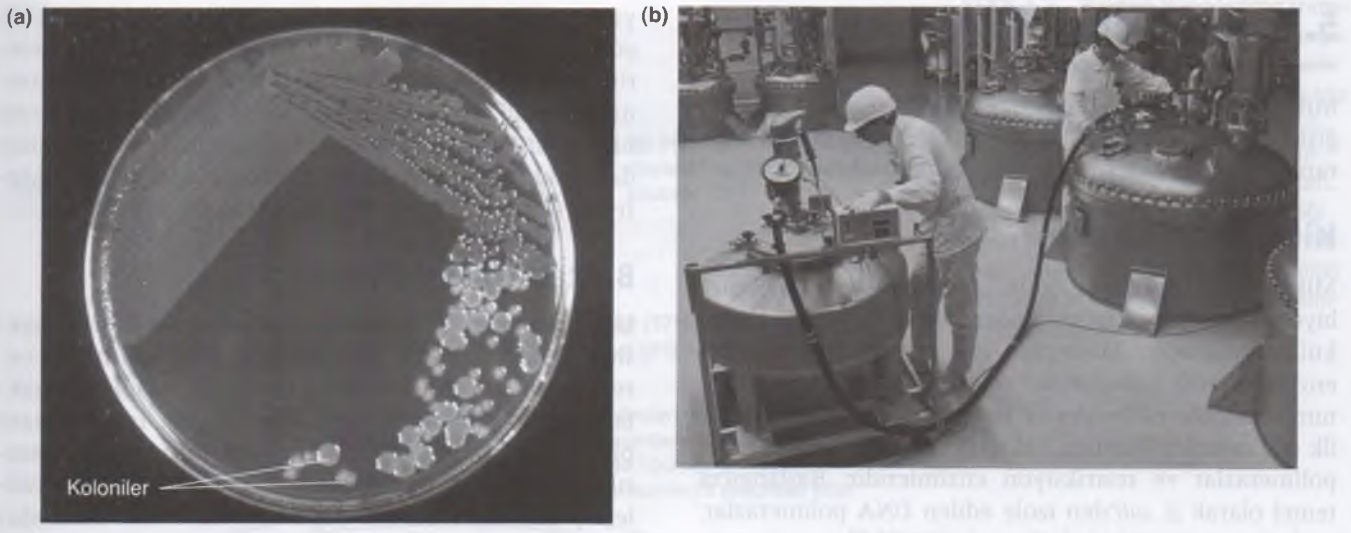
Moleküler ve genetik çalışmalarda kullanılabilecek mutant bakteri suşları meydana getirmek de nispeten kolaydır. Mutantlar bakterilerin x ışınları, ultraviyole ışık ve DNA'yı mutasyona uğratan farklı birçok kimyasalın (mutajenler) etkisi altında bırakılmasıyla elde edilebilmektedir. Tüm bunlar ve daha birçok sebepten bakteriler, çoğu mikrobiyolog için en gözde organizmalar olmanın yanında; moleküler biyoloji, genetik, biyokimya ve biyoteknoloji çalışmaları için de en uygun model organizmalardır.

Mayalar da Önemli Mikroplardır

Bu bölümün ana odağı bakterilerin biyoteknolojideki uygulamaları, ancak **mayalar** da biyoteknolojide birçok önemli görevi yerine getirmektedir. Aslına ba-



ŞEKİL 5.1 Bakteri Şekilleri En yaygın bakteri şekilleri (a) küresel, (b) çubuksu ve (c) spiraldir.



ŞEKİL 5.2 Kültüre Alınmış Bakteriler (a) Birçok bakteri çeşitli koşullar altında sıvı kültür ortamında veya burada gösterilen petri kabındaki gibi katı ortamda yetiştirilebilir. Katı ortamda birçok bakteri, tek bir hücreyle başlayıp bunun hızlıca bölünmesiyle çıplak gözle görülebilecek bir benek haline gelen ve koloni adı verilen dairesel topluluklar halinde büyür. (b) Bakteriler büyük miktarlarda da üretilebilir. Burada gösterilen fermentörlerde sıvı kültür ortamında büyüyen yüzlerce litre bakteri bulunmaktadır. Bu fermentörler, bakterilerin rekombinant protein izolasyonu için büyütülmesi ya da şarap üretimi için maya kültürü yapılması gibi farklı amaçlara hizmet eden biyoreaktörler olarak işlev görmektedir.

karsanız, arkeologlar MÖ 4300'den kalma antik Babil yazıtları üzerinde biyoteknolojinin belgelenmiş en eski uygulamalarından biri olan, maya kullanarak bira üretimini anlatan tarifler açığa çıkarmışlardır. Çok daha yakın zamanda, rekombinant insan antikorları üreten maya elde edilmiştir. Mayalar, **Fungi Alemi**'nde yer alan tek hücreli ökaryotik mikroplardır.

1.5 milyonu aşkın türe sahip olan fungusların şu ana kadar yalnızca yaklaşık % 10'luk kısmı belirlenmiş ve sınıflandırılmıştır. Bu nedenle funguslara ait çok daha değerli ürünlerin belirlenmesi için önemli bir potansiyel bulunmaktadır. Örneğin, funguslar antibiyotikler ve kan kolestrolü düşürücü ilaçlar için önemli bir kaynak oluşturmaktadır. Bitki ve hayvan hücreleri gibi diğer ökaryotik hücrelerde bulunanlara benzer birçok yapıya sahip olmalarının yanı sıra mayalar; sitoplazmalarında birtakım zarla çevrili organeller, hücre iskeleti ve insandakine benzer kromozom yapıları da içermektedirler. Maya hücreleri aynı zamanda birçok bakteriden daha büyük bir genoma sahiptir. Bu özellikler maya hücrelerini kromozom yapısı, gen regülasyonu, hücre bölünmesi ve hücre döngüsü kontrolü çalışmaları için çok değerli bir model organizma yapmaktadır. Yapay maya kromozomlarının (YAC'lar) İnsan Genom Projesinde önemli roller üstlendiği unutulmamalıdır (Bölüm 3).

Çoğunluğu bakterilerden büyük olsa da, farklı maya tipleri büyüklükçe ve küresel, eliptik, silindirik olmak üzere şekilce çeşitlilik göstermektedir. Birçoğu oksijen varlığında **(aerobik koşullar)** veya yokluğunda **(anaerobik koşullar)** ve çeşitli besinsel gelişme koşulları altında gelişebilmektedir. Çok sayıda farklı maya mutant tipleri de mevcuttur. Yaygın biçimde çalışılan bir maya suşu olan *Saccharomyces cerevisia*, tüm genomu dizilenen ilk ökaryotik organizmadır. 12 milyondan fazla DNA baz çifti ve yaklaşık 6 300 gen içeren 16 doğrusal kromozomu vardır. Mayalardaki gen ekspresyonu mekanizmaları insanlardakine benzerlik gösterir. Birçok insan hastalık geni mayalarda da bulunmuştur ve bilim insanları bunları araştırarak, bu genlerin insanda nasıl işlev gördüğü ve mayalarla olan evrimsel ilişkimiz hakkında çok şey öğrenebilir.

Pichia pastoris adı verilen bir maya suşunun oldukça kullanışlı bir organizma olduğu kanıtlanmıştır. *Pichia* sıvı kültürde diğer maya laboratuvar suşlarının çoğundan daha yüksek bir üreme yoğunluğuna (biyokütle) ulaşır, proteinlerin yüksek oranda üretiminde kullanılabilecek birçok güçlü promotöre sahiptir ve geniş ölçüde hücre üretimi için **seri işlemler**de kullanılabilir. Gelecek kısımda, mikroorganizmaların bilim insanları tarafından biyoteknoloji araştırmalarında değerli birer araç olarak nasıl kullanılabileceğini değerlendireceğiz.

5.2 Araç Olarak Mikroorganizmalar

Mikroorganizmalar, doğal hallerinde veya genetiği değiştirilmiş formlarında, kullanışlı birer araç olarak hayranlık verici şekillerde yarar sağlamaktadırlar.

Mikrobiyal Enzimler

Mikrobiyal enzimler, besin üretiminden moleküler biyoloji araştırmalarına kadar, farklı uygulamalarda kullanılmaktadır. Mikroplar çok iyi ve kullanışlı bir enzim kaynağı olduğundan moleküler biyolojide kullanım için izole edilmişlerdir ve şu an piyasada bulunan ilk enzimlerden bazıları, bakterilerden elde edilen DNA polimerazlar ve restriksiyon enzimleridir. Başlangıçta temel olarak *E. coli*'den izole edilen DNA polimerazlar, prob yapımı için DNA dizilerinin işaretlenmesinin yanı sıra, DNA çoğaltımında kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi bir dizi rekombinant DNA tekniği için kullanıma sunulmuştur.

Taq, sıcak kaynak suyu arkesi *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş, PCR için vazgeçilmez olan, ısıya dayanıklı bir enzimdir (Bölüm 3'te Taq DNA polimeraz, **ısıya dayanıklı enzim** olarak anlatılmıştı). Aşırı sıcakta dahi büyüyüp gelişebilme yetilerinden dolayı bu mikroplara **termofiller** ("sıcağı seven" anlamına gelen Yunanca sözcüklerden) denmektedir. Diğer termofillerden de benzer şekilde birçok ısıya dayanıklı enzim izole edilmiştir. Örneğin, PCR için geniş çapta kullanılan ısıya dayanıklı gözde bir enzim olan Pfu DNA polimeraz; aslen jeotermal olarak ısınan deniz tortullarında yaşayan bir arke türünden, *Pyrococcus furiosus*'tan elde edilmiştir. Çeşitli şirketler, yeni ve değerli enzimler içermesi muhtemel olan potansiyel öneme sahip diğer mikroorganizmaların belirlenmesi için, ABD hükümetinden Yellowstone Ulusal Parkı'ndaki sıcak su kaynaklarında arama yapma izni almışlardır. **Biyoaraştırma** olarak anılan benzer projeler, tüm dünyada yapılagelmektedir. Kısa zaman önce Pasifik Okyanusu'nun kuzeydoğu tabanındaki bir hidrotermal ağızdan, henüz adı konmamış bir bakteri suşu izole edilmiştir. Bu suşun, yaşamın var olabileceği en yüksek sıcaklık sınırı için şu ana kadarki rekor olduğu düşünülen 121°C'de canlı kaldığı görülmüştür.

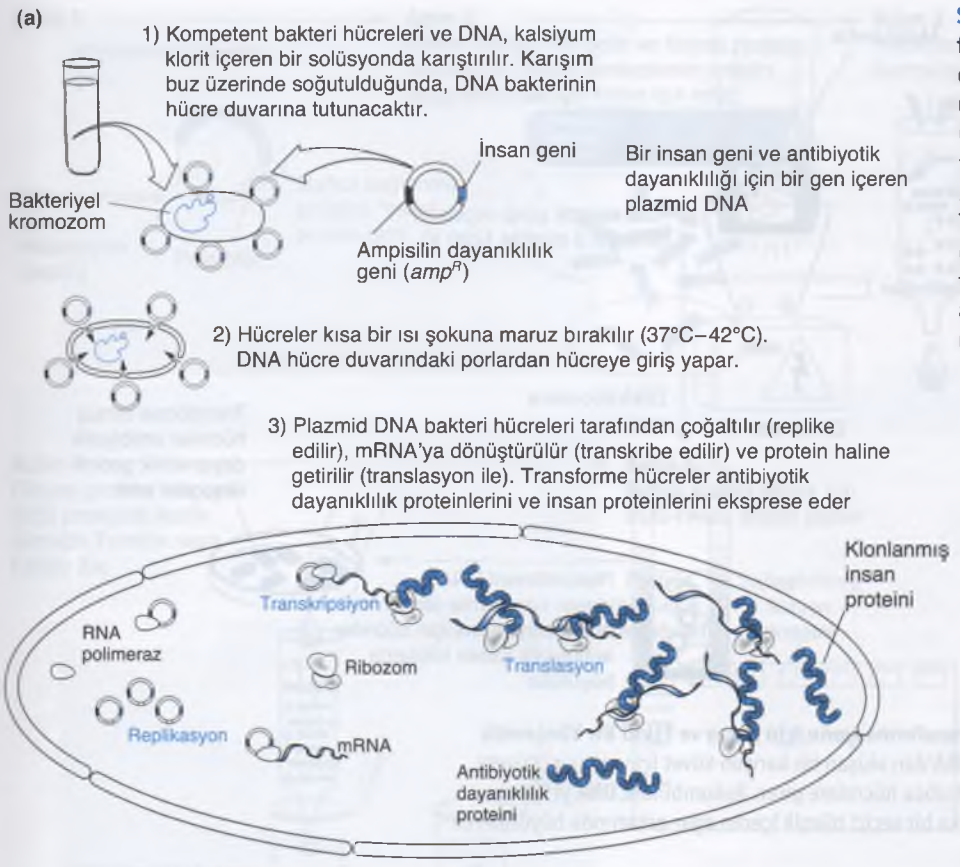
E. coli tarafından üretilen **selülaz** enzimi, bitki hücre duvarını meydana getiren bir polisakkarit olan selülozu parçalar. Selülaz, hayvansal besinleri çok daha kolay sindirilebilir hale getirmek için sıkça kullanılmaktadır. Hiç taşlanmış kumaştan bir kot pantolonunuz oldu mu? Bu yumuşak ve ağarmış pantolonlar taşlarla yapılan sıradan bir yıkamayla değil, *Trichoderma reesei* ve *Aspergillus niger* gibi mantarlardan elde edilen bir selülaz karışımının kumaşa uygulanmasıyla üretilir. Bu selülazlar, pantolonun yapımında kullanılan pamuktaki selüloz iplikleri nazikçe parçalar ve bunun sonucunda daha yumuşak bir kumaş elde edilir. *Bacillus subtilis*'den elde edilen **subtilizin** proteazı, giysilerdeki protein lekelerini çıkarmak için kullanılan birçok çamaşır deterjanının önemli bir bileşenidir. Mısır şurubu yapımında nişastanın parçalanması için kullanılan ve amilazlar denen karbonhidrat sindirici enzimler gibi çeşitli bakteriyel enzimler de, gıda üretiminde kullanılmaktadır.

Bakteri Transformasyonu

Unutmayın ki bakterilerin çevre ortamından bünyesine DNA alabilme yeteneği, yani transformasyon, rekombinant DNA klonlama sürecinin temel basamaklarındandır (Bölüm 3). DNA klonlamada, rekombinant plazmidler bakteri hücrelerine transformasyonla aktarılabilmekte; böylece bakteriler rekombinant plazmidleri çoğaltabilmektedir. Çoğu bakteri, onları daha alıcı hale getiren işlemlerden geçirilmedikçe, DNA'yı kolayca bünyesine almaz. Bunlara **kompetent hücreler** denir. Kompetent hücre hazırlama yöntemlerinden birinde, hücreler buz soğukluğundaki kalsiyum klorit çözeltisiyle muamele edilmektedir. Kalsiyum kloritteki pozitif yüklü atomlar (katyonlar), bakteri hücre duvarı ve zarının yapısını bozarak, içinden DNA'nın geçebileceği küçük delikler meydana getirir. Daha sonra bu hücreler, alıcılık yetilerinin korunması amacıyla, çok düşük sıcaklıklarda (–80°C ilâ –60°C) dondurularak gereksinim duyuldukça kullanılabilir.

Şekil 5.3a'da gösterildiği gibi, kompetent hücreler hazırlandıktan sonra, bu hücrelere DNA aktarımı daha kolay bir şekilde yapılabilmektedir. Genel olarak; bakteriye aktarılacak olan DNA bir ya da daha fazla antibiyotik dayanıklılık geni içeren bir plazmide yerleştirilir. Rekombinant plazmid vektörü bir tüpün içinde kompetent hücrelerle karıştırılır ve birkaç dakika boyunca buz üzerinde bekletilir. Transformasyonun mekanizması tam olarak anlaşılamamış olsa da; DNA'nın bakterinin dış yüzeyine tutunmuş durumda olduğu süre boyunca hücrelerin soğukta bekletilmesi gerektiğini ve soğuk koşulların muhtemelen hücre zarının yağ dokusu üzerinde DNA'nın girişine izin veren boşluklar meydana gelmesine yardımcı olduğunu bilmekteyiz. Hücre zarı ve DNA'da bulunan fosfatların, aksi durumda birbirlerini itmelerine neden olabilecek negatif yüklerinin nötralize edilmesinde, kalsiyum kloritteki katyonların çok önemli bir rol üstlendiği düşünülmektedir. Hücreler daha sonra kısa bir süreliğine (yaklaşık 1 dakika) 37°C ile 42°C arasındaki sıcaklıklarda ısıtılır. Bu kısa ısı "şoku" boyunca DNA bakteri hücrelerine giriş yapar.

Bu hücreler sıvı besi ortamında büyümeye bırakıldıktan sonra, antibiyotik içeren bir agar ortamına aktarılabilirler. Yalnızca uygun antibiyotik dayanıklılık genlerini içeren plazmid DNA'nın transforme edebildiği hücreler koloniler oluşturmak üzere büyüyebilir. Bu teknik *antibiyotik seleksiyonu* olarak adlandırılmaktadır (bakınız Bölüm 3). Plazmid DNA, transforme olmuş





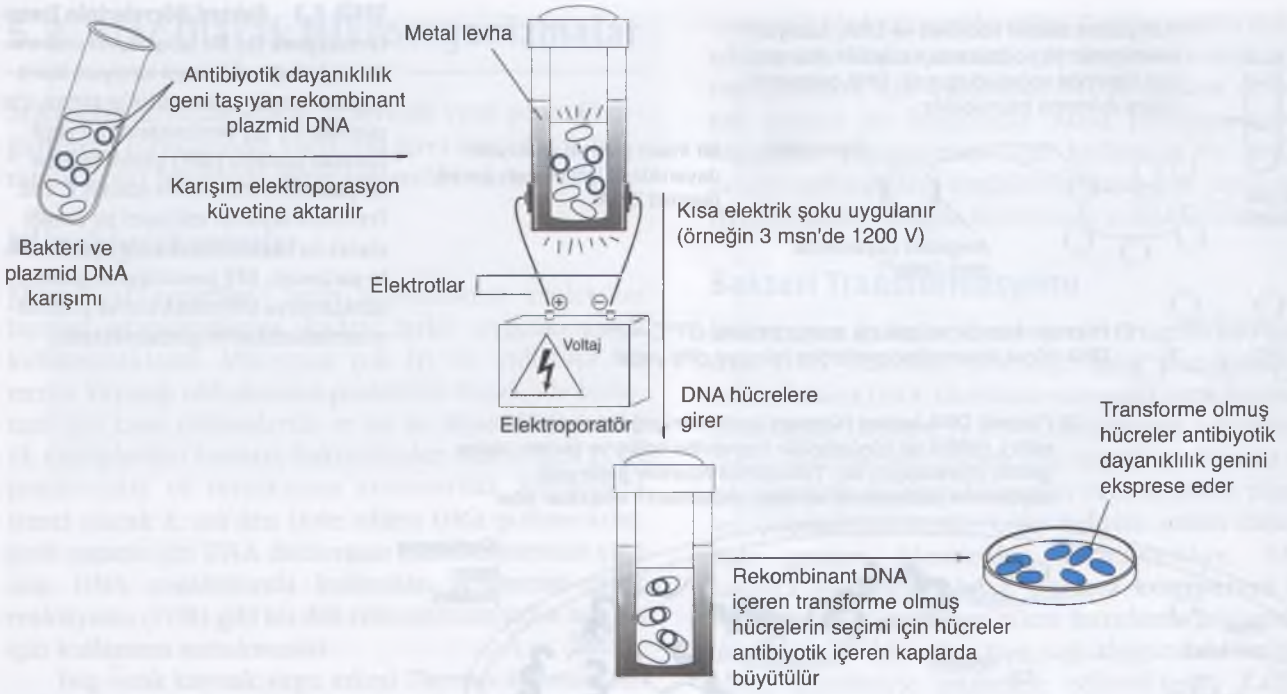
ŞEKİL 5.3 Bakteri Hücrelerinin Transformasyonu (a) Bir laboratuvar ortamında, çoğu bakteri hücresi kalsiyum klorit uygulamasıyla yabancı DNA'yı alması için uyarılabilir. (b) Denizanasına ait yeşil floresan proteini (GFP) genini taşıyan bir plazmidle transforme edilmiş *E. coli*. Transformasyonun etkileyici bir örneği olarak bu bakteri hücrelerinin yeşil renkte parlaması, GFP genini içeren plazmidi aldıklarını ve GFP mRNA'sını ve proteinini sentezlediklerini göstermektedir.

bakteri tarafından çoğaltılır (klonlanır) ve plazmiddeki genler transkribe edilerek proteine dönüştürülür. Böylece, transforme olmuş bakteri hücreleri artık rekombinant proteinleri üretecektir.

Bu işlem transformasyon (dönüşüm) olarak adlandırılmaktadır, çünkü yabancı genlerin aktarılmasıyla hücreler başka özellikler taşıyan bakterilere "dönüşebilir". Transforme olmuş hücreler genetik olarak değiştirilerek, normalde üretemeyecekleri maddeleri üretebilmelerini sağlayan ve DNA tarafından kodlanan yeni özellikler kazanırlar. Örneğin, *E. coli* yeşil floresan protein (GFP) adındaki proteini kodlayan, denizanasmdan elde edilen bir genle transforme edilebilmektedir (Şekil 5.3b; Bölüm 10'da GFP'nin kullanışlı uygulamalarını daha yakından inceleyeceğiz). Altbölüm 5.3'te tartışacağımız gibi, birçok insan geni dâhil, bakteriler çok sayıda önemli geni eksprese edecek şekilde transforme edilmiştir.

Elektroporasyon

Hücre transformasyonu için yaygın olarak kullanılan tekniklerden bir diğeri de **elektroporasyon** olarak adlandırılır (**Şekil 5.4**). Bu yaklaşımda elektroporatör denen bir aygıt, hücrelerin büyük çoğunluğunu öldürmeden, DNA'nın bakteri hücrelerine girişini sağlayan kısa bir elektrik şoku üretir. Elektroporasyon da kompetent hücre kullanımını gerektirse de, kalsiyum



ŞEKİL 5.4 Elektroporasyon Bakteri Transformasyonu için Kolay ve Etkili Bir Yöntemdir
Elektroporasyonda, bakteri ve plazmid DNA'dan oluşan bir karışım küvet içine konur. Küvete uygulanan kısa bir elektrik şokuyla DNA hızlıca hücrelere girer. Rekombinant DNA'yı içeren hücreler daha sonra antibiyotik veya başka bir seçici bileşik içeren agar ortamında büyütülerek seçilebilir.

klorit uygulamasına kıyasla birçok avantaj sağlar. Elektroporasyon hızlıdır, daha az miktarda hücreye ihtiyaç vardır ve maya, mantar, hayvan ve bitki hücreleri dâhil farklı birçok hücre tipine DNA aktarımı için kullanılabilmektedir. Ayrıca, elektroporasyon kalsiyum klorit transformasyonundan çok daha etkin bir işlemdir. Kalsiyum klorit uygulamasındakinden çok daha fazla sayıda hücre, yabancı DNA'yı elektroporasyon aracılığıyla bünyesine alabilir. Bu nedenle, hücreleri transforme etmek için çok daha az miktarda DNA kullanılabilmektedir (pikogram düzeyinde DNA miktarı yeterlidir). Bu yöntemin olumsuz yanlarından biri, elektroporatörün ve elektrik şokuna dayanabilecek kompetent hücrelerin maliyetinden dolayı, kalsiyum klorit transformasyonundan daha pahalı olmasıdır. Bakteri hücrelerinin nasıl transforme edildiği gözetilmeksizin, ilgilenilen DNA bakteriye aktarıldıktan sonra birçok kullanışlı yöntemin uygulanması mümkündür.

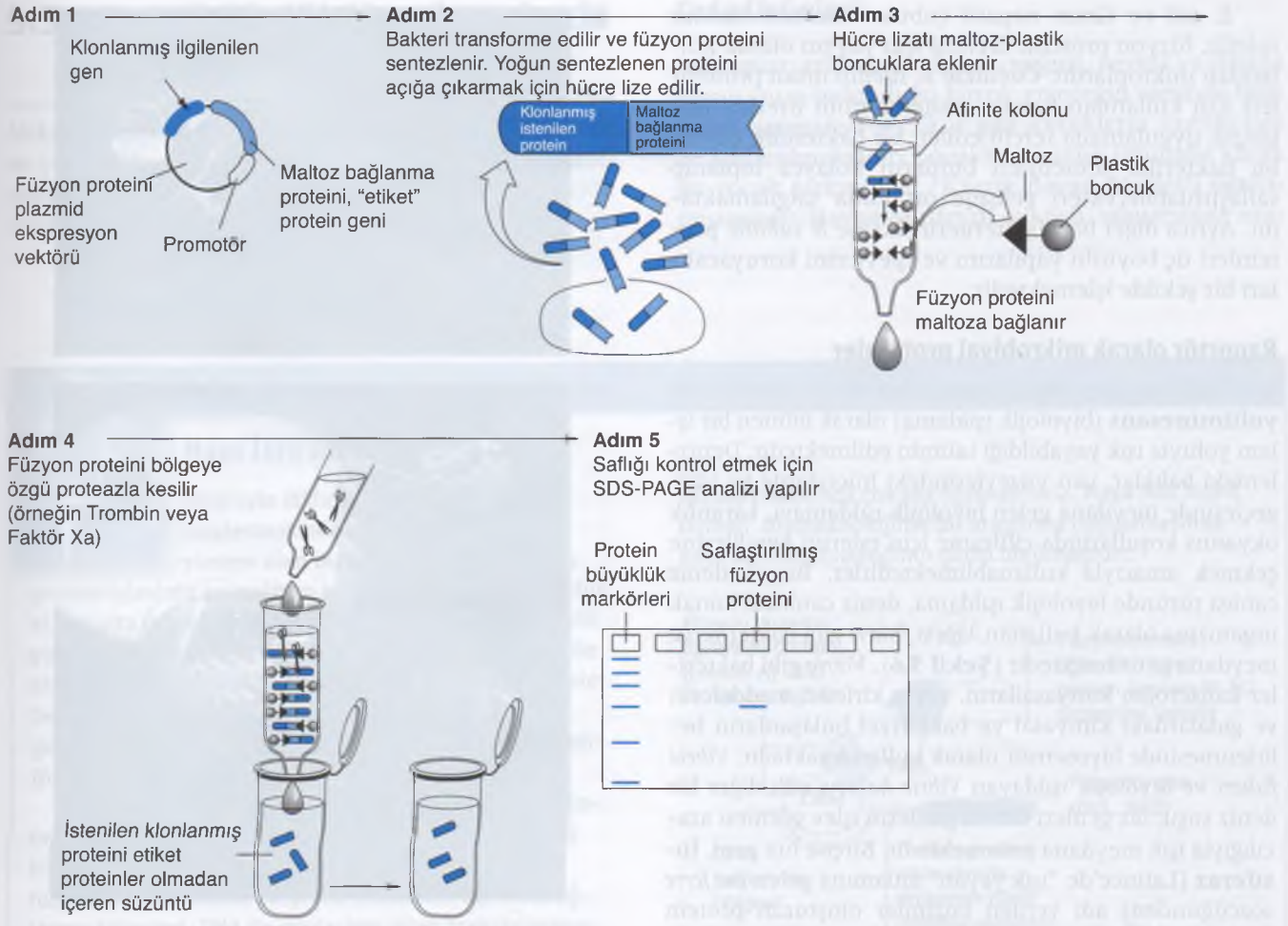
Klonlama ve Ekspresyon Yöntemleri

Rekombinant DNA'yı çoğaltmalarının yanı sıra, transforme bakteriler birçok farklı amaç için proteinlerin seri üretiminde sıkça kullanılabilmeleri nedeniyle de önem taşırlar.

Rekombinant proteinlerin sentezi ve izolasyonu için bakteriyel füzyon proteinlerinin yapılması

Rekombinant proteinlerin sentezi ve izolasyonu için bakterilerin kullanıldığı yaygın bir yöntem, **füzyon proteini** üretilmesini içermektedir. Füzyon proteini üretimi için kullanılabilecek çok sayıda yol bulunsa da, yöntemin temel özelliği, ilgilenilen bir proteinin geninin yine iyi bilinen ve "etiket" işlevi görecek bir proteinin genini barındıran bir plazmide yerleştirilmesi için, rekombinant DNA yöntemlerinin kullanılmasıdır (**Şekil 5.5**). Böylece etiket protein rekombinant proteinin bir füzyon proteini olarak izolasyonuna ve saflaştırılmasına olanak tanır. Füzyon proteini eldesi için kullanılan plazmid vektörler genellikle **ekspresyon vektörleri** olarak anılır, çünkü bunlar bakteri hücrelerinin büyük miktarlarda protein üretmesini veya onları eksprese etmesini sağlar. Yaygın olarak kullanılan ekspresyon vektörleri arasında; maltoz bağlanma proteini (Şekil 5.5'te gösterilmiştir), glutatyon S-transferaz, lusiferaz, yeşil floresan protein ve β-galatosidaz gibi proteinleri sentezleyen vektörler bulunmaktadır.

Ekspresyon vektörleri prokaryotik promotör dizilimleri içerirler; böylece, ilgilenilen geni taşıyan rekombinant ekspresyon vektörü transformasyonla bakteriye aktarıldığında, bakteri bu plazmidden mRNA



ŞEKİL 5.5 Füzyon Proteinleri Füzyon proteini yapmak için ilgilenilen gen bir ekspresyon vektörüne yerleştirilir. Bakteri hücreleri rekombinant DNA ile transforme edilir. Transforme olmuş hücrelerin eksprese ettiği füzyon proteini, bir afinite kolonuna bağlanarak izole edilir.

ve protein sentezler. Transkribe edilmiş mRNA iplikleri, ilgilenilen geni ve etiket proteinini kodlayan dizilimi içeren hibrit moleküllerdir. Sonuç olarak; istenen proteinle birleşik olan etiket proteinden oluşan bu mRNA'dan, bir füzyon proteini (buradaki örnekte maltoz bağlanma proteini) sentezlenir (Şekil 5.5, 2. adım).

Normalde bakteri tarafından yapılan füzyon proteinin izolasyonu ve diğer proteinlerden ayrılması için hücreler parçalanıp (liziz) homojenize edilerek, *özüt* denen bir çeşit koyu kıvamlı bakteriyel sıvı elde edilir. Özüt daha sonra *kolon* denen bir tüpten geçirilir. Yaygın uygulamalardan biri, kolonu füzyon proteininin etiket protein kısmına bağlanacak olan moleküllerle kaplanmış plastik boncuklarla doldurmaktır. Kolondaki boncuklarla etiket protein arasında bir çekim, başka bir deyişle "afinite" olması nedeniyle bu teknik **afinite kromatografisi** olarak anılmaktadır. Örneğin, Şekil 5.5'te plastik boncuklar, maltoz bağlanma proteinince kuşatılacak olan maltoz şekerine ilişmiş durumdadır. Bir sonraki aşamada, *proteazlar* denen protein kesici enzimlerin kullanıldığı bir işlemle, ilgilenilen protein etiket proteinden kesilip ayrılarak serbest bırakılır. Füzyon proteini eldesinde kullanılan bazı tekniklerde yalnızca birkaç aminoasitlik kısa peptid etiketleri kullanılır. Örneğin, çoklu-His etiketleri bir dizi histidin aminoasidinden oluşur. Bu uygulamanın avantajlarından biri, maltoz bağlanma proteini ve büyük proteinler olan diğer etiketlerin aksine, küçük etiketlerin birleşmiş durumda olduğu proteinlerin yapı ve işlevini etkilememesi ve bu nedenle çoğunlukla kesilip uzaklaştırılmak zorunda olmamalarıdır. Füzyon proteini yöntemlerinden; protein yapısı ve işlevleri üzerindeki çalışmalar için protein sağlanmasında, insülin ve tıbbi açıdan önemli diğer rekombinant proteinlerin izolasyonunda yararlanılmaktadır (bölümün devamındaki Şekil 5.8'e bakınız).

E. coli ve Gram negatif çubuksu bakteri *Bacillus subtilis*, füzyon proteini üretimi için yaygın olarak kullanılan mikroplardır. Özellikle *B. subtilis* insan proteinleri için kullanılan füzyon proteinlerinin üretimi için birçok uygulamada tercih edilen bir bakteridir, çünkü bu bakteriler proteinleri bunların kolayca toplanıp saflaştırılabilecekleri gelişme ortamına salgılamaktadır. Ayrıca diğer bazı bakterilerin aksine *B. subtilis*, proteinleri üç boyutlu yapılarını ve işlevlerini koruyacakları bir şekilde işlemektedir.

Raportör olarak mikrobiyal proteinler

Son bilgilere göre, deniz canlılarının dörtte üçünün **biyolüminesans** (biyolojik ışıldama) olarak bilinen bir işlem yoluyla ışık yayabildiği tahmin edilmektedir. Denizlerdeki balıklar, yan yüzeylerindeki hücrelerde ve yüzgeçlerinde meydana gelen biyolojik ışıldamayı, karanlık okyanus koşullarında çiftleşme için eşlerini kendilerine çekmek amacıyla kullanabilmektedirler. Birçok deniz canlısı türünde biyolojik ışıldama, deniz canlısını konak organizma olarak kullanan *Vibrio fisheri* gibi bakterilerce meydana getirilmektedir (**Şekil 5.6**). *Vibrio* gibi bakteriler kanserojen kimyasalların, çevre kirletici maddelerin ve gıdalardaki kimyasal ve bakteriyel bulaşanların belirlenmesinde biyosensör olarak kullanılmaktadır. *Vibrio fisheri* ve biyolojik ışıldayan *Vibrio harveyi* adlı diğer bir deniz suşu, *lux* genleri denen genlerin işlev görmesi aracılığıyla ışık meydana getirmektedir. Birçok lux geni, **lusiferaz** (Latince'de "ışık yayan" anlamına gelen *lux ferre* sözcüğünden) adı verilen enzimler oluşturan protein altbirimlerini kodlamaktadırlar.

Lusiferaz ateşböceklerinin de ışık üretmesini sağlayan enzimdir. *Lux* genleri klonlanmış ve birçok farklı şekilde gen ekspresyonu çalışmalarında kullanılmıştır. Örneğin, *lux* geninin bir plazmide kopyalanmasıyla, *lux* plazmidi füzyon proteinlerinin üretiminde kullanılabilir. *Lux* genleri aynı zamanda önemli birer **raportör gen** olarak kullanılabilir. Hayvan ya da bitki hücrelerine aktarıldığında *lux* plazmidi tarafından kodlanan lusiferaz, bu hücrelerin ışık yaymasına sebep olacaktır (Şekil 5.6). Bu bağlamda *lux* plazmidi, gen sentezinin görsel bir belirteci olarak görev almış olur.

Lux genleri verem (TB) hastalığının testinde bir floresan biyoanaliz geliştirilmesi için kullanılmaktadır. TB hastalığına, yavaş gelişen ve insan vücudunda TB meydana gelmesinden yıllar öncesinden beri bulunabilen, *Mycobacterium tuberculosis* bakterisi neden olmaktadır (TB belirtileri altbölüm 5.4'te tartışılmıştır). TB biyoanalizi için bilim insanları, *lux* genlerini *M. tuberculosis* bakterisini enfekte eden bir virüse aktardılar. *M. tuberculosis* ile enfekte olması muhtemel bir hastanın salyası, *lux* içeren virüsler ile karıştırıldı. Salya örneğinde *M. tuberculosis* bulunması durumunda virüs bakteri hücrelerini enfekte edecek ve bunlar ışıldamaları sonucunda belirlenebilecekti. Benzer şekilde düzenlenen *E. coli* suşları, sudaki arsenik kontaminasyonunun belirlenmesinde kullanılmaktadır. Raportör genler bilimsel araştırmalarda ve tıpta çok önemli roller üstlenmektedirler (Bölüm 10). Bir sonraki kısımda mikroplarla ilişkili bir dizi günlük uygulamayı keşfedeceğiz.



ŞEKİL 5.6 Biyolüminesans Deniz Bakterileri Şekilde *Vibrio fisheri* gibi deniz bakterilerinin (a) bir derin deniz balığının organlarında ve (b) laboratuvardaki besi ortamında ışık yayması gösterilmektedir. (c) *Lux* genleri, lusiferini oksilusiferine dönüştürmek için oksijen ve depo enerjisi (ATP) kullanan lusiferaz enzimini kodlar. Bu tepkime ortama ışık yayar. *Lux* genleri raportör gen görevi görerek, biyologlara gen ekspresyonu çalışmaları için olanak tanır. Ekspresyon parlayan hücrelerden anlaşılır.

5.3 Çeşitli Günlük Uygulamalarda Mikropların Kullanılması

Mikropların büyük potansiyelinden gıda üretiminde ve yeni ilaçların üretim ve geliştirilmesinde yararlanılması, mikrobiyal biyoteknolojinin en yaygın günlük uygulamaları arasındadır.

Gıda Ürünleri

Mikroplar; aralarında ekmek, yoğurt, peynir ve lahana turşusunun bulunduğu birçok yiyeceğin yanında bira, şarap, şampanya ve likör gibi içeceklerin üretiminde de kullanılmaktadır. Çocukken büyük ihtimalle klasik bir çocuk şarkısı olan "Küçük Bayan Muffet"i öğrenmişsinizdir. Bayan Muffet'in öyküsü, taburesinde otu-



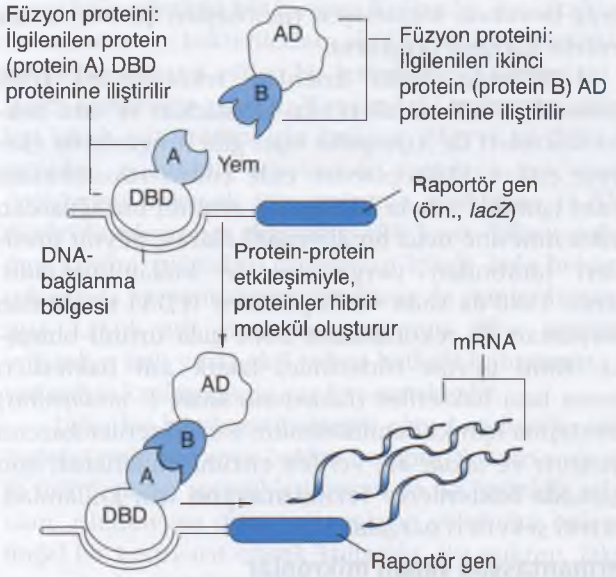
TİCARET ARAÇLARI

Maya İkili Hibrit Sistemi

Birbiriyle etkileşime giren proteinlerin incelenmesinde kullanılan yenilikçi bir yöntem olan **maya ikili hibrit sistemi,** protein işlevinin anlaşılması için çözümler sunar. Diyelim ki, vücutta önemli bir hormonun sentezine ait metabolik yolun bir parçası olarak, birlikte çalıştığını ve bu şekilde etkileşime giriyor olabileceğini düşündüğünüz proteinler belirlediniz. Maya ikili hibrit sistemi, bu proteinlerin gerçekten birbirlerine bağlanıp etkileşime girip girmediğinin belirlenmesi için mükemmel bir yöntemdir.

Yandaki şekilde gösterildiği gibi, ilgilenilen bir proteinin geni klonlanmış ve başka bir genin DNA bağlanma bölgesine (DBD- DNA binding domain) iliştirilmiş bir füzyon proteini olarak eksprese edilmiştir. Bu DNA bağlanma bölgeleri, DNA ile etkileşime giren transkripsiyon faktörlerinde olduğu gibi, proteinlerde yaygın olarak bulunur. Bu protein genellikle "yem" protein olarak adlandırılır çünkü "av" denen ve ona bağlanabilecek olan diğer proteinlerin bulunması için kullanılır. İlgilenilen diğer proteinin geni, transkripsiyonel aktivatör bölge (AD- activator domain) dizileri içeren başka bir gene bitişik durumdadır. DNA bağlanma proteinlerinin DNA'ya bağlanması için de gerekli olan AD proteinleri; yem proteininin bağlanma bölgesini, raportör bir genin promotör dizisi gibi, DNA bağlanma bölgeleri ile etkileşime girmesi için uyarmaktadır.

Bu değiştirilmiş DNA *Saccharomyces cerevisiae* gibi maya hücrelerine aktarılmıştır. Bu raportör genden gerçekleşecek transkripsiyonu ne DBD füzyon proteini ne de AD füzyon proteini tek başına uyarabilir. Şekilde gösterilen β-galaktosidaz enzimini kodlayan *lacZ* geni, aktivitesi basit renk ölçüm testleriyle belirlenebilen yaygın bir raportör gendir. Yalnızca her iki proteinin kombinasyonu, her iki proteinin "hibridi" veya kompleksi raportör genin ifadesini uyarabilir. Bilim insanları, ilgilenilen her iki proteinde de mutasyon gerçekleştirebileceği ve mutasyonların bu iki proteinin etkileşim yeteneğini nasıl etkilediğini görebileceği için, bu proteinlerin yapı ve işlevleri hakkında çok şey öğrenebiliriz. Maya ikili hibrit sistemi, biyoteknolojinin bir araştırma uygulamasında nasıl kullanılabileceğinin güçlü bir örneğidir.



Hibrit protein şimdi raportör genin transkripsiyonunu uyarabilir. Raportör gen mRNA'sından elde edilen proteinin aktivitesi ölçülebilir.

Protein Etkileşim Araştırmaları için Maya İkili Hibrit Sistemi Bir araştırıcı herhangi iki proteinin (A ve B) birbiriyle etkileşime girip girmediğini bilmek istediğinde; proteinlerden biri başka bir proteinin DNA bağlanma bölgesine (DBD) (bir transkripsiyon faktörü gibi) iliştirilmiş bir füzyon proteini olarak, ikinci protein de bir aktivatör bölge (AD) proteinine ilişik halde eksprese edilebilir. Füzyon proteinlerden hiçbiri tek başına raportör gene bağlanma ve genin transkripsiyonunu (mRNA üretimi) tetikleme yetisine sahip olmayacaktır. Fakat iki füzyon proteinin protein-protein etkileşiminden meydana gelen hibrit protein, A ve B proteinleri arasındaki etkileşimin bir göstergesi olarak kolayca belirlenebilecek bir ölçüt olan raportör genin transkripsiyonunu uyaracaktır.

rarak, "curds and whey" (kesmik ve kesilmiş süt suyu) yiyor; biyoteknolojiyi tartışmak için umulmadık bir yolmuş gibi gelebilir ama Bayan Muffet'in kâsesindeki ikram, biyoteknolojinin sonucuydu! *Curds and whey* pıhtılaşmış sütten elde edilir ve süt pıhtılaşması peynir üretiminde önemli bir basamaktır. Peynir yapmak için ineklerden, keçilerden veya koyunlardan alınan sütler pıhtılaşması (kesmik, *curd*) için işlemlerden geçirilir. Kesmik oluştuktan sonra kalan sulu sıvıya *whey* (kesilmiş sütün sıvı kısmı, süt serumu) denir.

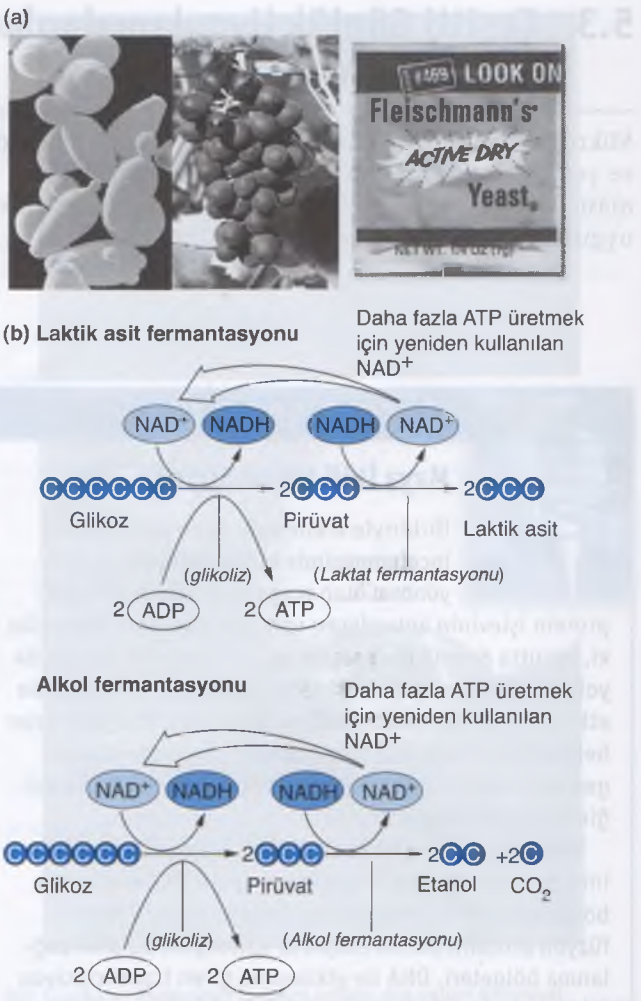
Pıhtılaşmış sütten peynir yapmanın yollarından biri, süte asidik bir çözelti uygulanmasıdır, ancak en lezzetli peynirler genellikle **renin** enzimi kullanılarak yapılır. Peynir üretiminin ilk zamanlarında renin, buzağıların midesinden ya da keçi, koyun, at hatta zebra ve deve gibi süt üreten diğer türlerden özütlenerek elde edilmekteydi. Renin, sütün başlıca bileşenlerinden olan *kazein* adlı bir grup proteini parçalayıp, kesmik meydana getirerek sütü pıhtılaştırır. Parçalanmış kazein, süt kaynarken görülen duruma benzer bir süreç boyunca, kümeleşen (pıhtılaşan) çözünmez bir protein karışımı oluşturur.

1980'lerde, bilim insanları rekombinant DNA yöntemleri kullanarak renini klonladılar ve onu bakteri hücreleri ile *Aspergillus niger* gibi funguslarda eksprese ettiler. Mikroplardan elde edilen rekombinant renin (şimdiki adıyla **kimosin**), reninin buzağılardan özütlenmesine ucuz bir alternatif olarak, peynir üreticileri tarafından yaygın şekilde kullanılmaktadır. Renin 1990'da Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk rekombinant DNA gıda ürünü olmuştur. Kimi peynir türlerinde, laktik asit bakterileri denen bazı bakteriler (*Lactococcus lactis, L. acidophilus*) pıhtılaşma için kullanılmaktadır. Bu bakteriler kazeini ayrıştırır ve *laktaz* adı verilen enzimi kullanarak, son aşamada bakterilerce **fermantasyon** için kullanılan, sütteki şekerleri parçalar.

Fermantasyon yapan mikroplar

Fermantasyon; ekmek, bira, şarap, şampanya, yoğurt ve peynir dâhil birçok yiyecek ve içeceğin üretiminde yer alan önemli bir mikrobiyal süreçtir. İlk mikroorganizma uygulamalarından biri olan bira ve şarap yapımı, mayalarca gerçekleştirilen fermantasyonu kapsar (**Şekil 5.7a**). Bira, şarap ve ekmek yapımında mikroplara nerede ihtiyaç duyulduğunu anlayabilmek için, fermantasyon süreci hakkında daha fazla bilgi sahibi olmanız gerekir.

Hayvan ve bitki hücreleri ile birçok mikrop, enerji sağlamak için glikoz gibi karbonhidratlardan yararlanarak, bu şekerlerin elektronları aracılığıyla **adenozin trifosfat (ATP)** denen molekülü meydana getirirler. ATP üretimi bir tepkime dizisi halinde gerçekleşir. İlk temel tepkime olan **glikoliz**, glikozu iki *pirüvat* molekülüne çevirir. Bu dönüşüm boyunca elektronlar glikozdan, *NAD+* (nikotinamid adenin dinükleotid) denen ve NADH üreten



ŞEKİL 5.7 Fermantasyon Bazı maya ve bakteriler, şekerlerden (glikoz) fermantasyon yoluyla enerji üretme yeteneğine sahiptir. (a) Burada gösterilen *S. cerevisiae* gibi mayalar (solda), ekmek hamurunun kabarmasını sağlarken; üzüm bağlarında gelişen diğer *Saccharomyces* suşları şarap yapımı için önemlidir (orta fotoğraf). (b) Laktik asit fermantasyonu yapan anaerobik bakteriler atık ürün olarak laktik asit (laktat) meydana getirirken; alkol fermantasyonu yapan bakteriler atık ürün olarak karbondioksit (CO_2) ve etanol oluşturur.

elektron taşıyıcı moleküllere geçer (Şekil 5.7b). Bu molekül elektronları ATP üretimiyle sonuçlanan sürecin sonraki tepkimelerine taşır. Bazı bakteri ve mayalar için oksijen, bu elektron taşıma tepkimelerinin önemli bir parçasıdır. ATP üretimi için oksijen kullanan mikroplar, **aeroblar** olarak adlandırılır çünkü bunlar oksijene bağlı (aerobik) metabolizmaya sahiptir.

Birçok mikrop hayvanların bağırsakları, derin sular veya toprak gibi oksijenin çok az olduğu veya hiç bulunmadığı yerlerde yaşar. Çünkü bu organizmalar oksijen olmadan yaşamlarını sürdürmek durumundadır ve bu yüzden oksijen yokluğunda (anaerobik koşullar) şekerlerden enerji sağlayabilme yetenekleri vardır. Buna fermantasyon denir ve fermantasyon yapan mikroplara **anaeroblar** denir. Fermantasyon, NADH ve pirüvat elde etmek amacıyla NAD^+'nın elektron yakalanması için

kullanıldığı glikolize benzer, fakat ne NADH'nin ne de pirüvatın gidecek bir yeri vardır. Aerobik metabolizmada, NADH ve pirüvat elektronlarının ATP üretimi amacıyla kullanılması için oksijen gereklidir, fakat anaerobik koşullarda oksijen ya çok azdır ya da hiç yoktur; bu nedenle NADH ve pirüvat ATP üretimi için kullanılamaz. Tüm organizmalar NADH'yi NAD+'ya dönüştürmek durumundadır. Fermantasyon, oksijen yokluğunda birçok anaeroba bunu yapma imkanı sağlar ve bazı anaeroblar oksijenin varlığına veya yokluğuna bağlı olarak ya fermantasyon ya da aerobik solunum yapma yeteneğine sahiptir. Oksijen bulunmadığında anaeroblar, NADH'yi NAD+'ya dönüştürme sorununa bir çözüm olarak, fermantasyon tepkimelerini yerine getirebilecek şekilde evrimleşmiştir. Fermantasyon yapan mikroplar NADH'tan elektron alarak NAD+ meydana getirmek için, pirüvatı bir elektron alıcı molekül olarak kullanır (Şekil 5.7b). En çok bilinen iki fermantasyon türü **laktik asit fermantasyonu** ve **alkol (etanol) fermantasyonu**dur.

Laktik asit fermantasyonunda NADH'den gelen elektronlar pirüvatı laktik asite, diğer söylenişiyle laktata, dönüştürmek için kullanılır; alkol fermantasyonu boyunca NADH'den gelen elektronlar pirüvatı etanole dönüştürür. Elektronlar NADH'den ayrılınca NAD+ meydana gelir ve fermantasyonun son basamağında laktat veya etanol üretmek için elektronlar pirüvata transfer olur. Alkol fermantasyonu boyunca ayrıca atık gaz olarak karbondioksit üretilir.

Fermantasyon yapan birçok bakteri ve maya suşu bulunur. Diğer fermantasyon türleri ile lahana turşusu yapılır ve bunlardan sirkedeki asetik asit, meyve sularındaki sitrik asit, laboratuvarlarda cam malzemelerin temizliğinde sıkça kullanılan kimyasallardan olan aseton ve metanol gibi kullanışlı ürünler elde edilir. Ayrıca bu mikrobiyal ürünler diğer yollarla üretilenlerden daha verimli ve ucuz üretilme avantajına sahiptir. Laktik asit fermantasyonu zorlayıcı hareketler yapıldığında insan kaslarında da gerçekleşir. Derse geç kaldığınız için koştuğunuzda bacaklarınızda hissettiğiniz yanma, kas hücrelerinde laktik asit meydana getiren fermantasyondan kaynaklanır.

Peki fermente edici mikroplar yiyecek ve içecek üretiminde nasıl kullanılıyor? Bira ve şarap yapımında çoğu işlem, üzümlerin üzerinde yaşayan yabani maya suşlarına ve alkol fermantasyonunda çok iyi olan *Saccharomyces cerevisiae* gibi laboratuvar suşlarına dayanır. Büyük fıçılar ya da fermentörlere konan ezilmiş üzüm ve mayalar dikkatlice kontrol edilen koşullar altında karıştırılır. Fermantasyon mayaları üzüm şekerlerini alkole dönüştürürler. Fermantasyon oranları gözlemlenerek fermentördeki oksijen miktarı ve sıcaklık değiştirilerek dikkatlice denetlenir.

Fermantasyon oranlarının yönlendirilmesiyle, şarap üreticileri istenen alkol içeriği ve tat sağlanana dek, üretim aşamasındaki şarabın alkol içeriğini düzenleyebilir. Şampanya şişeleri ve diğer köpüren şaraplar, maya hala sıvının içindeyken ve fermantasyona devam ederken kapatılır ki, böylece sıkıştırılan ve şişe açıldığında serbest kalan karbondioksit gazı, bildiğimiz şampanya şişesi patlamasını meydana getirir. Bazı şarapların üretimi de *Oenococcus oeni* gibi laktik asit bakterilerine dayanır. Bu bakteriler, fermantasyon boyunca oluşan keskin tada sahip malik asidi daha yumuşak bir tadı olan laktik aside çevirerek, şaraba daha yumuşak bir tat ve aroma kazandırır.

Laktik asit fermantasyonu yapan bakteriler peynirlerin, ekşi kremaların ve yoğurtların yapımında kullanılır; bu ürünlerin sahip olduğu keskin ya da ekşi tadın başlıca nedeni laktik asittir. Yoğurt ilk olarak Bulgaristan'da üretilmiştir ve yüzyıllardır tüketilmektedir. Yoğurt üretiminde tipik olarak *Streptococcus thermophilus, Lactobacillus* denen bir suş (*Lactobacillus delbrueckii* ve *Lactobacillus bulgaricus*) ve *Lactococcus* adlı diğer bir suş (*Lactococcus lactis*) gibi anaerobik laktik asit fermantasyonu bakterilerinin bir karışımı kullanılır. Bu laktik asit fermantasyonu bakterilerinin aktif kültürleri, sıcaklıkları dikkatlice kontrol edilen bir fermentörün içinde, süt ve şeker karışımına eklenir. Karışımdaki mikroplar şekerleri laktik asit üretimi için kullanır. Meyve ve diğer tat vericiler, yoğurdun bileşiminde meydana gelebilecek değişimleri önlemek için, soğutma sıcaklığına (4–5°C) düşürülmeden önce eklenebilir. Bir kaşık dolusu yoğurdun keyfini çıkarırken, yoğurdun içinde hala bulunan çok sayıda fermantasyon mikrobunu da yemiş oluyorsunuz. Laktik asit ve fermantasyonun diğer ürünleri, yoğurdun tatlı ya da ekşi tadına katkıda bulunmakta ve yoğurdun katılaşmasına yardım etmektedir.

Diğer bir laktik asit bakterisi olan *Lactobacillus sakei*, doğal olarak taze et ve balıkta bulunur. *L. sakei* sosis gibi et ürünlerinde, yiyecekleri bozan ya da hastalığa sebep olan, istenmeyen diğer mikropların gelişimini önleyen doğal bir koruyucu olarak kullanılır. Bu mikrop, laktik aside ek olarak *bakteriosinler* adı verilen ve diğer mikropları öldüren, doğal yollarla meydana gelen antimikrobiyal ajanlar olarak işlev gören moleküller üretir.

Terapötik Proteinler

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler, terapötik (tedavi edici) proteinler gibi bazı önemli tıbbi ürünlerin üretiminde bakterilerin hızla kullanımına yol açmıştır. İnsülin, insanlarda kullanım için bakterilerde eksprese edilen ilk rekombinant molekül olmuştur. Burada mikropların tedavi edici proteinlerin üretiminde nasıl kullanıldığına yönelik bir örnek olarak insülin üretimini vereceğiz.

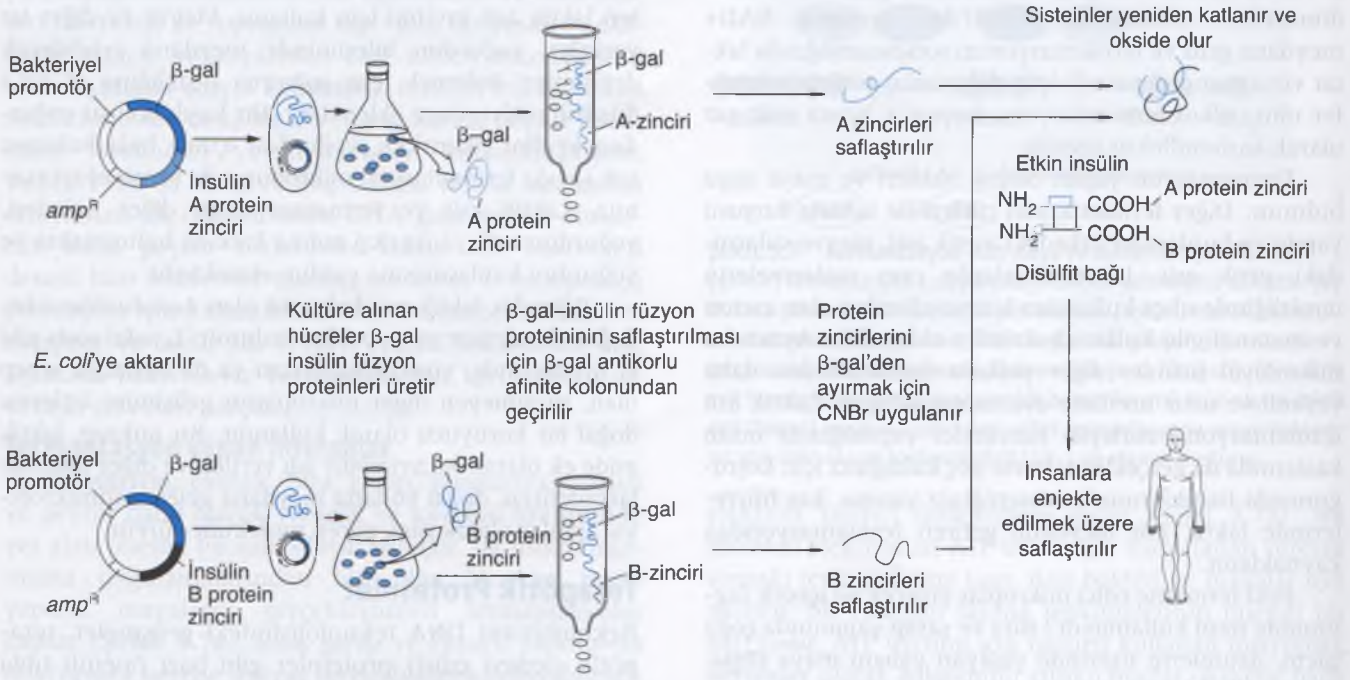
Bakterilerde rekombinant insülin üretimi

İnsülin, *beta hücreleri* denen pankreas hücreleri tarafından üretilen bir hormondur. İnsülin pankreas tarafın-

dan kan dolaşımına salgılandığında, karbonhidrat metabolizmasında önemli bir rol oynar. Temel işlevlerinden biri, glikozun bir enerji kaynağı olan ATP'ye dönüştürüldüğü kas hücreleri gibi vücut hücrelerinde glikoz alımını teşvik etmektedir. **Tip I** veya **insüline bağımlı, şeker hastalığı**, beta hücreleri insülin üretmediğinde meydana gelir. İnsülin yokluğu kanda yüksek glikoz konsantrasyonuna neden olarak, yüksek kan basıncı, dolaşım zayıflığı, katarakt, sinir hasarı gibi birçok sağlık problemine yol açabilir. Tip I şeker hastalığı olan insanlar kanlarındaki şeker düzeyini kontrol etmek amacıyla düzenli olarak insülin iğnesine gereksinim duyarlar.

Rekombinant DNA teknolojisinden önce şeker hastalığının tedavisinde kullanılan insülin, şeker hastalarına verilmeden önce, domuz ve ineklerin pankreaslarından saflaştırılmaktaydı. Saflaştırma işlemi külfetli ve pahalı olması yanında genellikle elde edilen insülin saf olmamaktaydı. Ayrıca, saflaştırılan insülin bazı bireylerde etki göstermemekte ve birçok kişi de inek insülinine karşı allerji göstermekteydi. 1978'de insülin bir plazmid ekspresyon vektörüne klonlanmış, bakteri hücrelerinde eksprese edilmiş ve California, San Francisco yakınlarında bir biyoteknoloji şirketi olan Genetech'teki bilim insanları tarafından izole edilmiştir. 1982'de, Humulin denen bu rekombinant insülin insana uygulanması ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylanan ilk biyoteknoloji ürünü olmuştur.

Bakteriler normalde insülin üretmemektedir ve insan insülininin rekombinant bakterilerde üretilmesi biyoteknolojide gerçekleşen çok önemli bir ilerleme olmuştur. Bu gelişme mikrobiyal biyoteknoloji uygulamalarının öne çıkan bir örneği olarak hala yerini korumaktadır. İnsan insülini A (21 aminoasitlik) ve B (30 aminoasitlik) zincirleri veya altbirimleri denen iki polipeptitten oluşur ve bunlar aktif bir hormon meydana getirmek için disülfit bağlarıyla birbirine bağlanır (**Şekil 5.8**). Beta hücreleri pankreasta bir polipeptid olarak her iki insülin zincirini de sentezler, daha sonra bunlar enzimatik olarak kesilip (ayrılıp) iki altbirimi katlanarak birleştirilir. İnsan insülin genleri klonlanıp bakterilerde eksprese edildiğinde, her bir altbirime ait olan gen, β-galaktosidaz (β-gal) enzimini kodlayan *lacZ* genini içeren, plazmid ekspresyon vektörlerine ayrı ayrı klonlanmış ve daha sonra bakteri transformasyonunda kullanılmıştır (Şekil 5.8).



ŞEKİL 5.8 İnsan İnsülini Üretiminde Bakterilerin Kullanılması İnsülin, rekombinant bakterilerde üretilip insanlarda kullanımı onaylanan ilk proteindir. İnsülin ayrı genlerden elde edilen iki protein zincirinden (A ve B) oluşur. Bilim insanları rekombinant insülin yapmak için insülin genlerini, β-galaktosidaz enzimini kodlayan *lacZ* genini içeren plazmidlerde klonladılar. Rekombinant plazmidler bakterilerin transformasyonunda kullanılarak, bakterilerin β-gal-insülin füzyon proteinlerini üretmesi sağlandı. Afinite kromatografisi kullanılarak izole edilen füzyon proteinleri, klonlanmış insülinin β-gal proteinlerinden ayrılması için kimyasal uygulamalardan geçirildi. A ve B insülin protein zincirleri saflaştırıldıktan sonra bir araya getirilerek, şeker hastalarının kanlarındaki şeker düzeyinin kontrol edilmesi amacıyla insanlara verilebilecek etkin bir insülin haline getirildi.

İnsülin genleri *lacZ* genine bitişik olduğu için, bakteriler bu plazmidlerden protein sentezlediğinde insan insülinine ilişik β-gal içeren bir β-gal-insülin füzyon proteini üretilir. Bölüm 5.2'de gördüğümüz gibi, bir füzyon proteini üretmek bilim insanlarına hedefledikleri insülin gibi bir proteini izole edip saflaştırma olanağı tanır. Füzyon proteini, β-gal'in kesilip ayrılmasıyla insülinin serbest bırakılması amacıyla kimyasal uygulamalardan geçirilir ve ardından saflaştırılan A ve B insülin zincirleri, iki altbirimin bağlanıp işlevsel hormonun meydana gelmesini sağlayacak koşullar altında karıştırılır. FDA yönetmeliği gereği, saflaştırma yinelendikten sonra rekombinant hormon enjekte edilebilir bir ilaç olarak hastaların kullanımına hazır hale gelir.

İnsülinin kullanıma girmesinden kısa bir süre sonra, bir çeşit cücelik rahatsızlığı olan çocukların tedavisinde kullanılan büyüme hormonu bakterilere klonlanmış ve insanlarda kullanıma sunulmuştur. Çok geçmeden, elde edilmesi güç olan geniş çeşitlilikteki diğer tıbbi önem taşıyan proteinler, rekombinant DNA teknolojisi sonucunda proteinlerin bakterilerde üretilmesiyle kullanıma hazır hale geldi. Tablo 5.1'de görüldüğü gibi, insanlarda tıbbi hastalıkların tedavisi için önemli uygulamalarda kullanılan diğer birçok terapötik protein bakterilerde üretilmiş ve onlardan izole edilmiştir. Rekombinant bakterilerden elde edilen temel tıbbi ürünlerin en yaygın olanları aşılardır. Aşılardan kısım 5.4'te bahsedeceğiz.

Mikropların Diğer Mikroplara Karşı Kullanılması

Antibiyotikler mikroplar tarafından üretilen, diğer mikropların gelişimini engelleyen maddelerdir. Antibiyotikler, mikroorganizmaların gelişimini engelleyen herhangi bir ilaç (mikroplarca üretilse de üretilmese de) olarak tanımlanan bir genel kategori olan **antimikrobiyal ilaç**ların bir çeşididir. Penisilin insanlarda yaygın olarak kullanılan ilk antibiyotik olmuştur ve bulunuşu bazı mikropların antimikrobiyal maddeler yaparak kendilerini diğerlerinden nasıl koruduğuna ilişkin mükemmel bir örnektir. Alexander Fleming, 1928'de, *Pe-*

TABLO 5.1 REKOMBİNANT BAKTERİLERDEN ELDE EDİLEN TERAPÖTİK PROTEİNLER

Protein	İşlevi	Tıbbi Uygulama(lar)
DNaz	DNA kesme enzimi	Kistik fibroz hastalarının tedavisi
Eritropoetin	Kırmızı kan hücrelerinin üretimini uyarır	Anemi (düşük sayıda kırmızı kan hücresi) hastalarının tedavisinde kullanılır
Faktör VIII	Kan pıhtılaşma faktörü	Hemofilinin (kan pıhtılaşma faktörlerindeki eksikliklerden kaynaklanan kanama hastalıkları) bazı tiplerinin tedavisinde kullanılır
Granülosit-koloni uyarıcı faktör	Beyaz kan hücrelerinin üretimini uyarır	Belirli beyaz kan hücresi tiplerinin üretimini arttırmak için kullanılır; kemik iliği naklini takiben kan hücresi üretimini uyarır
Büyüme hormonu (insan, büyükbaş hayvanlar, domuz)	Hormon, kas ve kemik dokusu gelişimini uyarır	İnsanlarda cücelik görülen bireylerin tedavisinde kullanılır. İnek ve domuzlarda ağırlık artışını ilerletir, ineklerde süt üretimini uyarır
İnsülin	Glikozun vücut hücrelerine alınması için bu hormon gereklidir	Şeker hastalarında kan şekeri düzeyinin kontrolü için kullanılır
İnterferonlar ve interlökinler	Kan hücresi gelişimini ve üretimini uyaran büyüme faktörleri	Lösemi gibi kan hücresi kanserlerinin tedavisinde kullanılır, trombosit sayısını arttırır, bazıları çeşitli kanserlerin tedavisinde kullanılır
Süperoksit dismutaz	Zararlı serbest radikallere bağlanıp onları yok eden bir antioksidan	Kalp krizi süresince ve krizden sonra doku hasarını en aza indirir
Doku plazminojen aktivatörü (tPA)	Kan pıhtılarını çözer	Kalp krizinden ve felçten sonra hastaların tedavisinde kullanılır
Aşılar (örn. hepatit B aşısı)	Bakteriyel ve viral enfeksiyonların önlenmesi için bağışıklık sistemini uyarır	İnsanlara ve hayvanlara birçok patojene karşı bağışıklık kazandırmak için, ayrıca bazı kanser tümör tedavilerinde

TABLO 5.2 YAYGIN ANTİBİYOTİKLER

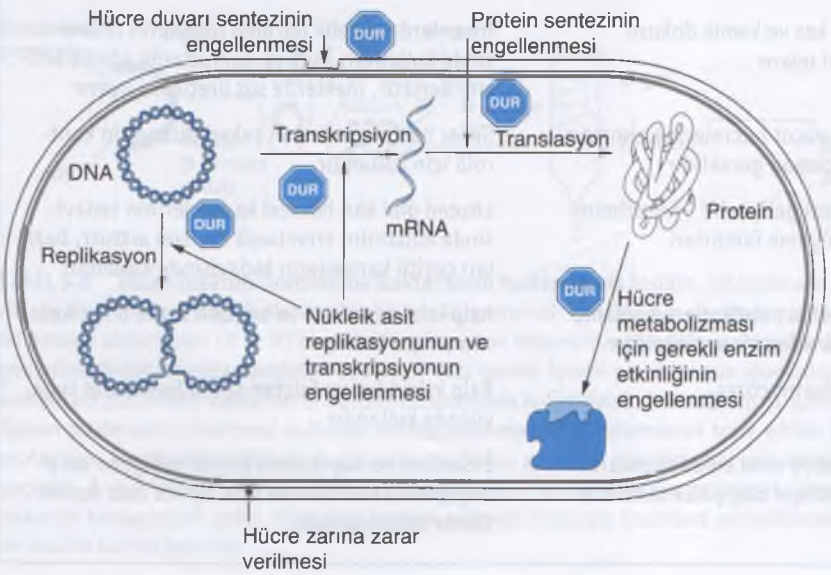
Antibiyotik	Kaynak Mikrop	Antibiyotiğin Yaygın Kullanım Alanları
Basitrasin	*Bacillus subtilis* (bakteri)	İlk yardım merhemleri ve cilt kremleri
Eritromisin	*Streptomyces erythraeus* (bakteri)	Özellikle çocuklarda geniş ölçüde bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır
Neomisin	*Streptomyces fradiae* (bakteri)	Cilt merhemleri ve diğer topikal kremler
Penisilin	*Penicillium notatum* (fungus)	İnsanda ve çiftlik hayvanlarında (büyükbaş hayvanlar ve kümes hayvanları) oral veya enjekte edilerek kullanılan antibiyotik
Streptomisin	*Streptomyces griseus* (bakteri)	Çocuklarda birçok bakteriyel enfeksiyonun tedavisinde oral yolla kullanılan antibiyotik
Tetrasiklin	*Streptomyces aureofaciens* (bakteri)	İnsanlarda idrar yolu enfeksiyonu tedavisinde, hayvan yemlerinde yaygın olarak enfeksiyonları azaltmak ve ağırlık artışını teşvik etmek amacıyla kullanılır

nicillium notatum küfü kolonilerinin *Staphylococcus aureus* bakterilerinin gelişimini engellediğini bulan mikrobiyologdur. Bir petri kabında birlikte kültüre alındıklarında *S. aureus*'un küf kolonilerini çevreleyen küçük bir agar bölgesinde gelişmediğini gözlemledi. Oniki yıl sonra bilim insanları, penisilin adını verdikleri ve sonralarda seri olarak üretilip insanlarda bakteriyel enfeksiyon tedavisinde yararlanılacak olan, bu ilacı izole etmek için *P. notatum*'u kullanmaya başladılar.

Antibiyotiklerin büyük çoğunluğu bakterilerden izole edilir ve bu maddelerin çoğu diğer bakterilerin gelişimini durdurur. Penisilinin bulunuşundan sonraki 60 yılı aşkın zamanda, antibiyotik üreten binlerce başka mikrop bulunmuş ve yüzlerce farklı antibiyotik izole edilmiştir. Yaygın antibiyotik örnekleri ve bunların kaynak mikropları Tablo 5.2'de gösterilmiştir.

Antibiyotikler ve diğer antimikrobiyal ilaçlar bakteri hücrelerini nasıl etkiler? Bu maddelerin çoğu birkaç anahtar yolla etkisini gösterir. Bu maddeler genel olarak ya bakterilerin çoğalmasını engeller ya da mikropları doğrudan öldürerek, etkilenen hücrelerin yeniden çoğalmasını önler. Antibiyotikler hücre duvarına zarar verebilir veya onun sentezini engelleyebilir (penisilin bu şekilde etki eder), protein sentezini durdurabilir, DNA replikasyonunu önleyebilir ya da bakteri hücresi metabolizması için önemli olan bir enzimin sentezini veya etkinliğini durdurabilir (**Şekil 5.9**).

Hapşırıyorsunuz, bedeniniz sızlıyor, burnunuz akıyor, boğazınız ağrıyor ve uyuyamıyorsunuz; ama yarın öğleden sonra girmeniz gereken bir sınavınız var. Bunu nasıl yapacaksınız? Doktorunuza gidip ondan antibiyotik isteyerek tabii ki! Peki antibiyotikler gerçekten ihtiyacınız olan şey mi? Çünkü antibiyotikler yalnızca bakterilere karşı etkilidir; nezleye neden olan virüslere karşı işe yaramaz. Ayrıca, bakterilerin antibiyotiklere karşı dayanıklılık göstermeleri de önemli bir sorundur.



ŞEKİL 5.9 Çeşitli Yollarla Mikroplara Karşı Savaşan Antibiyotikler ve Diğer Antimikrobiyal İlaçlar

Antibiyotiklerin hatalı ve yüksek dozda kullanımı, insanlarda ve çiftlik hayvanlarında geçmişte etkili olan birçok antibiyotiğe karşı artık hiç tepki vermeyen bazı suşlar da dahil, bakterilerdeki antibiyotik dayanıklılığında çok büyük artışlara sebep olmaktadır.

S. aureus, Pseudomonas aeruginosa, Streptococcus pneumoniae, M. tuberculosis ve diğer birçok ölümcül insan patojeninin antibiyotiklere dayanıklı suşlarına hastanelerde rastlanmaktadır. Çünkü çoğu antibiyotik bir bakteri hücresine sınırlı sayıda yolla etki eder (Şekil 5.9); bir antibiyotiğe karşı gösterilen dayanıklılık sıklıkla diğer birçok ilaca karşı da dayanıklılığa yol açar. Dolayısıyla, bakterilere farklı yollarla zarar veren yeni antimikrobiyal ilaçların geliştirilmesine tıbbi kullanımın yanı sıra inek, domuz ve tavuk gibi besi hayvanlarının tedavisi için de gereksinim vardır. Su mikrobiyologları yeni antibiyotiklere ve kanser karşıtı maddelere sahip olan yeni okyanus mikrobu suşları keşfetmekteler. Ağaç tepelerinden kutup buzullarına, çöllere ve okyanus diplerine kadar, bilim insanları yeni antimikrobiyal maddelerin potansiyel kaynağı olarak birçok mikroorganizma için biyoaraştırmalar yapmaktadır.

Yeni antimikrobiyal ilaçların yapılması için diğer bir yol da, patojen bakterilerin araştırılıp hastalığı meydana getirmek için kullandıkları toksinlerin ve özelliklerin belirlenmesidir. Bilim insanları hastalığa neden olan etmenleri belirleyerek bakteri çoğalmasını durdurmak için yeni stratejiler geliştirebilir. Örneğin, bazı bakterilerin hastalık yapma yetenekleri insan dokularına bağlanmalarını (yapışmalarını) gerektirir. Bağlandıktan sonra bakteri hücreleri çoğalabilmekte ve hastalığa sebep olmak için yeterli ölçüde toksin üretebilmektedir.

Florida'da Oragenics adlı bir şirket, diş çürüklerini azaltmadaki güvenilirliğini ve etkinliğini değerlendirmek üzere, *Streptococcus mutans*'ın rekombinant formunun klinik denemelerine başlamak için FDA'den izin aldı. Ağız boşluğunda bulunan doğal formdaki *S. mutans* suşlarının aksine, rekombinant suş laktik asit üretmek için şekerleri metabolize edemez. Laktik asit, diş minesini ve dentini erittiği için, delinmelere ve diş çürümelerine neden olur. Bilim insanları rekombinant *S. mutans* suşlarını ağız boşluğunda koloni haline getirip bunları *S. mutans*'ın doğal suşlarının yerine geçirmek ve böylece diş çürüklerinin azalıp azalmadığını belirlemek için girişimde bulundular. Yakın zamanda Los Angeles – California Üniversitesi'ndeki (UCLA) bilim insanları meyan kökünde *S. mutans*'ı öldüren bir maddenin kullanıldığı şekersiz bir lolipop üretti ve bu bakteri öldürücü lolipoplar şu an satışa sunulmuş durumda.

5.4 Aşılar

Antibiyotikler ve aşıların, insanlarda ve hayvanlarda **patojen**lerin—hastalık yapıcı mikroorganizmalar – neden olduğu bulaşıcı hastalık koşullarının tedavisinde çok etkili olduğu kanıtlanmıştır (**Şekil 5.10**). Fakat yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere ve aşılara dayanıklı patojenler ortaya çıkmış ve antibiyotiklerle aşıların etkinliğine meydan okumaya başlamıştır. Mikropların neden olduğu bulaşıcı hastalıklar herkesi etkilemekte ve dünyada 4 yaşından küçük çocuklar arasındaki ölümlerin % 60'ından fazlası bulaşıcı hastalıklardan kaynaklanmaktadır. Kuşkusuz bulaşıcı hastalıkları önleme, belirleme ve tedavi etme yeteneğimiz mikrobiyal biyoteknolojinin önemli bir yanıdır ve aşılar bu süreçte anahtar rol üstlenirler.

Dünyada ilk aşı, Edward Jenner'ın canlı bir inek çiçek hastalığı virüsünün insanları çiçek hastalığına karşı aşılamada kullanılabileceğini kanıtlamasıyla, 1796'da geliştirildi. İnek çiçek virüsüyle insan çiçek virüsü çok yakından ilişkili virüslerdir. Çiçek salgını Avrupa'yı kırıp geçirmiş ve ABD'nin doğu kıyısında yaşayan yerli Amerikalıların tahminen % 80'i ya da daha fazlası Kuzey Amerika'ya göç eden Avrupalılarca taşınan çiçek enfeksiyonu yüzünden yaşamını yitirmişti. İnek çiçek virüsü, ineklerin memesinde kabarcık şeklinde lezyonlar meydana getirir ve insanlarda da benzer deri ülserleri oluşturur. Sütçü kızın inek çiçek enfeksiyonunun kendisini çiçek hastalığından koruduğunu iddia etmesi üzerine, Jenner aşısını hazırladı. Sütçü kızdaki inek çiçeği kabarcıklarından sıvı aldı ve bu sıvıyı içeren iğneleri sağlıklı gönüllülerin derilerini çizmek için kullandı. İlk 'hastası' 8 yaşında bir erkek



ŞEKİL 5.10 Mikroorganizmaların Neden Olduğu Bulaşıcı Hastalıklarla Savaşımda Antibiyotiklerin ve Aşıların Kullanımı Antibiyotik ve aşıların kullanımı ABD'de mikroorganizmaların neden olduğu insan hastalıklarının oranını azaltmış olsa da, yaygın olarak kullanılan antibiyotik ve aşılara karşı dayanıklılık gösteren mikrop suşları ortaya çıkmaktadır. Bu mikroplarla savaşmak için yeni antibiyotikler ve aşılar gerekmektedir.

*The American Society for Microbiology Report: Congressional Briefing. Infectious Disease Threats, 2001.

çocuğuydu. Jenner'ın gönüllülerinin çoğu, çiçek hastalığı taşıyan insanlara maruz bırakıldıktan sonra bile, inek veya insan çiçeği çıkarmadılar. İnek çiçeği sıvısının etkisi altında bırakılmak, Jenner'ın gönüllülerinin bağışıklık sistemini çiçek virüsüne karşı bir koruma geliştirmesi yönünde uyarmıştı.

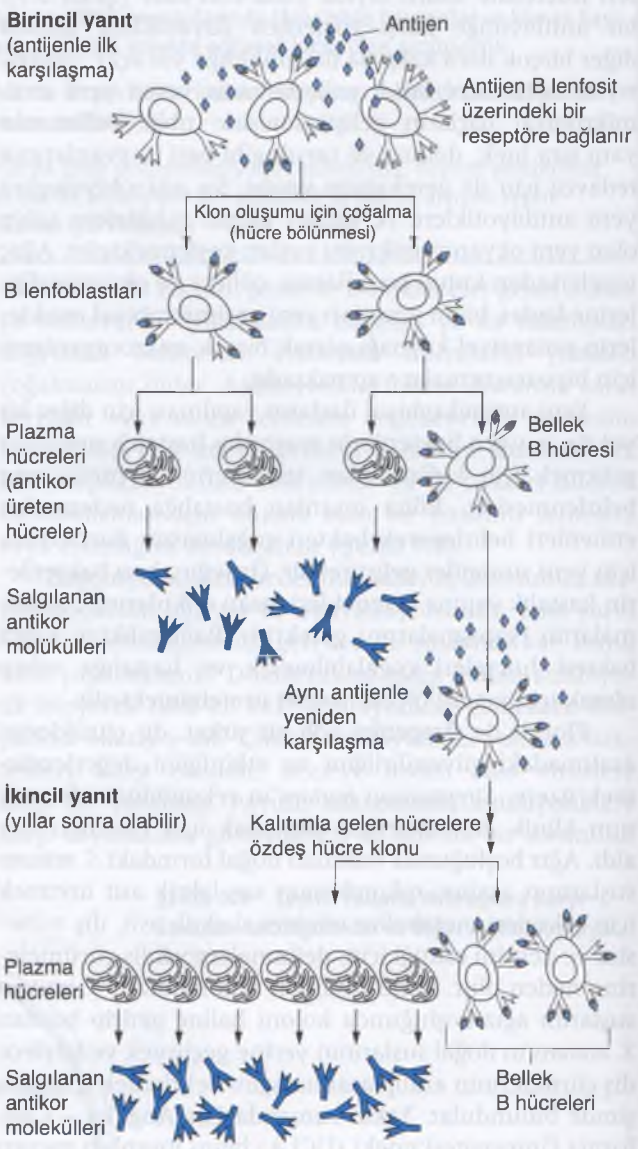
Bu deneyler **aşılama**nın (vaccination-Latince "inek" anlamına gelen *vacca* sözcüğünden türetilmiş) infeksiyöz ajanlar kullanılarak hastalıklara karşı bağışık koruma sağlama potansiyelini kanıtlamıştır. ABD çiçek hastalığı için rutin aşılamaları 1972'de durdurmuş olsa da, 1980'e kadar aşının devam eden geniş çaplı uygulaması bu hastalığı temizlemiştir. ABD'de birçok aşı yenidoğanlara, çocuklara ve yetişkinlere rutin olarak verilmektedir. Size yapılan ilk aşıyı anımsamıyor olsanız da (genellikle 2 aylıktan 15 aylığa kadar yapılır), muhtemelen *d*iphtheria toksini, *p*ertussis toksini ve *t*etanus toksini adlı üç bakteriyel toksine karşı uzun yıllar koruma sağlayan **DBT aşısı (karma aşı)** ile aşılanmışsınızdır. Difteri solunum sorunlarına, felce ve kalp yetmezliğine yol açabilir. Boğmaca o kadar şiddetli öksürük nöbetlerine neden olur ki, çocuklar için yemek, içmek ya da soluk almak çok zor hale gelir. Tetanos çene kilitlenmesine neden olarak ağzın açılmasına engel olur.

Diğer bir çocukluk aşısı da **MMR** (kızamık-kabakulak-kızamıkçık) aşısıdır. Bildiğiniz gibi kızamık isiliğe, yüksek ateşe ve öksürüğe sebep olur, aynı zamanda kulak enfeksiyonu, krizler gibi başka sorunlara, hatta ölüme yol açabilir. Kabakulak ateşe, bezelerde kabarıklığa ve baş ağrılarına neden olmakla birlikte, sağırlığa da yol açabilir. Kızamıkçık ya da Alman kızamığı ateşe, isiliğe ve eklem iltihabına neden olur.

Muhtemelen poliomiyelitis (polio) denen tahrip edici felce yol açan ve omurilikteki sinir hücrelerini enfekte eden polio virüsüne karşı **OPV** (çocuk felci) aşısı da olmuşsunuzdur. OPV çocuk felcinin ortaya çıkışını önemli ölçüde azaltmıştır. Kuzey ve Güney Amerika ile Avrupa'nın büyük bir kısmında neredeyse tamamen yok edilmiş olsa da dünyanın bazı bölgelerinde hala varlığını sürdürmektedir. Jonas Salk 1954'te ilk aşıyı geliştirene dek çocuk felci milyonlarca çocuğu hasta eden çok yaygın bir hastalıktı. Salk'ın orijinal aşısı enjeksiyon gerektiriyordu; Albert Sabin 1961'de aşının ağızdan alınabilen güncel biçimini geliştirdi. Aşıların nasıl çalıştığını anlayabilmek için insan bağışıklık sisteminin temel yönlerini iyi bilmelisiniz.

Antikorlar Hakkında Temel Bilgiler

İnsanların ve hayvanların bağışıklık sistemi oldukça karmaşıktır. Vücutta bulunan sayısız hücre, vücudumuza giren yabancı materyalleri tanıyıp onlara karşı saldırıya geçerek etkisiz hale getirmek veya yok etmek amacıyla, karmaşık yollar kullanarak birlikte çalışırlar. *Bağışıklık sistemini uyarıp bir tepki yaratan yabancı* maddelere **antijen** denir. Bu bir bakteri, mantar ya da *virüsün kendisi olabileceği gibi, polende bulunan pro*tein ve yağlar gibi özgün moleküller de olabilir. Örneğin, besin alerjisi olan insanlar bazı besinlerde bulunan proteinlere, karbonhidratlara ve yağlara karşı bağışıklık tepkisi verirler. Bağışıklık sistemi antijenlere genel olarak antikorlar üreterek yanıt verir. Bu tepkiye **antikor-aracılı bağışıklık** denir (**Şekil 5.11**). Bunlar antijen-



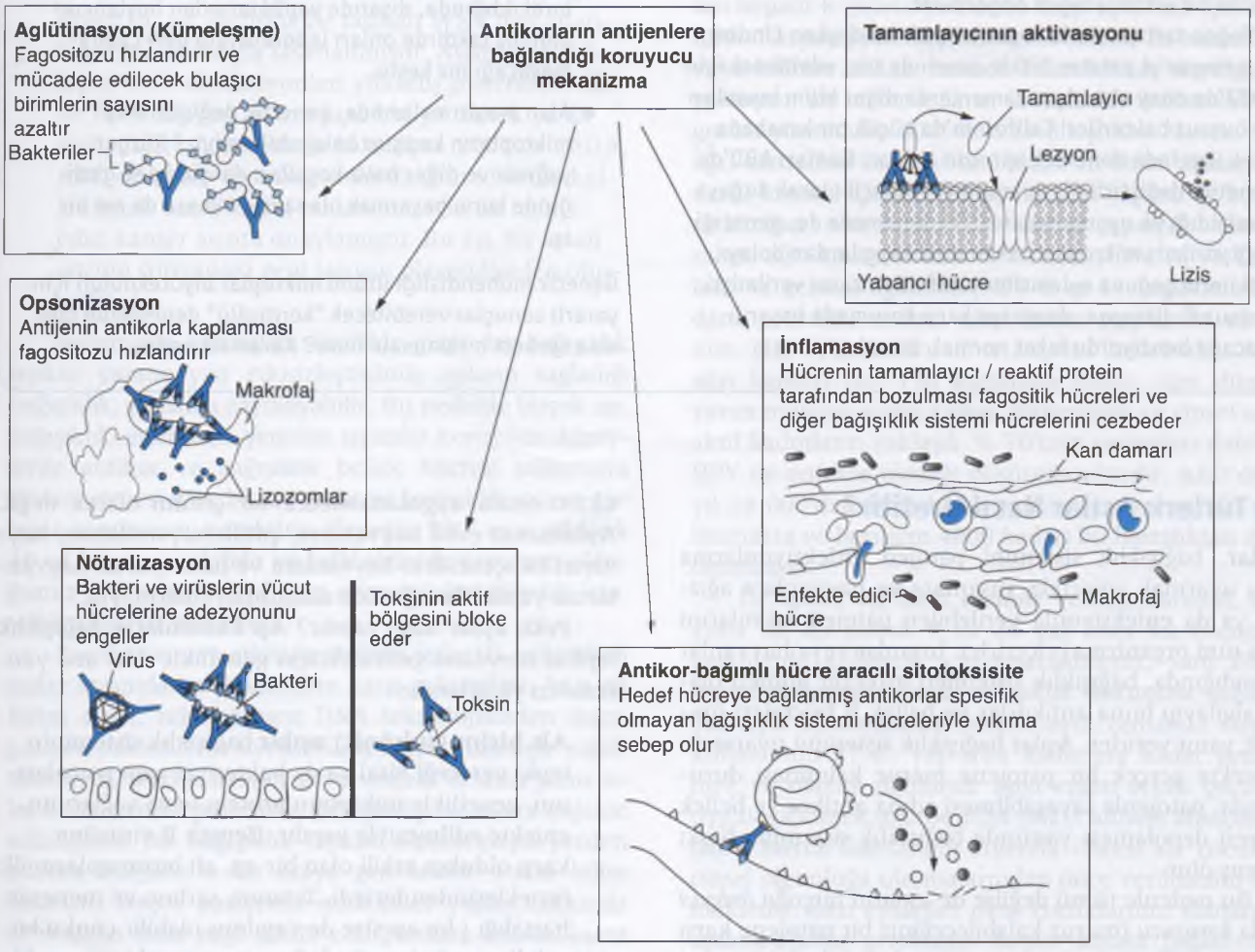
ŞEKİL 5.11 Antijenler Antikor Üretimi İçin Bağışıklık Sistemini Uyarır B hücreleri, bir tam hücre ya da ayrı moleküller halinde etki gösterebilen bir antijenle ilk karşılaşmalarında tepki olarak, birçok başka B hücresi (klonu) meydana getirmek üzere sürekli olarak bölünür. B hücreleri, antijene özgü antikorlar üreten plazma hücrelerine dönüşür. Bu süreç boyunca bellek B hücreleri oluşturulur. Kişinin gelecekte yine aynı antijene maruz kalması durumunda, üzerinden yıllar geçmiş olsa bile, bellek B hücreleri antijeni tanıyabilir ve ona karşı daha güçlü ve hızlı bir tepki geliştirebilir.

lere maruz kaldığında, bir çeşit beyaz kan hücresi veya **akyuvar** olan **B lenfositleri** (kısaca **B hücreleri** olarak anılır) antijenleri tanır ve onlara bağlanır. **T lenfositleri (T hücreleri)**, antijenin tanınıp ona tepki verilmesinde önemli rol oynayarak B hücrelerine yardım eder. Antijenle karşılaştıktan sonra B hücreleri, antikor üretip salgılayan **plazma hücreleri** meydana getirirler. Antikorların çoğu kan dolaşımına salınır, ancak salyada, gözyaşında ve sindirim sistemini kaplayan sıvıda da antikorlar bulunur.

Antikor üretiminin başka bir amacı da antijenlere karşı kalıcı koruma sağlamaktır. B hücrelerinin gelişim süreci boyunca bazı B hücreleri, yabancı materyalleri yıllar sonra bile tanıma yeteneğine sahip olan ve karşılık olarak daha fazla plazma hücresi ve antikor üretip geliştirerek vücuda antijenlere karşı uzun dönemli koruma sağlayan, "bellek" hücrelerine dönüşür (Şekil 5.11).

Antikorlar, karşı koymak için üretilmiş oldukları antijene oldukça özelleşmişlerdir, fakat bu proteinler bedenimizi yabancı materyallere karşı nasıl korumaktadır? Çoğu antikor karşı koyması için üretildiği antijene bağlanır ve onu kaplar (**Şekil 5.12**). Antijenler antikorla kaplandıktan sonra, **makrofaj** denen bir çeşit akyuvar genellikle onları tanıyabilir. Makrofajlar fagositozda (Yunanca *phago* "yemek" ve *cyto* "hücre" terimlerinden türetilen ve tam olarak "hücre yemek" anlamına gelen) çok etkin olan hücrelerdir. Fagositozda makrofajlar antikorla kaplı antijeni içine çeker, sonra da makrofajdaki *lizozom* denen organeller antijeni ayrıştıran kesici enzimleri dışarıya salar (Şekil 5.12). Antijenin bakteri gibi yabancı bir hücre olması durumunda, *hücre lizizi* denen bir işlemle, hücreyi parçalayan mekanizmalarla ilişkili bazı antikorlar devreye girmektedir.

Bağışıklık sistemimizin savaşmak için antikorlar ürettiği antijenlere sürekli olarak maruz kalmaktayız. Fakat kimi zaman, çiçek hastalığı virüsü, sarılıklara neden olan virüsler ve **kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu**na **(AIDS)** yol açan **insan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV)** gibi, patojenlere karşı bizi korunmak için antikorlarımızın sağladığı doğal koruma yeterli olmamaktadır.



ŞEKİL 5.12 Antikor Etkisinin Mekanizmaları Antikorlar antijenleri farklı yollarla etkisiz hale getirebilirler.



KARARI SİZ VERİN

Kaçak Mikroplar

Mikrobiyal biyoteknoloji hakkında süregelen tartışmalardan bir tanesi de, kazaen ya da bilinçli salınım sonucu rekombinant mikropların çevreye yayılma olasılığıdır; tıpkı aşağıda bahsedeceğimiz buzsuz bakteri çalışmalarında olduğu gibi. Rekombinant mikroplar doğaya yayılırsa, sonunda bu organizmalara ne olacağını nereden bileceğiz? Genetik mühendisliği ürünü bakterilerin ilk alan uygulaması, bitki patoloğu Steven Lindow ve arkadaşları tarafından California Üniversitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Bu kişiler, buz kristali oluşumunu tetikleyen proteinler sentezleyen *Pseudomonas syringae* adlı yaygın bir bakteri suşu belirlediler. Lindow'un grubu *P. syringae*'den buz proteini üreten genleri çıkararak, buzsuz bakteriler meydana getirdiler. Buzsuz bakterilerin bitkilere verilmesiyle; bunların normal, buz oluşturan *P. syringae*'yi ortamdan çıkarıp onlara yer bırakmayacağını ve böylece donmaya duyarlı bitkiler için soğuğa karşı koruma sağlanıp, yetiştirme mevsimi uzatılarak bitki veriminin arttırılacağını öngördüler.

Yoğun tartışmalarla kuşatılmış bir haldeyken Lindow, *P. syringae*'yi patates bitkisi üzerinde test edebilmek için 1987'de onay aldı. Aynı zamanlarda diğer bilim insanları da buzsuz bakterileri California'da küçük bir kasabada çilek üzerinde denemek için izin aldılar. Bunlar, ABD'de genetiği değiştirilmiş mikropların bilinçli olarak doğaya bırakıldığı ilk uygulamalardı. İki denemede de, genetiği değiştirilmiş mikroplar hakkındaki kaygılardan dolayı, bitkilerin çoğuna eylemciler tarafından zarar verilmişti. Buzsuz *P. syringae*, donmaya karşı korumada başarılı olacağa benziyordu fakat normal, buz oluşturan *P. syringae*'nin dışarı atılmasında Lindow ve diğerlerinin umduğu kadar etkili olamadı.

Bakteriler arası gen aktarımı yaşamda gerçekleşen doğal bir süreç olduğundan; bilim insanları yatay gen aktarımından, yani genlerin ilişkili mikroplara yayılmasından endişelenmekteler. Genetik rekombinasyon ve yeni genler yaratılması sonucunda, kalıtım yoluyla aldıkları yeni genlere dayalı olarak değişik özellikler kazanmış yeni mikrop suşlarının meydana gelmesi mümkün olabilir.

- Rekombinant mikroplar, genetik olarak değiştirilmiş genleri hedef dışı diğer mikroorganizmalara aktarsalardı ne olurdu?
- Söz gelimi, buzsuz bakteri genleri soğuk koşullar altında yaşamaya uyum sağlamış bakteri suşlarına aktarılsaydı neler olurdu?
- Rekombinant mikroplar kaçtığında veya doğaya bırakıldığında, dışarıda yaptıklarından hoşlanmadığımız takdirde onları laboratuvara geri çağıramayacağımız kesin.
- Alan araştırmalarında, genetiği değiştirilmiş mikropların kaçışını önleyebilir miyiz? Rüzgar, yağmur ve diğer hava koşulları da işin içine girdiğinde bunu başarmak olanaksız olmasa da zor bir iş.

Genetik mühendisliği ürünü mikroplar biyoteknoloji için yararlı sonuçlar verebilecek "kontrollü" deneylerde bile olsa serbest bırakılmalı mıdır? Kararı siz verin.

Aşı Türleri: Aşılar Nasıl Üretilir?

Aşılar, bağışıklık sistemini patojen enfeksiyonlarına karşı uyarmak amacıyla, insanlara ve hayvanlara ağızdan ya da enjeksiyonla verilebilen patojen kısımlarını veya tüm organizmayı içerirler. İnsanlar veya hayvanlar aşılandığında, bağışıklık sistemleri aşıyı bir antijen olarak algılayıp buna antikorlar ve bellek B hücreleri üreterek yanıt verirler. Aşılar bağışıklık sistemini uyararak, gelecekte gerçek bir patojene maruz kalınması durumunda, patojenle savaşabilmesi adına antikor ve bellek hücresi depolaması yönünde bağışıklık sistemine baskı yapmış olur.

Bu nedenle tümü değilse de aşıların birçoğu *önleyici* ya da *koruyucu* (maruz kalabileceğiniz bir patojene karşı koruma sağlayan) olarak tasarlanırlar, *iyileştirici* – yani hastalığa yakalandıktan veya belli sağlık koşulları gelişmeden sonra uygulanabilecek bir çözüm olarak değil. Aşılamanın evcil hayvanlara, çiftlik hayvanlarına, hayvanat bahçesindeki hayvanlara ve hatta yaban hayvanlarına yapılabileceğini de aklınızdan çıkarmayın.

Peki, aşılar nasıl yapılır? Aşı kullanılarak bağışıklık tepkisi meydana getirmek için genellikle dört ana yöntemden yararlanılır.

1. **Alt birim (subünit) aşılar** bağışıklık sisteminin tepki vereceği viral ya da bakteriyel yapı parçalarının, genellikle mikrobun protein veya yağlarının, enjekte edilmesiyle yapılır. Hepatit B virüsüne karşı oldukça etkili olan bir aşı, alt birim aşıların ilk örneklerinden biriydi. Tetanoz, şarbon ve menenjit hastalığı (bu aşı size de yapılmış olabilir çünkü birçok lise ve üniversitede bu aşının yapılması gerekiyor) aşıları da alt birim aşılardır.

2. **Zayıflatılmış (atenüe) aşılar,** yaşlandırma veya gelişme koşullarının değiştirilmesiyle, alıcıya verildiğinde replikasyonları engellenen canlı bakteri ya da virüsler içerir. Çocuk felci aşısı Sabin bir zayıflatılmış aşıdır. MMR, tüberküloz, kolera ve suçiçeği (varisella) ve diğer birçok aşı da bu tür aşılara örnektir.
3. **Etkisizleştirilmiş (ölü) aşılar** patojenin öldürülmesi ve sonra ölü ya da etkisiz hale gelmiş mikroorganizmanın aşı için kullanılmasıyla hazırlanır. Çocuk felcine karşı kullanılan Salk aşısında etkisizleştirilmiş bir polio virüsü karışımı kullanılır. Köpek, kedi ve insanlara enjeksiyonla verilen kuduz aşısı, DBT aşısı ve son yıllarda yaygınlaşan influenza (grip) aşısı da ölü aşılara birer örnektir. Etkisizleştirilmiş grip aşısı aynı zamanda burun spreyi olarak da verilebilmektedir.
4. **DNA temelli aşılar** denenmekte olsa da etkinliği henüz kanıtlanmamıştır. Yine de 2005'te USDA, Batı Nil virüsüne (WNV) karşı kullanılan dünyanın ilk lisanslı DNA aşısını onaylamıştır. Fort Dodge'nin Iowa'daki Fort Dodge Laboratuvarları'nda geliştirilen bu aşı, sivrisinekle taşınan WNV'den atları korumak amacıyla tasarlanmıştır. Atlarda gerçekleşen WNV enfeksiyonları yükseliş göstermektedir ve WNV taşıyan atların üçte biri ya ölecek ya da öldürülmek durumunda kalacaktır. 2007'de USDA, ABD'de insan veya hayvanlarda tüm türlerde kullanılmak üzere kanin melanomu için ilk tedavi edici kanser aşısını onaylamıştır. Bu aşı, bir insan enzimi (tirozinaz) geni taşıyan plazmidlerden oluşmaktadır.

Aşılamayla kazanılan, özellikle güçlü bir bağışıklık tepkisi yaratmayan etkisizleştirilmiş aşıların sağladığı bağışıklık, zamanla zayıflayabilir. Bu nedenle birçok aşı, bağışıklık sisteminin yeniden uyarılıp koruyucu düzeylerde antikor ve bağışıklık bellek hücresi sağlamaya devam etmesi için, birkaç yılda bir bağışıklık *artırıcı* aşılama yapılmasını gerektirir. Örneğin DBT aşısı yaklaşık 10 yıl boyunca etkilidir ve belki sizin de yaptırmış olduğunuz grip aşısı, her yıl yeni grip virüsleri türediği için, yıllık tekrarlar gerektirir.

Zayıflatılmış ve etkisizleştirilmiş aşılar ilk geliştirilen aşılar arasındadır. Bakterilere karşı geliştirilmiş bazı alt birim aşılar, rekombinant DNA teknolojisinden önce, patojen bakterilerin sıvı kültürde büyütülmesiyle yapılmaktaydı. Birçok bakteri çevresindeki ortama proteinler bırakır ve bu proteinler saflaştırılıp insanlara enjekte edildiğinde bir bağışıklık tepkisi oluşturmaya yardım edecek bileşiklerle bir araya getirilebilir. Fakat bilim insanları birçok patojenin moleküler yapısı hakkında artık daha fazla bilgi sahibi olduğundan, rekombinant alt birim aşıların üretimine yönelik girişimler daha gözde hale gelmiştir.

Örneğin **hepatit B**; beden sıvılarına maruz kalma, cinsel ilişki ve bulaşık kanın nakledilmesi sonucu kan yoluyla bulaşan bir virüstür. Hepatit B ölümcül karaciğer rahatsızlıklarına neden olur. Hepatit B aşılarının hazırlandığı ilk zamanlarda bilim insanları virüsü bulaşık hastaların kanından izole ettikten sonra, viral proteinleri saflaştırmak için biyokimyasal yöntemler kullandılar. Bu proteinler daha sonra insanlara aşı olarak verildi. Hepatait B aşısı uluslararası yolculuk yapacak olan kişilere, özellikle Afrika ve Asya'ya gideceklere ve sağlık çalışanlarının yanı sıra hepatit B taşıyan kişilere veya bunların beden sıvılarına temas edebilecek diğer herkese önerilmektedir. Günümüzde hepatit B aşısı dâhil alt birim aşıların büyük çoğunluğu, aşının mikropta üretildiği rekombinat DNA yaklaşımı kullanılarak yapılmaktadır.

Rekombinant alt birim hepatit B aşısı üretimi için, bilim insanları virüsün dış yüzeyinde bulunan proteinlerin genlerini plazmidlere klonladılar. Viral proteinin füzyon proteinleri olarak büyük miktarlarda üretilmesi için, bu plazmidlerin transforme edildiği mayalar kullanıldı ve daha sonra bu proteinler saflaştırılarak, insanları hepatit B enfeksiyonlarına karşı aşılamak için kullanıldı. Füzyon proteinlerinin kimi zaman da bakterilerde veya kültüre alınan memeli hücrelerinde üretildiği bu yaklaşım, alt birim aşıların üretiminde kullanılan yaygın bir yöntemdir. 2005'te eczacılık şirketi Merck, rahim ağzı kanserine karşı rekombinant alt birim aşının (Gardasil) üretimi için FDA onayı almayı başardı ve bu FDA tarafından onaylanan ilk kanser aşısıydı. Gardasil, rahim ağzı kanserlerinin % 70'inin (HPV 16 ve 18 suşları) ve genital siğillerin (HPV 6 ve 11 suşlarının meydana getirdiği) nedeni olan **insan papillom virüsü**nün **(HPV)** belirtilen dört suşunu hedef alır. Rahim ağzı kanseri her 130 kadından birini, tüm dünyada yarım milyona yakın kadını etkilemiştir ve cinsel olarak aktif kadınların yaklaşık % 70'inin yaşamları dahilinde HPV ile enfekte olacağı düşünülmektedir. ABD'de her yıl 10 000'den fazla kadın rahim ağzı kanserine yakalanmakta ve bunların 4000 kadarı bu hastalıktan dolayı ölmektedir.

Üç destek aşı dizisi halinde verilen Gardasil, koruyucu bir aşı olarak 9 ila 26 yaş arası kız çocuğu ve kadınlarda kullanım için tasarlanmıştır; yani HPV'ye maruz kalmadan önce bağışıklık koruması sağlamak amacıyla alınmaktadır. Merck aynı zamanda Gardasil kullanımını 27-45 yaş arası kadınlara kadar genişletmek ve olanak dâhilinde aşıyı ergen erkek çocuklara uygulayabilmek için de FDA onayı almayı amaçlamaktadır. Merck Gardasil'in ergenlik öncesi kız çocuklara, cinsel olgunluğa ulaşmalarından önce verilmesini önermektedir. Bazı eyaletler okul çocuklarının Gardasil ile aşılanmalarını gerektiren henüz karara bağlanmamış yasal düzenlemeler üzerinde durmaktadır. Örneğin Texas Valisi HPV aşılamasını 11-12 yaşlarındaki kız

çocukları için zorunlu kılan bir kararname imzaladı. Zorunlu aşılama oldukça tartışmalı bir konu haline gelmiş durumda (bu bölümün sonundaki Sorular ve Etkinlikler kısmındaki soru 8'i inceleyin) ve Merck bu yüzden aşılamayı zorunlu yapan eyalet yasaları için yürüttüğü lobi faaliyetlerine son verme kararı aldı.

Normal bir bağışıklık sistemi en yüksek etkinliğini, bulaşıcı bir etkenle karşı karşıya kaldığı ilk aşamalarda, patojenler vücuda girer girmez bağışıklık hücreleri onlara saldırdığında gösterebilmelidir. Hastalığa neden olan virüsler hücreleri enfekte etmek, çoğalmak ve hastalığı meydana getirmek için birçok karmaşık yol kullanır. Örneğin, AIDS'e neden olan **insan bağışıklık yetmezliği virüsü-1 (HIV-1)** bir hücreye bağlanıp RNA genomunu ona aktararak insanlardaki bağışıklık hücrelerini enfekte eder (**Şekil 5.13**). Ters transkriptaz enzimi HIV genomunu DNA'ya kopyalar. Kendi RNA genomlarını DNA'ya transkribe eden HIV ve diğer virüslere **retrovirüsler** denir. Viral genom kopyalandıktan sonra, RNA elde etmek üzere transkribe edilir ve translasyonun ardından, daha fazla viral parçacık meydana getirmek için bir araya gelerek bulaşık hücrelerden yayılacak olan viral proteinler üretilir. Viral çoğalmaya yaptığımız bu kısa bakışın nedeni; her bir aşamanın, bazı aşılar da dâhil, antiviral ilaçlar için temel bir potansiyel hedef oluşturmasıdır.

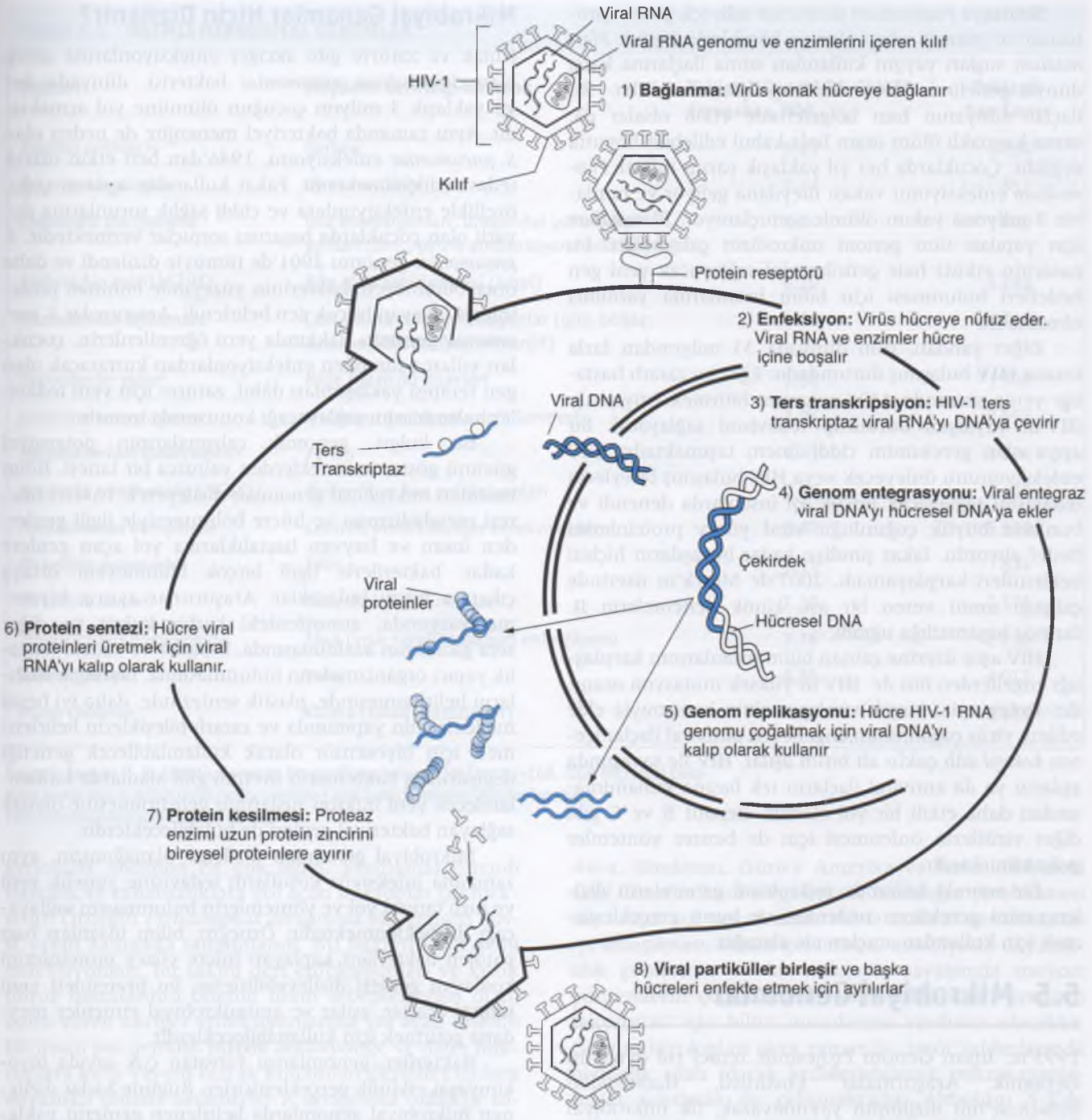
Aşılar için Bakteriyel ve Viral Hedefler

Patojenler sürekli olarak değişmekte ve hem ilaçlara hem de aşılara dayanıklı olanların yanı sıra, hastalığa neden olan yeni bakteri ve virüs suşlarının da ortaya çıkmasına sebep olmaktadır. Bulaşıcı mikropların sayısı, var olan aşılardan daha fazladır. Bu nedenle mevcut aşıların geliştirilmesi ve yenilerinin üretilmesi için öncelikli olan birçok araştırma vardır ve biyoteknoloji şirketlerinin aşı geliştirmek için 50'yi aşkın hedefi bulunmaktadır. Aşıların en temel hedefleri arasında Dang humması, Hepatit C ve E, herpes, belsoğukluğu ve klamidya enfeksiyonu gibi cinsel yolla bulaşan hastalıklar, metisiline dayanıklı *Staphylococcus aureus* (MRSA), pnömokok hastalığı, rotavirüs ve Batı Nil Virüsü bulunmaktadır. Bunlara ek olarak Alzheimer hastalığı, multiple skleroz (MS), alerjiler, madde bağımlılığı, şeker hastalığı ve yüksek tansiyon gibi patojenik olmayan insan hastalıkları da *terapötik* aşıların hedefleri arasındadır. Şimdi yeni aşıların birçok hedefinden birkaçını inceleyeceğiz.

Grip, **influenza** virüs familyasına ait olan çok sayıda virüsün neden olduğu bir hastalıktır. Birkaç gün süren ve reçetesiz satılan ilaçlarla giderilebilen grip belirtilerini birçok insan geçirmiş olmasına karşın, her yıl ABD'de 34 000 dünya genelindeyse sayısı 500 000 ile 1 milyon arasında değişen insan grip nedeniyle yaşamını yitirmektedir. Grip virüsü çok çabuk mutasyona uğradığından, herkes için tüm suşlara karşı koruma sağlayan bir aşı mevcut değildir. Gelecek grip sezonu süresince yaygın olması beklenen üç temel virüs suşu dikkate alınarak, her yıl yeni grip aşıları üretilmektedir. Bu aşılarda kullanılacak olan virüsler yumurtalar içinde büyütülmektedir.

Bulaşıcı hastalıkları ve salgınları gözlemleyen uluslararası bir kuruluş olan **Dünya Sağlık Örgütü (WHO)** 80'in üzerinde ülkede merkezler oluşturmuş ve böylece analiz etmek üzere grip numunelerini tarayıp topladıktan sonra aşı tedavisi yolları geliştirmektedir. Bulaşıcı hastalıklar üzerine çalışan bilim insanları, dünya genelinde grip virüsü suşlarının gözlemlenebileceği, bu virüslerin çoğaltılıp belirlenen yeni viral suşlara karşı rekombinant DNA yöntemleri kullanılarak alt birim aşıların üretilebileceği bir "küresel laboratuvar" kurulması düşüncesi üzerinde durmaktadır. Bu strateji, yeni patojenlere ayak uydurabilme ve gereksinim duyuldukça yeni aşılar üretebilme olanağı tanıyan bir gözetim ve acil müdahale yaklaşımıdır. Bu yaklaşım gelecekte büyük olasılıkla hastalığa neden olan birçok mikroorganizma için uygulamaya geçirilmiş olacaktır.

A tipi grip; bir *pandemi*, yani küresel bir salgın yoluyla insan sağlığını tehdit edebilecek en büyük potansiyellerden birini oluşturmaktadır. A tipi gribin pandemik suşları geçmişte artış göstermiştir. 1918'de grip virüsü en az 20 milyon insanı öldürmüştür. Diğer pandemiler 1957 ve 1968'de meydana gelmiştir ve epidemiyologlar gelecekte gerçekleşecek bir pandeminin, geçmişte yaşananlardan çok daha kötü olabileceğini öngörmektedir. Endişe uyandırıcı son gelişme, tavuklara olan etkisi nedeniyle medyanın yoğun ilgi gösterdiği, **kuş gribi (H5N1)** suşu olmuştur. A tipi gripteki çeşitlilik, virüsün yüzeyinden dışarı uzanan hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) adlı iki glikoproteinden kaynaklanmaktadır (suş adlarında kullanıldığında H ve N olarak kısaltılır). H5N1 olarak anılan kuş gribi, bu suşta bulunan bu iki proteindeki farklılıktan dolayı A tipi gribin bir alt türüdür. H5N1 2003 yılında Asya'da tavuklar arasında bir pandemiye sebep oldu ve sıçramanın durdurulabilmesi için 200 milyondan fazla kanatlı hayvanın öldürülmesi gerekti. Bilim insanları diğer virüsler gibi bu virüsün de mutasyona uğrayıp insanlara sıçrayabileceğinden endişe ettiler. Birkaç nadir insan enfeksiyon vakası görülmüş olsa da geniş çaplı bir enfeksiyon meydana gelmedi, fakat virüsün kuşlardan domuzlara geçişi gerçekleştiğinden, domuzlarda mutasyona uğradıktan sonra insanlara bulaşabilen bir suşun ortaya çıkma olasılığı yüksekti. Böyle bir virüsün meydana getireceği zararlardan dolayı WHO, yüksek öncelikli olarak H5N1'e karşı koruma sağlayan bir aşı geliştirilmesini istedi ve devamında aşılar üretildi. 2009'da **domuz gribi (H1N1)** toplum sağlığı üzerinde önemli kaygılar oluşmasına yol açtı, fakat virüse karşı yapılan aşılama, hastalığın insanlara sıçramasının etkin bir şekilde kontrol edilmesini sağladı.



ŞEKİL 5.13 **HIV-1 Yaşam Döngüsü** HIV-1 replikasyonunun her aşaması antiviral ilaçlar ve bazı aşılar için olası birer hedeftir.

Mycobacterium tuberculosis bakterisinin neden olduğu **verem (tüberküloz-TB)**, her yıl 2-3 milyon kişinin ölümüne yol açmaktadır. Solunum yoluyla alınan *M. tuberculosis*, akciğer dokusuna bulaşarak *tüberkül* denen yumru halinde doku bozulmaları meydana getirir. Veremin yayılması, dünyanın birçok bölgesinde antibiyotik kullanımı ve aşılama yoluyla etkin bir şekilde kontrol altına alındı. Fakat verem bir süre sonra yeniden ortaya çıktı, çünkü *M. tuberculosis* tedaviye dayanıklı olan yeni suşlar oluşturmak konusunda çok yetenekliydi. 1993'te böyle yeni suşlar hakkındaki kaygılar o kadar fazlaydı ki, WHO veremi küresel acil sağlık tehlikesi ilan etti ve birtakım araştırma girişimlerinde bulunuldu. Bill ve Melinda Gates Vakfı, diğer örgütlerle birlikte, bu çabalar için 30 milyon $'dan fazla katkı sağladı. *M. tuberculosis* genomu dizilendi ve bunun sonucunda, şu an birçoğunun klinik denemesi süren yeni verem aşılarının geliştirilmesini sağlayan yeni proteinler bulundu.

Sıtmaya *Plasmodium falciparum* adlı tek gözeli (protozoa) bir parazit sebep olur ve böceklerle taşınır. *Plasmodium* suşları yaygın kullanılan sıtma ilaçlarına karşı dünya genelinde dayanıklılık geliştirmektedirler. Bu ilaçlar dünyanın bazı bölgelerinde etkili olsalar da, sıtma kaynaklı ölüm oranı hala kabul edilebilir boyutta değildir. Çocuklarda her yıl yaklaşık yarım milyar *Plasmodium* enfeksiyonu vakası meydana geliyor ve bunların 3 milyona yakını ölümle sonuçlanıyor. *Plasmodium* için yapılan tüm genom mikrodizin çalışmaları, bu parazitin etkisiz hale getirilmesini sağlayacak yeni gen hedefleri bulunması için bilim insanlarına yardımcı olmaktadır.

Diğer yandan, tüm dünyada 33 milyondan fazla insana **HIV** bulaşmış durumdadır. Eğer bu zararlı hastalığı yenip sonunda AIDS salgınını bitirmek istiyorsak, HIV'in yayılışını durdurup tedavisini sağlayacak bir aşıya olan gereksinim ciddi önem taşımaktadır. HIV enfeksiyonunu önleyecek veya HIV bulaşmış bireylerin tedavisini sağlayacak birçok aşı insanlarda denendi ve bunların büyük çoğunluğu viral yüzey proteinlerini hedef alıyordu, fakat şimdiye kadar bu aşıların hiçbiri beklentileri karşılayamadı. 2007'de Merck'in üzerinde çalıştığı umut veren bir aşı, klinik denemelerin II. fazında başarısızlığa uğradı.

HIV aşısı üzerine çalışan bilim insanlarının karşılaştığı engellerden biri de, HIV'in yüksek mutasyon oranıdır. Dolayısıyla, birçok viral proteinin karışımıyla elde edilen, virüs çoğalmasını engelleyen antiviral ilaçlar içeren *kokteyl* adlı çoklu alt birim aşılar, HIV ile savaşımda aşıların ya da antiviral ilaçların tek başına kullanılmasından daha etkili bir yol olabilir. Hepatit B ve C gibi diğer virüslerin önlenmesi için de benzer yöntemler geliştirilmektedir.

Bir sonraki bölümde mikrobiyal genomların dizilenmesini gerektiren nedenleri ve bunu gerçekleştirmek için kullanılan araçları ele alacağız.

5.5 Mikrobiyal Genomlar

1995'te, İnsan Genom Projesinde temel rol oynayan Genomik Araştırmalar Enstitüsü, *Haemophilus influenzae*'nın dizilimini yayınlayarak, ilk mikrobiyal tam genom dizilimini bildirmiş oldu. O günden beri 1000'in üzerinde mikrobiyal genom yayınlandı ve çalışmalar yüzlerce diğer mikrop genomu üzerinde devam etmektedir. İnsan Genom Projesinin bir uzantısı olarak, ABD Enerji Bakanlığı 1994'te **Mikrobiyal Genom Programı (MGP)**'nı başlattı. MGP'nin amaçlarından biri; çevre biyolojisi, bilimsel araştırmalar, endüstri ve sağlık için potansiyel uygulamalara sahip olan verem, belsoğukluğu ve koleraya neden olan bakteriler veya sıtmaya yol açan tek gözeli patojen organizmalar (*Plasmodium*) gibi mikroorganizmaların tüm genomlarının dizilenmesidir.

Mikrobiyal Genomlar Niçin Dizilenir?

Kulak ve zatürre gibi akciğer enfeksiyonlarına sebep olan *Streptococcus pneumoniae* bakterisi, dünyada her yıl yaklaşık 3 milyon çocuğun ölümüne yol açmaktadır. Aynı zamanda bakteriyel menenjite de neden olan *S. pneumoniae* enfeksiyonu, 1946'dan beri etkin olarak tedavi edilebilmektedir. Fakat kullanılan aşıların çoğu, özellikle enfeksiyonlara ve ciddi sağlık sorunlarına duyarlı olan çocuklarda başarısız sonuçlar vermektedir. *S. pneumoniae* genomu 2001'de tümüyle dizilendi ve daha önce bilinmeyen, bakterinin yüzeyinde bulunan proteinleri kodlayan birçok gen belirlendi. Araştırıcılar *S. pneumoniae* genomu hakkında yeni öğrenilenlerin, çocukları yıllarca sürebilen enfeksiyonlardan kurtaracak olan gen terapisi yaklaşımları dâhil, zatürre için yeni tedaviler bulunmasını sağlayacağı konusunda umutlu.

Bu bulgu, genomik çalışmalarının potansiyel gücünü gösteren örneklerden yalnızca bir tanesi. Bilim insanları mikrobiyal genomları dizileyerek; bakteri hücresi metabolizması ve hücre bölünmesiyle ilgili genlerden insan ve hayvan hastalıklarına yol açan genlere kadar, bakterilerle ilgili birçok bilinmeyeni ortaya çıkarma fırsatı bulacaklar. Araştırıcılar ayrıca; biyoremediyasyonda, atmosferdeki karbondioksit ve diğer sera gazlarının azaltılmasında, besinler ve sudaki hastalık yapıcı organizmaların bulunmasında, biyolojik silahların belirlenmesinde, plastik sentezinde, daha iyi besin maddelerinin yapımında ve zararlı bileşiklerin belirlenmesi için biyosensör olarak kullanılabilecek genetiği değiştirilmiş bakterilerin üretimi gibi alanlarda kullanılabilecek yeni mikrop suşlarının geliştirilmesine olanak sağlayan bakteriyel genleri de bulabileceklerdir.

Mikrobiyal genomları dizileme olanağımızın, aynı zamanda infeksiyöz koşulların tedavisine yönelik yeni ve hızlı tanısal yol ve yöntemlerin bulunmasını sağlayacağı da beklenmektedir. Örneğin, bilim insanları bazı patojen bakterileri kaplayan hücre yüzey proteinlerini kodlayan genleri dizileyebilirlerse, bu proteinleri yeni tanısal araçlar, aşılar ve antimikrobiyal etmenler meydana getirmek için kullanabileceklerdir.

Bakteriler, genomlarını yansıtan çok sayıda biyokimyasal etkinlik gerçekleştirirler. Bugüne kadar dizilenen mikrobiyal genomlarda belirlenen genlerin yaklaşık %45'i işlevi bilinmeyen proteinler üretmektedir ve bulunan genlerin yaklaşık %25'i, dizilenen bakteri genomuna özgü proteinler üretmektedir. Bu nedenle yeni genlerin ve önemli biyoteknolojik uygulamalar sağlayabilecek benzersiz özellikler taşıyan proteinlerin belirlenme potansiyeli oldukça yüksektir.

Bugüne Kadar Dizilenmiş Önemli Genomlar

Mikrobiyal genom araştırıcıları bilinen milyonlarca farklı bakteri arasından en fazla ilgiyi hangilerine gösteriyorlar? Tablo 5.3'te gösterildiği gibi, bakteriyel

TABLO 5.3 ÖNEMLİ MİKROBİYAL GENOMLAR

Bakteri	Meydana Getirdiği Hastalık	Yaklaşık Genom Büyüklüğü (megabaz, Mb)	Yaklaşık Gen Sayısı
Bacillus anthracis	Şarbon	5.23	5 000
Borrelia burgdorferi	Lyme hastalığı	1.44	853
Chlamydia trachomatis	Göz enfeksiyonları, ürogenital yol enfeksiyonları (örn., pelvik enflamasyon hastalığı)	1.04	896
Escherichia coli 0157:H7	Ağır gıda zehirlenmesi (ishal)	4.10	5 283
Haemophilus influenzae	Çocuklarda ciddi enfeksiyonlar (göz, boğaz, kulak enfeksiyonları, menenjit)	1.83	1 746
Helicobacter pylori	Mide (gastrik) ülserleri	1.66	1 590
Listeria monocytogenes	Listeriyoz (ciddi gıda zehirlenmesi)	2.94	2 853
Mycobacterium tuberculosis	Verem	4.41	3 974
Neisseria meningitidis (MC58)	Menenjit ve kan enfeksiyonları	2.27	2 158
Pseudomonas aeruginosa	Zatürre, kronik akciğer enfeksiyonları	6.30	5 570
Rickettsia prowazekii	Tifüs	1.11	834
Rickettsia conorii	Akdeniz lekeli humması	1.30	1 374
Streptococcus pneumoniae	Akut (kısa-süreli) solunum enfeksiyonu	2.16	2 236
Yersinia pestis	Veba	4.65	4 012
Vibrio cholerae	Kolera (ishalli hastalıklar)	4.00	3 885

Kaynak: Sawyer, T. K. (2001). Genes to Drugs. *Biotechniques* 30(1): 164–168. TIGR Microbial Database (www.tigr.org/tdb/mdb/mdbcomplete) and Gold: Genomes OnLine Database (wit.integratedgenomics.com/GOLD).

genomlar arasında en çok ilgiyi, insanlarda önemli hastalık ve rahatsızlıklara yol açan mikroplar çekmektedir. Örneğin *Pseudomonas aeruginosa*'nın genom dizisi yakın zamanda tamamlandı. Bu bakteri idrar yolu enfeksiyonları, bir takım deri enfeksiyonları ve kistik fibroz hastalarının önemli ölüm sebeplerinden olan, uzun süren akciğer enfeksiyonlarına yol açan önemli bir insan patojenidir. Birçok antibiyotiğe ve diğer mikroplara karşı yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara dayanıklı olması nedeniyle, *P. aeruginosa* oldukça sorun yaratan bir bakteridir. *P. aeruginosa*'nın metabolizması, replikasyonu ve bileşikleri yıkımı (antibiyotikler gibi) ile ilişkili olan genleriyle ilgili daha fazla bilgi sahibi olunması, genomunun anlaşılmasını sağlayarak çok önemli katkılar sağlayacaktır.

Genom çalışmalarının hedefi olmuş ilk mikroplardan bir diğeri de, dünyanın genellikle kötü hijyenik koşullara sahip bölgelerindeki kirli sularda bulunan *Vibrio cholerae* idi. Bu bakteri, şiddetli ishal ve kusma sonucu büyük çapta sıvı kaybına neden olarak, şoka hatta ölüme yol açabilen **kolera** hastalığına sebep olur. Antibiyotiğe dayanıklı *Vibrio cholerae* suşları Asya, Hindistan, Güney Amerika ve hatta ABD'deki Gulf Coast'ın kimi bölgelerinde hastalığın yinelenmesi sorununa yol açmaktadır. *Vibrio cholerae* genomunun iyi anlaşılması; toksin genlerinin, antibiyotik dayanıklılık genlerinin ve bu mikropla savaşımda mevcut yöntemlerin çoğaltılmasını sağlayacak diğer genlerin bulunması için bilim insanlarına yardımcı olacaktır. Genom biyologları aynı zamanda, terör saldırılarında biyolojik silah olarak kullanılabilecek mikroorganizmalar üzerinde de çalışmaktadır. Altbölüm 5.7'de mikropların neden ve nasıl biyolojik silah olarak kullanılabileceğini ve bunların genomlarını çalışarak neler öğrenilebileceğini tartışacağız.

Bilim insanları yaklaşık 35 yıldır laktik asit bakterilerinin genetiğini araştırmakta ve bu bakterilerin daha önce değindiğimiz peynir, süt ve diğer ürünlerin tat ve yapısını nasıl etkiledikleri konusundaki bilgilerimize katkıda bulunmaya çalışmaktadır. Sütle ilişkili çok sayıda laktik asit bakterisinin genom projeleri tamamlanmış durumdadır. Örneğin, bilim insanları peynir üretimi için önemli bir suş olan *Lactococcus lactis* genomunu yakın zaman önce dizilediler. Böyle proje-

ler, daha güzel tat özelliklerine sahip peynirler üretilmesi ve kültür koşullarının iyileştirilerek farklı mikropların gelişme yeteneklerinin en üst düzeye çıkarılması için, gıda bilimcilere yardımcı olmaktadır.

Metagenomik Çalışmaları Mikrobiyal Toplulukların Genomlarını Diziler

Metagenomik tüm mikrop topluluklarının genomlarının dizilenmesini kapsar. Metagenomik projelerinde su, hava ve toprağın yanı sıra yeryüzündeki tüm okyanuslar, buzullar, madenler yani neredeyse yerkürenin her köşesinde bulunan mikrobiyal genomlar dizilenir. Yapılan tahminler, şu anda bilinen mikrobiyal çeşitliliğin % 99'undan fazlasının kültürü yapılamayan organizmalarda yer aldığını söylemektedir. Halen deniz mikroplarını ve toprak mikroplarını dizileyen uluslararası araştırma grupları dâhil (devam etmekte olan bir "teragenom" projesi vardır), dünya genelinde birçok metagenomik projesi başlatılmış durumdadır.

İnsan genomunun öncülerinden olan, Bölüm 3'te değindiğimiz J. Craig Venter, J. Craig Venter Enstitüsünü (JCVI) kurmak için 2003'te Celera'dan ayrıldı ve metagenomik alanının kurulmasında temel bir rol üstlendi. Enstitünün girişimlerinden biri, tüm dünyadan deniz ve kara mikroorganizmaları örnekleri toplayıp, bunların genomlarını dizilemek üzere gerçekleştirilen küresel bir keşif gezisidir. Sorcerer II şeklinde anılan ve Charles Darwin'in HMS *Beagle* gemisiyle yaptığı ünlü uzun yolculukların modern versiyonu olarak görülen bu gezide, Venter ve araştırıcıları yatla yaptıkları bir deniz yolculuğuyla dünyayı geziyorlar.

Enstitünün Sargasso Denizi'ndeki Bermuda'da başlattığı bir pilot çalışmada, 1 800 yeni mikroorganizma türü ve 1.2 milyon yeni DNA dizilimi açığa çıkarıldı. Su dikecinin farklı katmanlarındaki su örnekleri, mikropları filtrelemek için çeşitli büyüklüklerdeki yüksek yoğunluklu filtrelerden geçirildi. Daha sonra bu mikroplardan izole edilen DNA shotgun klonlamada kullanıldı ve gemide neredeyse tüm gün boyunca çalıştırılan bilgisayar otomasyonlu dizileyiciler aracılığıyla dizilendi. Bu gezi, yeni mikropların ve ticari anlamda değerli olanlar dâhil, özgün işlevlere sahip genlerin belirlenmesi için önemli potansiyel taşımaktadır. Örneğin Sargasso Denizi projesinde yüzlerce fotoreseptör (ışık alıcı) gen belirlenmiştir. Bilim insanları, hidrojenin bir yakıt kaynağı olarak üretilmesinde fotosentezin kullanılabileceği yollar geliştirmek için, fotoreseptörler hakkında daha fazla bilgi sahibi olmak istemektedir. İnsanlarda ve başka birçok türde, gözlerde bulunan fotoreseptörler görüşten sorumlu olduğu için, tıp araştırıcıları da fotoreseptörlere çok ilgi göstermektedir. Sorcerer II gezisinde; 400'den fazla tanımlanmamış mikrobiyal türden, 6 milyardan fazla baz çiftlik (bç) DNA dizilenmiştir. Bu veriler, 6 milyon farklı potansiyel protein kodlayan, daha önce tanımlanmamış, 7.7 milyon dizilim içermektedir.

İnsan Mikrobiyom Projesi

Ulusal Sağlık Enstitüleri (ABD) 2008'de, insan vücudunun içinde ve üzerinde yaşayan, sayıları tahminen 600-1000 arasındaki bakteri, virüs ve funguslardan oluşan mikroorganizmaların genomlarını tamamlamak amacıyla, 115 milyon dolar bütçeli 5 yıllık bir metagenomik projesi olan **İnsan Mikrobiyom Projesi**ni başlattı. Mikroorganizmalar insan bedeninin % 1-2'lik kısmını kaplayarak, bedenimizde bulunan hücre sayısını 10 katına kadar aşmaktalar. Sindirim sistemindeki *E. coli* gibi birçok mikrop, insan sağlığında önemli rol oynar ve tabii ki diğer bazı mikroplar bizi hasta eder. Buna ek olarak, sindirim kanalında 1 200 farklı bakteriyofaj bulunur (fajların bakterileri enfekte eden virüsler olduğunu Bölüm 3'ten hatırlayın) ve biz aslında bunların yarısından fazlası hakkında hiçbir şey bilmiyoruz.

İnsan Mikrobiyom Projesinin aşağıda belirtilenler gibi birçok önemli hedefi vardır:

- Bireylerin çekirdek bir insan mikrobiyomu paylaşıp paylaşmadığını belirlemek.
- Mikrobiyal toplulukları nasıl edindiğimizi ve barındırdığımızı anlamak.
- Mikrobiyomdaki değişimlerin, insan sağlığıyla ve mikrobiyomu etkileyen koşullarla (stres ve beslenme düzeni gibi) nasıl ilişkilendirilebileceğini anlamak.
- Biyoinformatik araçları da dâhil yeni yöntemler geliştirerek, mikrobiyom incelemelerini desteklemek.
- İnsan mikrobiyom araştırmalarının doğuracağı olası etik, yasal ve sosyal sorunlar üzerine eğilmek. Bu size tanıdık geliyor mu? Etik, yasal ve sosyal konular üzerine eğilmenin İnsan Genom Projesinin (HGP) bir amacı olduğunu anımsayın.

Mikrobiyomun insan genlerinin sayısından 100 ilâ 1000 kat fazla olduğu tahmin edilmektedir. İnsan Mikrobiyom Projesi bir proje olarak henüz başlangıç aşamasında olsa da, 500 mikrobiyal genomu diziledi bile. Şimdiye kadar belirlenen 3.3 milyon insan sindirim sistemi mikrobunun 100'ün üzerinde birey arasında birbirine çok benzerlik gösterdiği görüldü. Aynı şekilde salya mikrobiyomu da bireyden bireye çok benzerlik göstermektedir ve bu çalışmalardan, ağız mikrobiyomuyla ağız sağlığı arasında bir ilişki kurmayı amaçlayan bir İnsan Ağız Mikrobiyom veri tabanı oluşturulmuştur. Yalnızca ağızda gelişen 700'den fazla mikrop türü ağız kokusu, plak oluşumu ve diş çürümesi gibi ağız sağlığı sorunlarına yol açmaktadır. Bilim insanları, saç derisinde bulunan ve kepeğe neden olan bakteri ve mantarların genomlarını tanımlamıştır. Aynı zamanda, sindi-

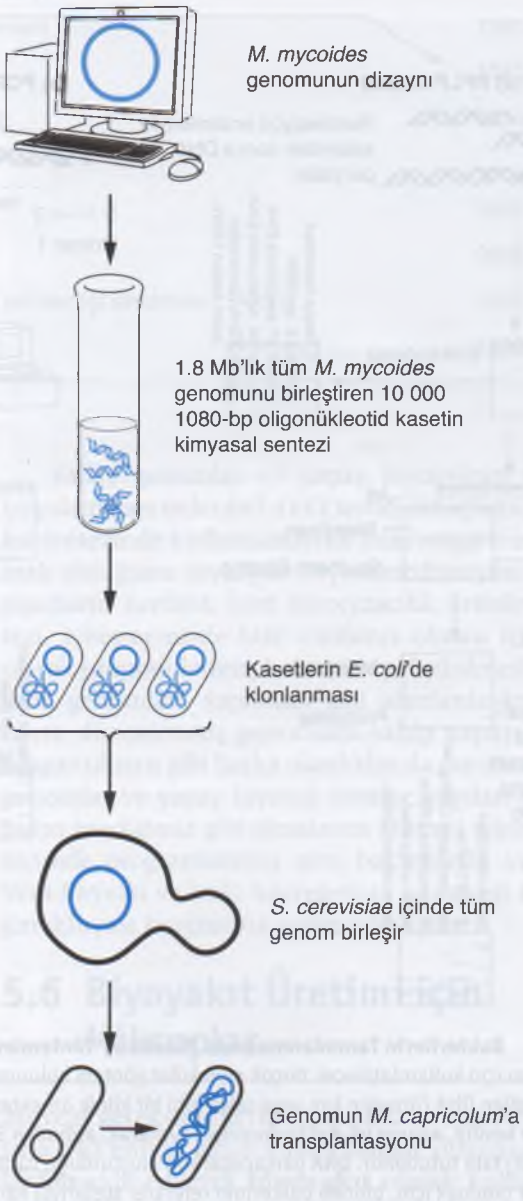
rim sistemindeki mikropların obezitede rol oynadığını ve buradaki mikrobiyal ortamın çocukluktan erişkinliğe kadar değiştiğini öğrenmiş bulunuyoruz. Köpeklerin ve diğer hayvanların mikrobiyomlarının araştırılması için de benzer projeler sürmektedir. Gözünüz mikrobiyom ve diğer metagenomik projelerinin üzerinde olsun, çünkü bunlar birlikte yaşadığımız mikroplar hakkında bize çok ilginç bilgiler verecektir

Viral Genomik

Viral genom çalışmaları, diğer bir güncel çalışma alanıdır (Tablo 5.4, sayfa 149). Güncellik kısmen doğru bir tanımdır, çünkü birçok ölümcül virüs aşılar ve virüs karşıtı tedavilere karşılık olarak hızlıca mutasyona uğramaktadır. Virüs karşıtı ilaçlar çeşitli yollarda etki gösterecek şekilde tasarlanmıştır. Bazı antiviral ilaçlar virüslerin hücre yüzeyine bağlanıp hücrelere bulaşmasını engellerken, diğerleri virüs vücut hücrelerine bulaştıktan sonra viral çoğalmayı önlemektedir. Viral genom çalışmaları, virüslerin hastalıkları nasıl oluşturduğunun anlaşılması konusunda bilim insanlarına yardımcı olarak, yeni ve etkin virüs karşıtı ilaçların geliştirilmesini sağlamaktadır.

Yapay Genomlar Yaratmak: Bir Bakteri Suşuna Ait İşlevsel Yapay Genom Üretildi

JVCI bilim insanları 2010'da ilk işlevsel **yapay genom**un bildirisini yayınladılar. Bu projede *Mycoplasma mycoides* bakterisinin 1.08 Mb'lık tüm genomunu kapsayan, 1080 baz çiftlik binden fazla parça tasarlanıp kimyasal olarak sentezlendi (**Şekil 5.14**). Bu parçaların düzgün bir şekilde bir araya gelmesi için, parçalar her uçta komşu dizilimlerle örtüşen 80 baz çiftlik dizilimler taşıyordu. Bu dizilimler daha sonra *E. coli*'de klonlandı. Ardından, *Saccharomyces cerevisiae* mayası aracılığıyla, işlem sonucunda *M. mycoides*'in tüm genomunu kapsayacak şekilde, bu dizilimler 10 kilo bazlık onbir ayrı takım halinde birleştirildiler. JCVIsyn1.0 adı verilen birleştirilmiş genom, daha sonra yakın bir akrabası olan *M. capricolum*'a aktarılarak JCVI-syn1.0 genotipini taşıyan, fakat yeni bir *M. mycoides* suşu fenotipinde olan bir hücre elde edildi. Şekil 5.15'te



ŞEKİL 5.14 1.08-Mb büyüklüğündeki *Mycoplasma mycoides* genomunun yapay versiyonu olan JCVI-syn1.0'ın oluşturulması Burada *M. mycoides* JCVI-syn1.0'ın üretilmesinde kullanılan yaklaşımın genel bir özeti gösterilmiştir.

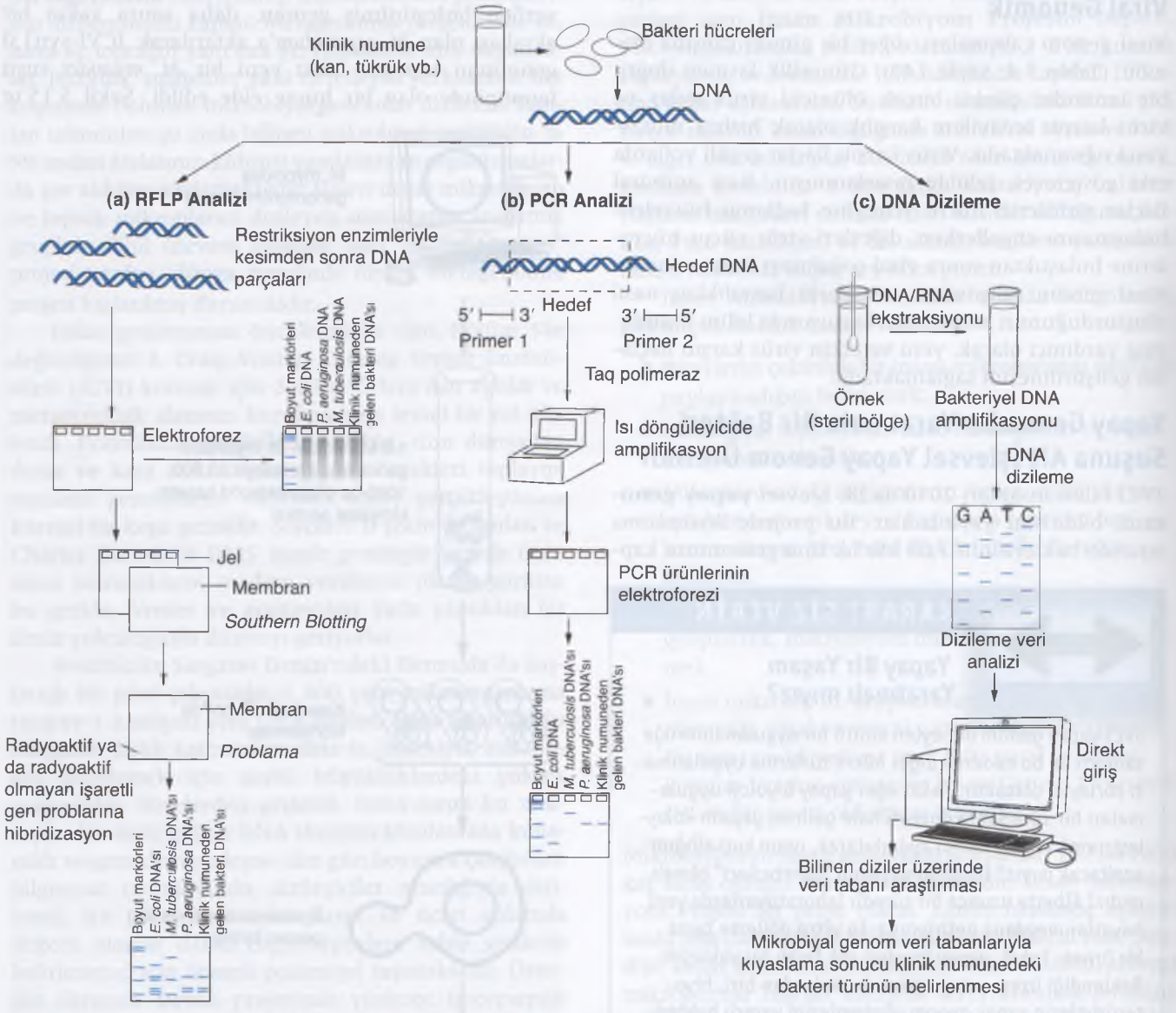
KARARI SİZ VERİN

Yapay Bir Yaşam Yaratmalı mıyız?

JVCI yapay genom deneyleri sınırlı bir uygulanabilirliğe sahiptir ve bu nedenle diğer hücre türlerine uygulanması zorlayıcı olacaktır. Fakat eğer yapay biyoloji uygulamaları bir süre sonra düzenli hale gelirse; yaşamı kolaylaştırarak veya sırlarını aydınlatarak, onun kutsallığını azaltacak mıyız? İnsanlar yaşamın "yaratıcıları" olmalı mıdır? Elbette uzunca bir süredir laboratuvarlarda yeni hayatlar meydana getiriyoruz; **in vitro** dölleme buna bir örnek. Fakat, yapay biyoloji çok farklı bir yaklaşım. Beklendiği üzere ortaya çıkan korkulardan biri, biyoteröristlerin yapay genom yöntemlerini yararlı bakteri ve virüslerden ölümcül bakteri ve virüsler meydana getirmek için kullanabilecekleridir (biyoterörizm ile ilgili altbaşlıkta, biyolojik silahlar hakkındaki bilgileri okuyun). Daha iyi veya istenilir olarak gördüğümüz özelliklere sahip ve doğal yollarla oluşan hücreleri yeniden meydana getirmemizi sağlayacak olan bu teknolojiyi hangi boyutta kullanmalıyız? Gelecekte yapay genomlar, cansız bileşiklerden yaşam meydana getirmek için kullanılabilir mi? Teknik olarak mümkün olursa bu yapılmalı mıdır? Kararı siz verin.

gösterildiği gibi, alıcı hücreler JCVI-syn.10 *M. mycoides* olarak değişmişti; çünkü bunların yapay genomun bünyesine katılmış olan *lac*Z genini eksprese ettikleri görüldü. Tetrasiklin dayanıklılığı seleksiyonu ve alıcı hücrelerin *M. capricolum*'a değil, *M. mycoides*'e özgü proteinleri ürettiğinin belirlenmesi de suş dönüşümünün doğrulanması için kullanıldı.

Bu deneylerin önde gelen etkileyici başarılarından biri; yapay DNA'nın, *M. mycoides*'ten hiçbir protein içermeyen "yalın" bir DNA olması, bu nedenle tüm gerekli genleri transkribe edebilmesi ve *M. mycoides*'e özgü bir yaşam için gerekli tüm protein ürünlerini dönüştürebilmesiydi. Bu sonuç sıradan bir başarı değildir. Yapay genom etkin bir şekilde *M. capricolum* alıcı hücrelerini değiştirerek bir biçimden başka bir biçime sokmuştur. Bu çalışma duyurulduğunda J. Craig Ven-



ŞEKİL 5.15 Bakterilerin Tanımlanmasında Moleküler Yöntemlerin Kullanımı Bakterilerin tanımlanması için kullanılabilecek birçok moleküler yöntem bulunmaktadır. (a) Bazı patojenler için, izole edilen DNA (örneğin kan veya salya gibi bir klinik örnekten elde edilen) restriksiyon enzimleriyle kesilip, agaroz jel elektroforeziyle ayrılarak, ardından Southern blot işlemine (RFLP analizi) tabi tutulabilir. DNA parçacıklarının oluşturduğu bantlar, pozitif bir tanımlamaya olanak tanımak için, bilinen bakterinin referans suşlarıyla karşılaştırılabilir. Bu örnekte klinik örneklerden alınan DNA, *P. aeruginosa* ile eşleşmektedir. (b) PCR, RFLP analizlerine göre çok daha duyarlı olma avantajına sahiptir; bu nedenle küçük klinik örnekler ve az miktarda DNA yeterli olmakta ve enfeksiyonun daha erken tedavi edilmesine olanak sağlamaktadır. (c) DNA dizileme yöntemleri de mikrobiyal tanımlamada yaygın olarak kullanılmaktadır.

TABLO 5.4 TIBBİ ÖNEM TAŞIYAN DİZİLENMİŞ VİRAL GENOM ÖRNEKLERİ

Virüs	İnsan Hastalık veya Rahatsızlığı	Dizilenme Yılı
Ebola virüsü	Ebola hemorajik ateşi	1993
Hepatit A virüsü	Hepatit A	1987
Hepatit B virüsü	Hepatit B	1984
Hepatit C virüsü	Hepatit C	1990
Herpes simpleks virüsü, tip I	Uçuklar	1988
İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV-1)	Kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS)	1985
İnsan papillom virüsü	Rahim ağzı kanseri	1985
İnsan polio virüsü	Çocuk felci	1981
İnsan rino virüsü	Soğuk algınlığı	1984
İnfluenza A virüsü		
• H5N1 alt tipi (Kuş gribi)	Şiddetli grip	2007
• H1N1 alt tipi (Domuz gribi)	Şiddetli grip	2009
Akut solunum yetmezliği coronavirüs (SARS-CoV)	Akut solunum yetmezliği sendromu (SARS)	2003
Variola virüsü	Çiçek hastalığı	1992

ter "Bu bir Macintosh bilgisayarı, içine yeni bir bilgisayar yazılımı yükleyerek, kişisel bir bilgisayara dönüştürmeye eşdeğerdir." iddiasında bulunmuştu.

Venter ve diğerleri, viral genomların yapay kopyalarını oluşturmak için rekombinat DNA teknolojisini kullandılar. New York, Stony Brook Üniversitesi'ndeki araştırıcılar, protein ve yağ sentezi için yapay olarak üretilmiş yaklaşık 7 500 baz çiftlik DNA dizilimlerini birleştirdiklerinde manşetlere çıktılar. Bu dizilimler yeniden yapılmış bir polio virüsün içinde birleştirilmişti ve bu yapay olarak meydana getirilmiş ilk virüstü. Pandemiye yol açmış olan 1918 influenza suşunun genomu da bu yolla bir araya getirilmişti.

Fakat Venter'in *M. mycoides* JCVIsyn1.0 9 ile olan son çalışması, yeni doğmakta olan **yapay biyoloji** alanının dönüm noktası olarak alkışlanmıştır. Bu çalışma cansız bir nesneden yaşam meydana getirmedi, çünkü yaşayan bir suşun bir başkasına dönüştürülmesine dayanıyordu. Yapay genomlar ve genom aktarımı ile ilgili yanıtlanması gereken birçok temel soru bulunuyor. Fakat bu çalışmalar "kavram kanıtlama" açısından; yapay genomların üretilebileceği, birleştirilebileceği ve yapay bir genom tarafından kodlanan mikrobiyal bir suş oluşturmak üzere başarıyla nakledilebileceğini gösteren bir anahtar olmuş ve bilim insanlarını, istenen belli özelliklere sahip genleri taşıyan yeni yapay genomlar üretmeye bir adım daha yaklaştırmıştır.

Yapay genomlar ve yapay biyolojinin potansiyel uygulamaları nelerdir? JVCI temel amaçlarının biyoyakıt sentezinde kullanılabilecek mikroorganizmalar yapmak olduğunu söylüyor. Biyoremediyasyon, alternatif yakıtların üretimi, yeni biyoeczacılık ürünlerinin sentezi, iyileşmemizde bize yardımcı olması için genetik olarak programlanmış bakteriler geliştirilmesi ve "prostetik genomlar" yapılması gibi alanlarda kullanılmak üzere düzenlenmiş genomlara sahip yapay mikroplar oluşturulması gibi başka olasılıklar da mevcuttur. Yapay genomlar ve yapay biyoloji üzerine yapılan çalışmalar; bizim istediğimiz gibi olmalarını kontrol edebileceğimiz biçimde programlanmış yeni bakterilerin ve belki de yeni hayvan ve bitki hücrelerinin yer aldığı bir geleceğin dünyası kurgusuna neden olmuştur.

5.6 Biyoyakıt Üretimi için Mikroplar

Mevcut gereksinimlerin karşılanması için ABD tek başına 140 milyar galon yakıta ihtiyaç duyuyor ve tahıllardan elde edilerek **biyoyakıt** olarak kullanılan etanolden, her yıl yalnızca 5 milyar galon üretebiliyor. Biyoyakıtların üretimi, alternatif bir enerji kaynağı sağlanması ve fosil yakıt kullanımından kaynaklanan küresel ısınmanın azaltılması için önemli potansiyele

sahiptir. Alkol fermantasyonu yapan mikroplar, tahıllardaki glikozu ve diğer şekerleri etanole dönüştürür, fakat bu süreç etanol üretimi için uygun maliyetli veya etkin değildir. Oldukça az bir miktarda etanol elde edebilmek için dâhi çok fazla sayıda mısır tanesi gereklidir. Yine de, göreceğiniz üzere, mısır sapları gibi selülozik biyokütleler etanol üretimi için kolayca elde edilebilen ve bolca bulunan bir şeker kaynağıdır; fakat selülozun glikoza parçalanması kolay bir iş değildir (Bölüm 6). İşin sırrı, selülozun daha sonra fermantasyon süreciyle etanol yapımında kullanılabilecek olan tekil glikoz moleküllerine yıkılmasıdır.

Bitki hücre duvarındaki selüloz, çevrede doğal olarak gerçekleşebilecek yıkıma karşı kısmen dayanıklıdır. Aynı zamanda biliyorsunuz ki siz de ben de selülozu sindiremeyiz; bu nedenle selüloz beslenmemize lif olarak katkı sağlar. Selüloz yapısının gevşemesine yardımcı olan kimyasal uygulamaların kullanıldığı bazı yöntemler vardır, fakat bu kimyasallar etanol yapımında kullanılabilecek birçok mikrobu yok etmektedir.

Alternatif enerji kaynakları üzerinde çalışan birçok şirket, dünyanın fosil yakıtlara olan bağımlılığını azaltmak amacıyla, sürdürülebilir bir biyoyakıt kaynağı olarak etanol üretimi için selülozik şekerler üzerinde durmaktadır. Yaklaşımlardan biri; mısır kabuğu ve sapı, odun yongası gibi kereste artıkları, testere talaşları ve bahçe kesikleri gibi bitkilerden elde edilen artık biyokütlelerin mikrobiyal enzimlerle bir araya getirileceği biyorafineriler oluşturularak, biyokütledeki şekerlerin yüksek etkinlikte yakıta dönüştürülmesidir. Araştırıcılar bu sürece katkıda bulunması için *Zymomonas mobilis* gibi bakteri suşlarını geliştirmektedir. Şekerleri etanole, mayaların yaptığından daha yüksek oranlarda dönüştüren enzimleri kodlayan anahtar genler, genetik mühendisliğiyle bu bakteriye kazandırılmıştır; ancak bunların etanol üretiminde işlem ölçeğinin artırılmasındaki etkinliği henüz kanıtlanmamıştır.

Rekombinant DNA teknolojisi, daha fazla etanol üretme yeteneğine sahip *E. coli* üretiminin yanı sıra, alkol fermantasyonuyla şekerleri etanole fermente etme yeteneği daha fazla olan bakterilerin üretimi için de kullanılmaktadır. Genetik mühendisliği ürünü *E. coli* selüloz yıkıcı enzimler salgılamaktadır. Dünya genelinde biyokütlenin yakıta dönüşmesine yardımcı olabilecek kullanışlı enzimler üreten bakteri ve algelerin belirlenmesi için biyoaraştırma çalışmaları da devam etmektedir. Bir enerji üretme yolu olarak posalardaki bileşiklerin yıkılmasında mikropların kullanımını, biyoremediyasyon yaklaşımlarının nasıl incelendiğini ileride kısaca ele alacağız (Bölüm 9). Biyoyakıtların gelecek potansiyeli belirsiz olsa da, önümüzdeki birkaç yıl içinde araştırmaların biyoyakıt üretiminde önemli ilerlemeler sağlayacağı tahmin edilmektedir.

5.7 Mikrobiyal Tanılama

Mikroorganizmaların insanlarda, evcil hayvanlarda ve tarımsal önem taşıyan bitkilerde birçok hastalığa sebep olduğunu sürekli görüyoruz. Bilim insanları, çeşitli moleküler yöntemler kullanarak mikropları belirleyebilir ve onların izlerini sürebilir. Bu yaklaşım **mikrobiyal tanılama** olarak adlandırılır.

Bakteriyel Belirleme Stratejileri

Moleküler biyoloji yöntemlerinin geliştirilmesinden önce mikrobiyologlar, hastalık yapan bakteri suşlarını tanımlamak için biyokimyasal testlerden ve bakterilerin farklı gelişme ortamlarında kültüre alınmasından yararlanıyordu. Örneğin, doktorlar bir boğaz kültürü alırken ucunda pamuk bulunan bir çubukla boğazınızdan bakteri alarak, boğaz ağrısına neden olan *Streptococcus pyogenes* bakterisinin varlığını test ederler. Bu ve benzeri yöntemler mikrobiyal tanıda hala önemli bir yer tutuyor olsa da, moleküler biyoloji yöntemleri bakteri ve virüslerin çok daha kolayca ve yüksek duyarlılıkta belirlenmesine olanak tanımaktadır. Restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizleri, PCR ve DNA dizileme gibi moleküler yöntemler bakteriyel tanımlama için kullanılabilir (bakınız sayfa 148 **Şekil 5.15**; ayrıca Bölüm 3'e bakınız). Eğer patojenin genomu büyükse ve agaroz jel üzerinde ayrı DNA bantlarının görünmesini engelleyen çok sayıda restriksiyon enzim parçası meydana getiriyorsa, DNA Southern blot analizine tabi tutulabilir (Şekil 5.15).

Klinik örneklerin karşılaştırılması için birçok RFLP, PCR kalıbı ve bakteriyel DNA dizilimi veritabanları mevcuttur. Örneğin, bir doktor bakteriyel ya da viral bir enfeksiyondan kuşkulanırsa; hastadan alacağı kan, salya, dışkı ve beyin-omurilik sıvısı örneklerini bakteriyel ve viral patojenlerin izolasyonunda kullanabilir. Daha sonra kuşkulanılan patojenin DNA'sı izole edilip PCR gibi moleküler yöntemlere tabi tutulur (Şekil 5.15). PCR, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarındaa kullanılan önemli bir tanı testidir ve hepatit virüsleri (A, B ve C), *Chlamydia trachomatis* ve *Neisseria gonorrhoeae* (her ikisi de cinsel yolla bulaşan hastalıklara neden olur), HIV-1 gibi mikropların ve diğer birçok bakteri ve virüsün yol açtığı enfeksiyonların tanılamasında yaygın olarak kullanılmaktadır.

Hastalık Yapan Mikroorganizmaların İzlenmesi

Bilim insanları hastalık yapan mikropların, hastalıkların ve bunların meydana getirdiği salgınların izlenmesi için de moleküler biyoloji yöntemlerini kullanmaktadır. Bildiğiniz gibi, mikroplar yoğurt ve peynir gibi süt ürünlerinin üretiminde önemli rol oynar. Ancak bu süt ürünleri patojen mikroorganizmaların bulaşma riskine

de açıktır. Sütteki mikroplar hakkında bilgi edinilmesi, süt kalitesinin ve sütün bozulmasının belirlenmesi için kullanılabilir. Besinlerdeki bakteriyel bulaşıklık tüm dünyada önemli bir sorundur. Etlere, kümes hayvanlarına ve yumurtalara bulaşabilen *Salmonella* bakterisini muhtemelen duymuşsunuzdur. *Salmonella*, insan bağırsak yolunu enfekte ederek, genel anlamda besin zehirlenmesi belirtileri olarak anılan ciddi boyutta ishale ve kusmaya yol açmaktadır.

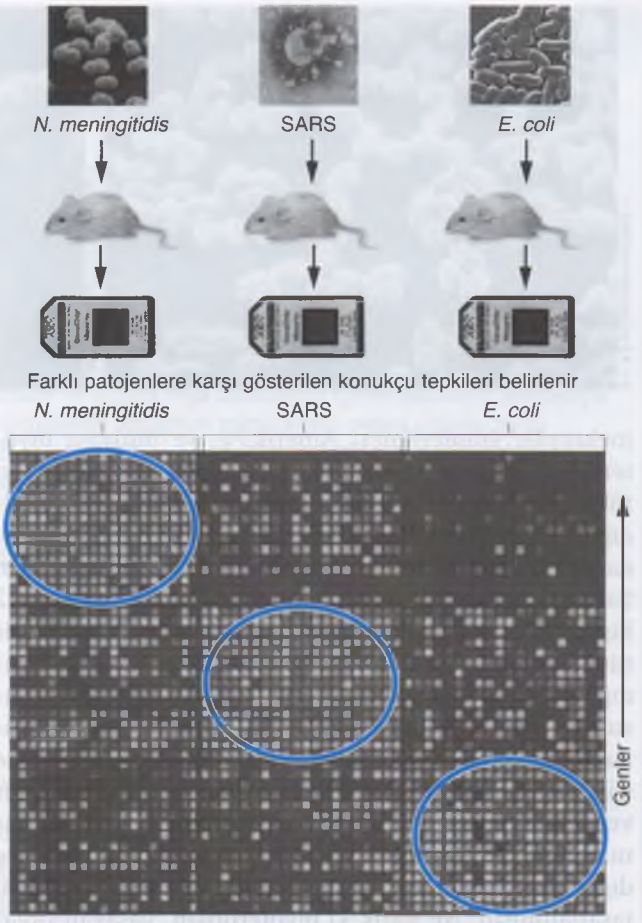
Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) ve ABD Tarım Bakanlığı 1993'te *E. coli* ile bulaşık etin yol açtığı bir salgına başarıyla karşılık verilmesinin ardından, kapsamını genişletmek ve yanıt süresini kısaltmak amacıyla, bir DNA tespit laboratuvar ağı kurdular. **PulseNet** adı verilen bu örgüt biyologlara, DNA parmak izi yaklaşımları kullanarak, herhangi bir halk sağlığı sorunuyla ilgili mikropları kolayca belirleme olanağı tanımaktadır. Besinlere bulaşan mikropların yol açtığı salgınların belirlenmesi ve en az sayıda insanın etkilenmesi adına nasıl karşılık verilmesi gerektiğine karar verilmesi için sonuçlar veri tabanlarıyla karşılaştırılabilir.

ABD'de her yıl mikropların neden olduğu ve besinlerden geçen 76 milyon hastalık vakası meydana gelmektedir ve bunların 300 000'den fazlası hastane tedavisini gerektirmekte, yaklaşık 5 000'i ise ölümle sonuçlanmaktadır. *E. coli* O157:H7 suşu, yalnız ABD'de her yıl 20 000'e yakın besin zehirlenmesi vakasına neden olmaktadır. Bu bulaşıcı suş ölümcüldür. PulseNet *E. coli* O157, *Salmonella*, *Shigella*, *Listeria*'nın yanı sıra tüberküloz gibi besinlerden geçmeyen birçok hastalığı da gözlemlemektedir.

Bulaşıcı Hastalıkların İzlenmesinde Mikrodizinler

Mikrodizinler patojenlerin belirlenmesi ve tanımlanması, bulaşıcı hastalıklara karşı konukçu tepkisinin incelenmesi için yeni yaklaşımlar meydana getirmiştir. Örneğin, mikrodizinin öncüsü Affymetrics A.Ş. **ağır akut solunum yolu sendromu**na **(SARS)** neden olan coronavirüsün tüm genomunu temsil eden yaklaşık 30 000 prob içeren SARSCoV GeneChip'i geliştirmiştir. SARS virüsü ilk belirlendiği Kasım 2002'den beri yaklaşık 9 000 kişiye bulaşmış ve 900'e yakın kişiyi öldürmüş olan, solunum yoluyla oldukça bulaşıcı bir virüstür. Daha önce değindiğimiz H1N1 ve H5N1 grip suşlarının belirlenmesi için de benzer çipler kullanılmaktadır.

Mikrodizin yaklaşımları, organizmalar bir patojenle enfekte olduğunda meydana gelen ve belli bir organizmanın yol açtığı enfeksiyon için bir "imza" görevi gören ekspresyon değişimlerinin araştırılmasında da kullanılmaktadır (Şekil 5.16). Bu çiplerle, bir patojence uyarılmış ya da engellenmiş bir genin davranışları, o patojene özgü ayırıcı bir imza olarak incelenebilmektedir. Şekil



ŞEKİL 5.16 Patojen Belirlenmesi için Konukçu-Tepki Gen Ekspresyonu Bu hayvan modelinde fareler *Neisseria meningitidis* (menenjite neden olan bakteri), SARS veya E. *coli* ile enfekte edilmiş ve her bir patojenle olan enfeksiyonun ardından gerçekleşen gen ekspresyon değişimlerini incelemek için mikrodizin analizleri yürütülmüştür. Bu örnekte etkin olarak sentezlenen genler ışık noktaları halinde görülmektedir. Her patojenin belirli bir gen alt kümesini (daire içine alınmış) etkinleştirerek, araştırıcıların enfekte edici patojeni belirlemek için kullanabilecekleri bir gen ekspresyonu "imzasını" nasıl oluşturduklarına dikkat ediniz.

5.16'da gösterilen üç patojenin farede farklı gen dizilerini nasıl uyardığına dikkat edin.

Bir sonraki kısımda, biyolojik etkenlerin birer silah olarak nasıl tehdit oluşturabileceğine kısaca göz atacağız ve biyoterörizmin belirlenmesi ve onunla savaşımda biyoteknolojinin nasıl kullanılabileceğine değineceğiz.

5.8 Biyoterörizmle Savaşım

11 Eylül 2001'deki trajik olaylar Amerikan topraklarında meydana gelmiş en yıkıcı terörizm saldırısıydı. Bu korkunç trajediyi izleyen haftalarda iki senatöre, diğer meclis üyelerine ve basın mensuplarına, *Bacillus anthracis* bakterisinin sporlarını taşıyan kuru toz bulaştırılmış



ŞEKİL 5.17 Biyosilah Olarak Ölümcül Mikroplar Olası biyosilahlar arasında şarbona (*Bacillus anthracis*, solda) ve vebaya (*Yersinia pestis*, sağda) sebep olan mikroorganizmalar gösterilebilir.

mektuplar gönderilmesi Amerika'yı ve dünyayı biyoterörizm tehdidi konusunda uyarmıştı. *B. anthracis*'in toksik proteinleri; kişinin mikroba ne şekilde maruz kaldığına bağlı olarak deri hücrelerinde, solunum yollarında ve sindirim kanalında çok önemli zararlara yol açar. Şarbona maruz kalmanın sonucunda 5 kişi öldü ve 22 kişi de hastalandı. Bu olaylar biyoterörizm etkinliklerinin, biyolojik etkenler büyük miktarlarda çevreye salındığında, ne kadar yıkıcı zararlara yol açabileceği konusunda hepimizi bilinçlendirdi. **Biyoterörizm** genel anlamda, biyolojik materyallerin insanlara veya beslenme için gereksinim duyduğumuz hayvan ve bitkilere zarar vermek amacıyla silah olarak kullanılması şeklinde tanımlanmaktadır. Biyoteknoloji tam tanımıyla insan ve diğer organizmaların yaşam kalitesini yükseltmek için tasarlanmıştır. Ne yazık ki biyoterörizm, yaşayan organizmaların kötüye kullanımının en uç noktasını temsil etmektedir.

Biyoterörizm, yüzyıllardır haklı bir kaygı yaratmaktadır. Ondördüncü yüzyılda, hıyarcıklı veba hastalığı kurbanlarının bedenleri, Rusya ve diğer ülkelerde meydana gelen savaşlar boyunca bu hastalığa sebep olan *Yersinia pestis* bakterisini yaymak amacıyla kullanılmıştı. Bu uygulama daha sonra Avrupayı kasıp kavuran kara ölüm pandemisinin ortaya çıkmasında da etkili olmuştur. Yeni Dünyanın ilk Avrupalı göçmenleri, Yerli Amerikalılara kızamık, çiçek ve grip hastalığını yaymıştı. Bu hastalıklar kasıtlı olarak yayılmamış olsa da bu sebepten yüzbinlerce Yerli Amerikalı ölmüştü, çünkü bu patojenlere karşı neredeyse hiç bağışıklıkları yoktu. 1990 ve 1995 arasında, Japonya'nın Tokyo kentinin merkezinde kalabalık bölgelerde *Clostridium botulinum* bakterisinin toksinleri spreylerle yayılmışsa da, bu girişim sonucu herhangi bir enfeksiyon meydana gelmemiştir. Son yirmi yılda daha küçük boyutlu birçok benzer olay gerçekleşmiş ve neyse ki bu olaylar dünya genelinde başarısızlıkla sonuçlanmıştır.

Biyosilah Olarak Mikroplar

Yeryüzünde her gün bulaşıcı ve ölümcül potansiyele sahip yeni suşlar ortaya çıkmaktadır. **Biyosilah** olarak kullanılabilecek bu hastalık yapıcı mikroorganizmaların oluşturdukları tehditler akla bilimkurgu romanlarından görüntüler getirebilir, ancak biyoterörizm saldırılarının gerçekleşme potansiyeli gerçektir ve önemli bir sorundur.

İnsanlara bulaşabilen binlerce farklı organizma olası biyosilah seçeneklerini oluşturse da, uzmanlar yalnızca sınırlı sayıda organizmanın uygun bir şekilde kültüre alınıp arıtılarak biyoterörizmde kullanılabileceğini düşünmektedir (Tablo 5.5). Şarbona neden olan gram pozitif *Bacillus anthracis* bakterisi ile çiçek ve Ebola gibi ölümcül virüsler bunlara dâhildir (**Şekil 5.17**). Bilin-



KARARI SİZ VERİN

Patojen Genom Dizilimleri Herkese Açık Veritabanlarında Kalmalı mı?

Bir süreç olarak bilim; bilim insanlarının bilgi ve verilerini konferanslardaki sunumlar yoluyla, yayınlarda ve veritabanları gibi sanal ağ kaynakları aracılığıyla paylaşmasına dayanır. Kolera, şarbon, menenjit ve çiçek hastalıklarına neden olanların da arasında bulunduğu birçok insan patojeninin genomu tamamlanmış olduğundan; biyosilah olarak kullanılabilecek olası mikropların genom dizilimlerinin DNA veritabanlarında herkesçe ulaşılabilir olup olmaması konusunda büyük tartışmalar sürmektedir. Medyada bu konu hakkında çıkan haberler teröristlerin bu dizilim verilerini biyosilah olarak kullanmak üzere, patojen toksinlerinin rekombinant proteinlerini geliştirmek amacıyla kullanabileceğine dikkat çekmektedir. Teröristlerin bu genom verilerini daha yüksek etkili ve mevcut aşı ve ilaçlara dayanıklı "süpersilah" patojenlerin üretiminde kullanabileceğini söyleyenler de vardır. Buna rağmen birçok genom bilimci, açık erişimin önemine atıfta bulunarak ve bu patojenlerin genomları hakkında anlamadığımız çok şey olduğunu, bu nedenle bunların dizilimlerine erişilebilir olmasının insan sağlığına yönelik hiçbir tehdit oluşturmayacağını iddia ederek, patojen dizilimlerinin herkese açık veritabanlarında tutulmasından yana konuşmuştur. Siz ne düşünüyorsunuz? Patojen genom dizilimleri herkese açık veritabanlarında kalmalı mı? Kararı siz verin.

TABLO 5.5 OLASI BİYOLOJİK SİLAHLAR

Etken	Hastalık Tehdidi ve Yaygın Belirtiler
Brucella (bakteri)	Farklı *Brucella* suşları sığır ve keçi gibi çiftlik hayvanlarını enfekte eder. İnsanlarda ve hayvanlarda bruselloza neden olabilirler. Uzun süreli ateş ve halsizlik temel belirtileridir. Bu hastalık ılımlı seyredebilir veya yaşamı tehdit edici olabilir.
Bacillus anthracis (bakteri)	Şarbon. Deri formu (kutanöz), deri yüzeyinde genellikle tedavi edilebilir olan lezyonlar meydana getirir. Şarbonun solunması başlangıçta grip benzeri belirtiler meydana getirir ve genellikle ölümcül olan zatürreye yol açar.
Clostridium botulinum (bakteri)	Botulizm. *C. botulinum* ile bulaşık veya toksinlerini içeren besinlerin yenmesiyle ortaya çıkar. Kas sisteminde botulinum toksinlerinin neden olduğu çeşitli derecelerde meydana gelen felçler tipiktir. Solunum felci ve ani kalp durması sıklıkla ölüme neden olur.
Ebola virüsü veya Marburg virüsü	Her ikisi de oldukça ölümcül olan ve hemorajik ateşe yol açan virüslerdir. Belirtileri arasında yüksek ateş, kas ve eklem ağrısı ve pıhtılaşma bozuklukları vardır.
Francisella tularensis (bakteri)	Tularemi. Akciğer inflamasyonu; solunum yetmezliğine, şoka ve ölüme yol açabilir.
Influenza virüsleri (geniş ve oldukça bulaşıcı bir grup)	İnfluenza (grip). Şiddeti ve sonucu büyük ölçüde virüs suşuna bağlıdır.
Rickettsiya (çeşitli bakteri suşları)	Farklı suşlar, Rocky Dağı benekli humması ve tifüs gibi hastalıklara neden olur.
Variola virüsü	Çiçek hastalığı. Üşüme, yüksek ateş, sırt ağrısı, baş ağrısı ve deri lezyonları.
Yersinia pestis (bakteri)	Hıyarcıklı veba. Yüksek ateş, baş ağrısı, lenf düğümlerinde ağrılı şişlikler, şok, dolaşım bozukluğu, organ yetmezliği ve vakaların birçoğunda enfeksiyondan günler sonra ölüm.

meyen organizmaların biyosilah olarak kullanılması olasılığı endişe uyandırıcıdır, çünkü bunların belirlenip etkisiz hale getirilmesi muhtemelen çok zor olacaktır. Yine de, hakkında az şey bilinen bir mikrobun biyosilah olarak kullanılması da muhtemelen zor olacaktır.

Variola virüsünün yol açtığı çiçek hastalığı, biyosilah olarak çeşitli nedenlerden dolayı önem taşımaktadır. Neredeyse tüm insanlar çiçek enfeksiyonuna karşı duyarlıdır; çünkü geniş çaplı aşılama 20 yıldan fazla zaman önce, doğrulanmış son çiçek vakası bildirildiğinde, durdurulmuştu. O zamanlar WHO, büyük ölçüde aşıların sayesinde, dünya genelinde hastalığın ortadan kaldırıldığını açıklamıştı. Ancak son zamanlarda baş gösteren yeni bir maymun çiçek suşu, çiçek sorununun yeniden canlanmasına neden olabilir. 2001'deki şarbon olaylarının ardından, çiçek virüsünün biyosilah olarak kullanılması kaygısı nedeniyle, ABD hükümeti çiçek aşılarının depolanıp temin edilebilmesi için biyoteknoloji şirketleriyle birlikte çalışmalara başladı.

Biyoterörizmin Hedefleri

Antibiyoterörizm uzmanları, biyoteröristlerin kentleri veya çok sayıda insanın aynı zamanda bir araya geldiği olayları hedef alacağını düşünmektedir. Fakat uzmanlar, geçmişte bu eylemlerin nerede ve nasıl gerçekleşebileceğinin tahmin edilmesi konusunda zayıf bir performans sergilediler. Olsa olsa, insanları öldürmek ya da onlara zarar vermek için biyosilah kullanmanın olası birçok farklı yolu olduğu yorumunu yapabiliriz. Biyoteröristler hızlı ve etkili sonuçlar alabilmek için muhtemelen kullanılabilecek sınırlı sayıdaki girişime başvuracaklardır. Etkenlerin birçoğunun geniş çaplı uygulaması, biyosilahın küçük parçacıklarının bir çeşit spreylemeyle havaya saçılarak solunması şeklinde olabilir. Sprey (aerosol), biyosilahın ince toz halinde öğütülerek, havaya biyosilah bulutu halinde verilebileceği bir "sessiz bomba" şeklinde üretilebilir. Bu sprey gaz benzeri, renksiz, kokusuz ve tatsız olabilir. Böylesi bir sessiz saldırı günlerce belirlenmeden kalabilir. Saldırıyı izleyen günlerde, biyolojik etkene maruz kalan birkaç insanda hekimlerin yanlış tanı koyabileceği veya belirtileri yaygın görülen hastalıklara benzerlik gösteren erken belirtiler görülebilir. Tüm bunlar olup biterken eğer biyolojik etken insandan insana geçmeyi başarırsa, enfekte olmuş bireyler bir yerden başka bir yere gidip hastalıklarını yaydıkça, diğer bölgelerdeki hatta diğer ülkelerdeki çok sayıda insana da hastalık bulaşabilir. Uzmanlar biyolojik etkenlerin bitki ilaçlama uçakları yoluyla yayılabileceğinden veya su kaynaklarına sızdırılabileceğinden de kuşkulanmaktadır.

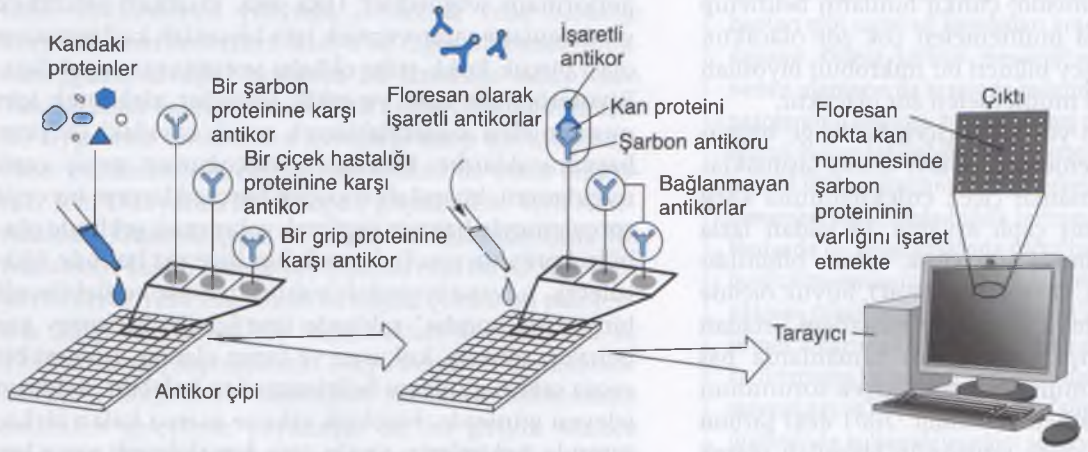
Uzmanlar, insanlara yönelik doğrudan tehdidin dışında, bitkiler, besi hayvanları ve diğer besin kaynaklarında zarar oluşturabilecek biyosilah saldırılarının önlenmesiyle de ilgilenmektedir (Tablo 5.6'ya bakınız). Böyle bir saldırı yalnızca insan sağlığını etkilemekle kalmaz, inek gibi besi hayvanlarının enfekte olması durumunda, bir ülkenin tarımsal ekonomisinin belinin bükülmesine de yol açar. Et ve süt güvenliği konusunda genel bir kaygı olması durumunda, bulaşım korkusundan ötürü birçok tüketici bu ürünleri satın almaktan kaçınacaktır.

Biyosilahlara Karşı Biyoteknolojinin Kullanımı

2001'deki şarbon olaylarında açıkça görüldüğü gibi, ABD biyolojik silahlarla gerçekleştirilecek bir saldırıya karşı genel olarak hazırlıksızdır. Amerikan Mikrobiyoloji Derneği, USDA, CDC, ABD Sağlık ve İnsani Hizmetler Bakanlığı ve ABD Meclisi gibi birçok birim, biyoterörizmin yaratacağı tehlikelerin en aza indirilmesi ve olası saldırılara karşılık verilebilmesi amacıyla gerekli yasal düzenlemelerin yapılması için çalışmalar başlattı. Örneğin, ABD Posta Hizmetleri x-ışınları ve ultraviyole ışığı kullanılarak postaların sterilize edilmesi teknolojisini uygulamaya koydu. 2004'te ABD Federal Hükümeti biyolojik ve kimyasal terörizmle savaşmak için bir inisiyatif alarak, Biyokalkan olarak adlandırılan projede 10 yılı aşkın bir süre boyunca kullanılmak üzere, yaklaşık 6 milyar dolarlık bir bütçe ayırdı. Biyokalkan'ın temel hedeflerinden biri, Amerikalıları tedavi etmek veya biyosilahlardan korumak için çok miktarda aşının ve ilacın alınması ve geliştirilmesidir. Tüm bütçe artırımlarına, yeni yasalara ve uluslararası antlaşmalara rağmen, hiçbir önlem biyoterörizmin bir daha asla meydana gelmeyeceğini ya da gerçekleşmesi durumunda böyle bir saldırıyı belirleyip insanları hastalıktan koruyabileceğimizi garanti edemez. Biyoterörizmin önlenmesi için dünya çapında çaba harcanması esastır; peki bir saldırı gerçekleşmesi durumunda biyosilahların belirlenmesi ve buna karşılık verilmesine biyoteknoloji nasıl yardım edebilir?

Bir saldırının belirlenmesinde temel adım alan denemeleridir. Alan denemelerinden bazıları, havada veya su örneğinde patojenlerin ya da belli moleküllerin bulunup bulunmadığını belirlemede kullanılan, ELISA gibi antikor temelli testleri kapsar. 2001'deki şarbon korkusu, Körfez Savaşı, Afganistan ve Irak Savaşları boyunca Pentagon çevresine böyle birimler yerleştirilmişti. Bu birimler havayı içine çeker ve havadaki patojenleri belirlemek için antikorlar kullanır. Bu yöntem çok etkili değildir, çünkü bu aygıtların çoğu çok duyarlı değildir ve bir patojenin küçük miktarlarını belirleyememektedir. Aslında bu algılayıcıların çevrede doğal olarak var olan zararsız mikropları belirlediği bilinmektedir. Daha duyarlı yeni biyosensörlerin geliştirilmesi gerekmektedir. PCR kullanılan benzer belirleme testleri geliştirilmiştir.

Protein temelli analizler arasında, ABD Deniz Kuvvetleri bilim insanlarının geliştirdiği, hızlı bağışıklık testleri ile, şarbon sporları ve çiçek virüsü gibi havadan yayılabilen patojenleri belirlemek için orduda kullanılan protein mikrodizinleri yer almaktadır (**Şekil 5.18**).



1) Kan, ızgaradaki belli karelere konmuş antikorlardan oluşan çipin veya dizinin üzerine uygulanır. Her kare, tek bir organizmaya ait belirli bir proteine bağlanabilen bir antikorun çoklu kopyalarını içerdiğinden, belli bir hastalık yapıcı etkeni temsil eder.

2) Çip üzerindeki antikorların da tanıyabildiği proteinlerin başka bir ucuna bağlanabilen ve floresan olarak etiketlenmiş antikorlar bu proteinlerin üzerine uygulanır. Eğer kandan gelen bir protein çipe bağlanmışsa, bu floresan antikorlardan biri o proteine bağlanarak, proteini bir antikor "sandviçi" içine hapseder.

3) Hastanın bedeninde hangi organizmanın var olduğunu belirlemek için, çip bir tarayıcıya yerleştirilir. Bu örnekte suçlunun şarbona yol açan *Bacillus anthracis*, bakterisi olduğu görülmüştür

ŞEKİL 5.18 Biyosilah Patojenlerin Belirlenmesi için Protein Mikrodizinleri

Laboratuvar ortamında kullanım için tasarlanmış testler veya arazi şartlarına uygun hızlı tanılama testleri (bazı arazi temelli mikrodizinler daha sağlam olmaları için elmasla kaplanmıştır), tüm patojenleri veya protein ya da spor gibi patojen bileşenlerini belirleyebilmektedir.

Bulaşmanın boyutunun değerlendirilmesi ve kullanılan biyosilah göz önüne alınarak uygun temizleme yönteminin belirlenmesi için, acil durum müdahale ve temizlik ekiplerine de eylem çağrısında bulunulur (**Şekil 5.19**). Herhangi bir saldırı durumunda antibiyotik gibi tedavi ilaçlarına gereksinim duyulacaktır. Devletler gerekli olduğunda çok sayıda insana geniş oranda dağıtılmak üzere ilaç ve aşı stokları oluşturmalıdır. Aşılarla ilgili en temel sorun, etkili olması için bunların biyosilahlara maruz kalmadan *önce* uygulanması gerektiğidir; aşıların bir saldırıdan sonra enfekte olmuş bireylere verilmesi yararsızdır. 2001'den beri CDC, ABD'deki çiçek aşısı stoğunu artırmaktadır. Bazı ordu personelinin zorunlu aşılanması ve sağlık çalışanları ile virüsle karşılaşma olasılığı yüksek olan ilk müdahale ekiplerinin aşılanması için gönüllü seferberlikler de başlatılmış durumdadır. Yine de, en fazla uygulanan tedavilere karşı koyabilecek şekilde düzenlenmiş organizmaların kullanıldığı bir biyoterörist saldırının gerçekleşmesi veya bilinmeyen bir organizmanın biyosilah olarak kullanılması durumunda, ilaçlar ya da aşılar bile etkisiz kalabilir. Örneğin, 2001'deki şarbon tehdidi süresince siprofloksasin (Cipro) antibiyotiğinin ne kadar yüksek talep gördüğünü belki hatırlarsınız.



ŞEKİL 5.19 Biyoterörizmle Savaşım ABD Sahil Güvenlik tehlikeli madde çalışanları, 2001'deki şarbon saldırılarının ardından Hart Senato Ofisi Binasını şarbon sporlarından temizlemek için içeride çalıştıktan sonra, bir çalışma arkadaşlarını zararlı maddelerden arındırıyorlar. Biyoterörizmle savaşım bilim insanlarından hekimlere, politikacılara, acil durum müdahale ekiplerine ve temizlik personeline kadar birçok kişinin eşgüdümlü çabasını gerektirmektedir.

Bu dünyada birilerinin biyolojik silahlarla bir saldırı gerçekleştirme planı için uğraşıyor olabileceği acı verici bir gerçektir. Buna hazırlıklı olabilecek miyiz?

TABLO 5.6 BESİN KAYNAKLARINA YÖNELİK BİR BİYOSİLAH SALDIRISI İÇİN OLASI BİYOLOJİK PATOJENLER

Hastalık	Hedef/Taşıyıcı	Etken
Hayvan hastalıkları		
Şap hastalığı	Çiftlik hayvanları	Şap virüsü
Afrika domuz ateşi	Domuzlar	Afrika domuz ateşi virüsü
Bitki hastalıkları		
Tahıl pas hastalığı (fungus)	Yulaf, arpa, buğday	*Puccinia* spp.
Mısır yaprak yanıklığı (fungus)	Mısır	*Bipolaris maydis*
Çeltik yanıklığı (fungus)	Çeltik	*Pyricularia grisea*
Patates mildiyösü (fungus)	Patates	*Phytophthora infestans*
Turunçgil kanseri (bakteri)	Turunçgiller	*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*
Zoonozlar		
Brusella (bakteri)	Çiftlik hayvanları	*Brucella melitensis*
Japon ensefaliti (virüs)	Sivrisinekler	Japon ensefaliti (flavivirüs)
Deri şarbonu (bakteri)	Çiftlik hayvanları	*Bacillus anthracis*

Kaynak: Gilmore, R. (2004): U.S. Food Safety Under Siege? *Nature Biotechnology*, 22: 1503–1504.



KARİYER PROFİLİ

Mikrobiyal Biyoteknoloji Birçok Kariyer Seçeneği Sunar

Mikrobiyal biyoteknoloji alanındaki araştırma ve geliştirme çalışmaları tüm eğitim düzeyleri için olanaklar sunar. Üst düzey pozisyonlar için genelde lisansüstü dereceler gerekse de, lisans derecesine sahip kişiler oldukça fazla sayıda pozisyonda bulunmaktadır. Ürünlerdeki geniş çeşitlilik nedeniyle, şirketler biyolojinin tüm alanlarında (moleküler biyoloji, protein biyokimyası, mikrobiyoloji, biyomühendislik ve kimya mühendisliği) altyapısı olan kişiler aramaktadır. Bu kişiler ürünleri tasarlayacaklar ve bunların tespit, yararlılık ve etki yönünden nasıl test edileceğini belirleyecekler. Bu gruplardaki biyologlar ve mühendislerin küçük çapta geliştirdikleri üretim yöntemleri, ileride rekombinant mikropların fermentörlerde yığın kültürlerinin yapılması gibi büyük ölçekli üretimler için kullanılabilecektir.

Biyoteknoloji endüstrisindeki sıkı düzenlemeler, üretimi çok duyarlı davranılması gereken bir süreç yapmaktadır. Bu nedenle liseden lisans derecesine kadar, çeşitli eğitim altyapılarına sahip iyi yetişmiş bir üretim personeline gereksinim vardır. Şirketler genellikle personelini bu pozisyonlar için kendisi eğitmektedir. Kalite kontrol personeli ürünlerin düzgün bir şekilde üretilmiş olduğundan emin olmak için, ürünleri test edip işlem örneklerini denetler. Su ve kültür ortamından, kimyasal hammadde ve son ürünlere kadar çeşitli örnekler toplayıp test ederler. Eğitim geçmişleri yine lise eğitiminden lisans derecesine kadar değişebilir. Şirketler personel için genellikle eğitim olanağı sağlar, fakat daha gelişmiş analitik yöntemler için biyoanalitik yöntemler konusunda (örneğin yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), jel analizleri, blot teknikleri ve PCR) bilgi ve deneyim sahibi kişiler avantajlı olacaktır.

Kalite güvence personeli, ürünlerin sıkı yönetmeliklere uygun şekilde üretiminin sağlanmasından sorumludur. Bu personel üretimden önce ve sonra, üretim süreci kayıtlarını (seri kayıtlar) inceler. Yalnızca yeni düzenlemeleri takip etmekle kalmayıp, FDA ve diğer düzenleyici kuruluşlarla bağlantı halinde olmalı ve bu pozisyonda hizmet verebilmek için üretim sürecine yeterli derecede hâkim olmalıdır. Bu personelin mikrobiyoloji konusunda bir altyapıya ve bilgiye sahip olması onlara çok yardımcı olacaktır, fakat yasal konulara ve düzenlemelere ilgi duymaları ve iyi bir yazma becerisine sahip olmaları da çok önemlidir.

Kaynak: Daniel B. Rudolph'un katkılarıyla (Üretim Mühendisi, Lonza Group LTD, Baltimore, MD).

BİR FARK YARATMAK

Bakterilerin ürettiği antimikrobiyal ürünlerin insan, evcil hayvanlar, çiftlik hayvanları ve diğer hayvanlarda meydana gelen enfeksiyonların başarıyla tedavi edilmesinde çok etkili olması ve bulaşıcı mikropların yeryüzünde yayılışını sınırlaması nedeniyle, antibiyotikler 80 yılı aşkın süredir bakterilerden izole edilmekte veya sentezlenmektedir. Bir biyoteknoloji ürünü olarak antibiyotiklerin, hastalıklarla savaşım açısından yaşam kalitemizin yükselmesinde önemli bir fark yarattığı konusunda hiç şüphe yoktur. Uzun süreli antibiyotik tedavisi gören bireylerde fazla dozda antibiyotik kullanımının sağlık sorunlarına yol açtığına ve bu şekilde kullanımın antibiyotiğe dayanıklı yeni mikrop suşlarına neden olduğuna dair örnekler de vardır. Bu nedenle biyoaraştırmalar enfeksiyonla olan savaşımızı sürdürmekte ve şirketler mikroplardan elde edilecek yeni antibiyotikler aramaya devam etmektedir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Prokaryotik hücre yapısının ökaryotik hücre yapısından nasıl ayrıldığını, en az üç yapısal farklılık belirterek açıklayın. Prokaryotik hücrelerin biyoteknolojiye sağladığı önemli yararlara özgün örnekler verin.
2. Mayaların bakterilerden nasıl ayrıldığını ve mayaların görev(ler)ini, en az iki önemli biyoteknoloji uygulaması ile açıklayın.
3. Kalsiyum klorit transformasyonu işleminin hangi basamağında DNA hücrelere bağlanır? Bu işlemin hangi basamağı DNA'nın hücrelere girmesini sağlar? Transformasyonda elektroporasyonun kalsiyum klorit yöntemine göre avantajlı olduğu yönleri açıklayın.
4. Bir virüs ya da bakteriyle savaşımda kullanılacak aşıların dört temel üretim biçimini tartışın ve her bir aşının nasıl çalıştığını açıklayın.
5. Anaerobik mikroplar birçok besinin üretimi için neden önem taşımaktadır?
6. Eğer düşük alkol içeriğine sahip ve tatlı bir şarap üretmek isteseydiniz, istenen sonuçların alınması için, biyoreaktörünüzdeki oksijen konsantrasyonunu kontrol etmek amacıyla neler yapabilirdiniz? Açıklayın.
7. Eğer halkı biyoterörizm saldırılarından korumakla yükümlü olsaydınız, bulaşıcı etkenlerin gözlenmesi için ne gibi biyoteknoloji stratejileri göz önüne alırdınız? Çiçek hastalığına neden olan *Variola vaccinia* virüsü gibi bir biyosilaha karşı aşı-

lama yapılması, bu aşı bazı kişilerde yaşamı tehdit eden yan etkilere yol açsa dahi, sizce tüm vatandaşlar için zorunlu hale getirilmeli midir?

8. Mikrobiyal genom çalışmalarından elde edilen bilgi, mikrobiyal biyoteknolojide nasıl kullanılabilir? Üç örnek verin.
9. FDA (http://www.fda.gov/) ve CDC (http://www.cdc.gov/) internet sayfalarını inceleyerek, (1) bu yıl aşı üretimi için hangi grip virüsü suşlarının onaylandığını, (2) hangi şirketlerin aşı üretimi için onaylandığını ve (3) kaç doz aşının üretileceğini belirleyin.
10. Kızamık ve çocuk felcine neden olanlar gibi bazı patojenlere karşı aşılanmaya alışkınız. Ancak bazı eyaletler cinsel ilişki yoluyla geçen insan papillom virüsüne karşı kullanılan aşının (Gardasil) tüm genç kızlara uygulanmasını gerektiren tasarılar üzerinde çalışmaktadır. Bu tasarı hakkında ne düşünüyorsunuz? Böyle bir aşılama zorunlu olmalı mıdır? Bu tasarı gençlerin cinsel aktivitesiyle ilgili hangi tahminlerde bulunmaktadır? *Bu tarihteki en pahalı aşıdır (üç doz için yaklaşık 360$).* Eğer böyle bir program zorunlu hale gelirse, aşılar için eyalet veya federal hükümetler tarafından mali destek sağlanmalı mıdır?
11. Füzyon proteini nedir ve istenen rekombinant proteinin izolasyonunda nasıl kullanılır?
12. Bakterilerde üretilen üç terapötik rekombinant protein adı verin ve ne için kullanıldıklarını açıklayın.
13. Çoğu aşı önleyici veya koruyucu olarak tasarlanmıştır. Bu ne anlama gelmektedir?
14. Metagenomik nedir? Yanıtınızda metagenomik projelerinin neden değer taşıyabileceğine dair bir örnek verin.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

6

Bitki Biyoteknolojisi

Çevirenler: Özlem ATEŞ SÖNMEZOĞLU, Ahmet YILDIRIM

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Biyoteknolojinin tarım endüstrisi üzerindeki etkisini açıklayabilmelisiniz.
- Bitkisel yeni ürünler geliştirmenin bir yolu olan, klasik melezleme ıslahının getirdiği kısıtlamaları tartışabilmelisiniz.
- Bitkilerin genetik mühendisliğine uygun olma nedenlerini açıklayabilmelisiniz.
- Protoplast füzyonu, yaprak parçacık tekniği ve gen tabancaları gibi bitki gen aktarım tekniklerinde kullanılan bazı yöntemleri listeleyebilmeli ve açıklayabilmelisiniz.
- Gen aktarım vektörlerinden Ti plasmid ve *Agrobacterium*'un kullanımını anlatabilmelisiniz.
- Antisens teknolojisini tanımlayabilmeli ve bitki biyoteknolojisinde kullanımını bir örnekle açıklayabilmelisiniz.
- Genetiği değiştirilmiş bazı bitkileri listeleyebilmelisiniz.
- Biyoteknoloji ile geliştirilmiş bitkilerin çevreye olan olumlu ve olumsuz etkilerini ana hatlarıyla belirtebilmelisiniz.
- Bitki biyoteknolojisindeki fitokimyasal olanakları tanımlayabilmelisiniz.
- Biyoteknolojinin dünyadaki açlık ve yetersiz beslenmeyi azaltmada sahip olduğu potansiyel uygulamalardan birkaçını sıralayabilmelisiniz.



Bir bitki biyoteknoloji şirketinde kalite kontrolü için değerlendirilen biyomühendislik bitkileri.

Marketlerde satılan kırmızı sulu domatesler gerçek bir mühendislik başarısıdır. Cılız asidik meyve sayısız seleksiyon ıslahı generasyonu ile bugün domates olarak bildiğimiz lezzetli meyveye dönüştürülmüştür. Son yirmi yıldır, klasik melezleme ile (yabancı tozlama yoluyla) yetiştirilmesi kolay, hızlı olgunlaşan ve hastalıklara dayanıklı domatesler üretilmiştir. Biyoteknolojik çalışmalardaki öncelikli hedefler; tadını azaltmadan, daha uzun raf ömürlü domatesler yapmaktır. Gelecekte domateste daha da ilginç bir aktarım yapma olasılığı vardır: Domates ve diğer yiyecekler günün birinde insan hastalıkları ile ilgili aşılamanın bir ek yolu olacak veya belki de aşının yerine geçebilecektir. Örneğin, araştırıcılar klinik deneylerde gönüllü hastalara transgenik patatesleri yedirerek, onları Norwalk virüsüne karşı başarılı bir şekilde aşılamışlardır.

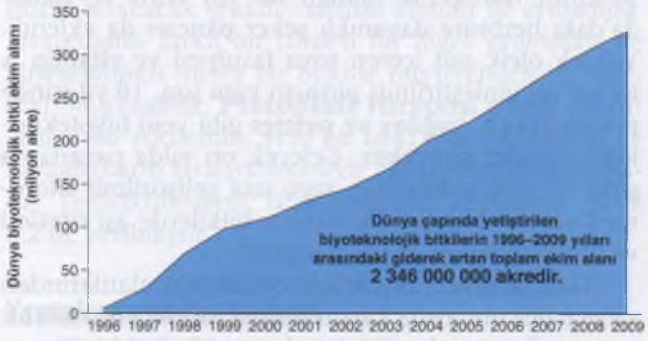
Bu bölümde, biyoteknolojinin tarımdaki etkileri değerlendirilecektir. İlk olarak, biyoteknolojik araştırma ve geliştirmeyi yönlendiren konuları açıklığa kavuşturmak için sanayiyi inceleyeceğiz. Daha sonra biyomühendislik ile bitkileri hastalıklardan koruyabilmek, pestisitlere ihtiyacı azaltabilmek ve gıdaların besin kalitesini artırabilmek için gen aktarımında kullanılan yöntemlere daha yakından bakacağız. Ayrıca, farmasötikten petrol kökenli alternatiflere kadar, bitki kökenli biyoteknolojik ürünlerin geleceği incelenecektir. Son olarak, bitki biyoteknolojisi ile ilgili çevresel ve sağlık konularındaki endişeler açıklanacaktır.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Bitkilere gen transferinin, gelecek nesillerin gıda ve enerji ihtiyacını karşılamak için güvenilir bir yöntem olduğu kesin olarak kanıtlanmıştır. Uluslararası Tarımsal Biyoteknoloji Uygulamaları için Uyum Servisi (ISAAA)'ne göre, şu anda 25 ülkedeki 14 milyon çiftçi genetik mühendisliği (GM) bitkilerinden yararlanmaktadır. Ancak, yeni bitkilerin pazara girişinde bazı kısıtlamalar vardır ve bu uygulama çok az bitkide yapılabilmiştir. Bu kısıtlamalar transgenik bitkilerin mevcut patentlerinin çoğunun sadece Syngenta, Monsanto ve DuPont adlı üç şirkette olmasından kaynaklanmaktadır. Bu şirketlerin yüksek telif ücretleri ve kısıtlamaları, geliştirilen bitkilerin maliyetini pek çok çiftçi ve araştırıcı açısından ulaşılamaz kılmaktadır. Bu durum, Tarımda Kamu Fikri Mülkiyet Araştırmaları (PIPRA) gibi kâr amacı gütmeyen araştırma gruplarını da kapsayan, bazı biyoteknoloji şirketlerinin kendi yeni gen transferi yöntemlerini geliştirmelerinin yolunu açmıştır. ABD Tarım Bakanlığı, Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Servisi (APHIS) de buna yardımcı olmaktadır. APHIS tarla denemeleri ile uyumluluğu artırmak için bir pilot program başlatmış ve yeni kurulan Biyoteknoloji Kalite Yönetim Servisi (BQMS) aracılığıyla şirketleri sertifikalandırarak, tasarım ürünü organizmaların hareketini sınırlandırmıştır. BQMS sertifikasına hak kazanan bir şirket, transgenik bitkilerin tarladaki verimliliğini test ederek ve ürünlerinin güvenirliliği, ekonomik oluşu ve kamunun ihtiyacına yönelik olduğuna odaklanarak, genetiği değiştirilmiş bitkilerin pazarlanması ile ilgili masraflı engellerin pek çoğunun üstesinden gelebilir. Bitki biyoteknolojisinin geleceği, GM bitkilerinin üretim maliyetinin düşürülmesi ve yeni bitkilerin tüketici algısının geliştirilmesi ile daha parlak olacaktır.

6.1 Tarımın Geleceği: Transgenik Bitkiler

Son kırk yılı aşkın süredir tarıma uygun arazi miktarındaki % 10'luk bir azalmaya karşın dünya nüfusu yaklaşık iki katına ulaşmıştır. Halen göreceli olarak bereketli bir dünyada yaşıyoruz. Gerçekte son kırk yılda kişi başına düşen dünya gıda üretimi % 25 artmıştır. Ancak, bu kadar çok insanı sadece mevcut alandaki marjinal bir artışla beslemek mümkün olabilir mi? Verimin artırılmasının büyük bir kısmı, yüzyıllarca önce geliştirilen hayvan ve bitkilere belli özelliklerin kazandırıldığı melezleme ıslahı yöntemlerine bağlıdır. Ancak son yıllarda yeni ve daha verimli bitkilerin geliştirilmesi **Şekil 6.1**'de gösterilen genlerin doğrudan aktarımı ile hızlandırılmıştır.



ŞEKİL 6.1. 2009'da Yetiştirilen Biyoteknolojik Bitkilerin Toplam Ekim Alanı 1996 ve 2009 yılları arasında, 0.9 milyar hektardan (2.3 milyar akre – 1 akre = 0. 4 ha) daha fazla alanda, biyotek bitkileri bu bitkileri eken çiftçiler tarafından yaklaşık 70 milyon kez tekrarlanan kararlarının bir sonucu olarak başarılı bir şekilde yetiştirilmiştir. 2009'da biyoteknolojik bitkileri yetiştiren 14 milyon çiftçinin neredeyse % 93'ü (13 milyon) küçük, olanakları kısıtlı ve Çin, Hindistan, Filipinler ve Güney Afrika gibi gelişmekte olan ülkelerde yaşayan ve çalışan insanlardı. Yetiştirilen biyoteknolojik bitkilerin toplam ekim alanı bakımından % 60'ı gelişmekte olan ülkelerde iken, % 40'ı gelişmiş ülkelerdedir. Şekilde kullanılan değerlerin sağlandığı en son yıl 2009'dur.

Bitki transgenetiği (bitkilere doğrudan gen transferi), klasik melezleme yöntemleri ile yapılması mümkün olmayan değişikliklere olanak tanır. Kendi pestisitlerini üreten, herbisitlere dayanıklı ve hatta bitki aşısı ve biyoyakıt gibi biyoürünler üreten bitkiler ticari olarak önemli potansiyeli olan gelişmelerden birkaç tanesidir. Transgenik bitkilerde protein üretimi kısmen kolay olduğu için ve proteinlerin kalitesinin oldukça iyi olmasından ötürü gelecekteki çalışmalar ve bu alandaki gelişmeler için beklentiler oldukça parlak görünmektedir. Örneğin, klasik ıslah aracılığıyla pamuk liflerinin dayanıklılığı yılda yaklaşık % 1.5 oranında düzenli olarak arttırılmıştır. Biyoteknoloji bu oranı önemli ölçüde hızlandırmıştır. Yaygın bir yayla pamuk çeşidinin dayanıklılığı tek bir genin eklenmesiyle % 60 arttırılmıştır.

Transgenik bitkilerin dünya tarımındaki yaygınlığı artmaktadır. Bu bitkiler 2005'te yaklaşık 400 milyon hektar ekilmekte iken, sadece 2 yıl sonra, 2007'de 800 milyon hektar ekildi. Transgenik devrim ABD'de başlamasına ve diğer gelişmiş devletler ile ABD hala pazara hakim olmasına karşın, son yıllarda diğer ülkeler de transgenik bitkileri ekmeye başlamışlardır. 2008'de % 90'ı gelişmiş ülkeleri kapsayan 25 ülkedeki 13.3 milyon çiftçi transgenik bitki yetiştirdi. Ancak sadece bir yıl sonra, 2009'da dünya çiftçileri soyanın 70 milyon hektarını (toplam ekili alanın % 70'i), mısırın 16 milyon hektarını (toplam ekili alanın % 40'ı), pamuğun 10 milyon hektarını (toplam ekili alanın % 10'u) ve kanolanın 6 milyon hektarını (toplam ekili alanın % 5'i) transgenik olarak ekmişlerdir. Bu başlıca bitkilere, 2009'da (pancar bitkilerinin % 59'unun transgenik olduğu ilk yıl) ABD ve Kanada'daki herbisite dayanıklı şeker pancarı da eklendi. Yüksek oleik asit içeren soya fasulyesi ve vitamin A içeriği zenginleştirilmiş pirincin yanı sıra, 10 yıl içinde pazara yonca, buğday ve patates gibi yeni biyoteknolojik ürünler girecektir. Gelecek on yılda pazarlarda gıda ve yem bitkilerinin yanı sıra geliştirilmiş fitoremediyasyon bitkileri ile birlikte bitkilerde aşı üretimi ve biyoplastiklere de ulaşılacaktır.

Gıda ürünleri biyoteknolojinin etki alanlarından sadece biri olmasına karşın dünya çapında önemli bir tartışma konusudur. Bir yandan, açlık (kıtlık) dünyanın çoğunda bela olmaya devam etmektedir. Bu gerçek daha verimli ve besleyici bitkilerin hızlı bir şekilde geliştirilmesi için zorlayıcı bir tartışmadır. Öte yandan bazı sektörler denemelerin insan sağlığı ve çevre açısından zararlı olabileceğini düşünmektedir.

Tartışma bu kadarla sınırlı değildir. Bilinçli bir görüş geliştirmek için karar mercileri biyoteknoloji araştırmaları çerçevesinde var olan düzenlemeler hakkında bilgili olmalı, ürünleri kendileri analiz etmeli ve bu yeni ürünlerin arkasındaki bilimi anlamalıdırlar. Her durumda tarımsal biyoteknoloji devriminin durdurulması mümkün değildir. İtirazlar olsun ya da olmasın, biyoteknolojik bitkisel ürünler toplumda anahtar bir rol oynayacaktır. Gelecek bölümde yeni tarımsal ürünler üretmek için kullanılan yöntemler anlatılacaktır.

6.2 Bitki Transgenetiğinde Kullanılan Yöntemler

Bitkilerde genetik manipülasyon yeni değildir. Tarımın doğuşundan itibaren çiftçiler arzu edilen özellikleri taşıyan bitkileri seçmişlerdir. O zamandan beri dünyanın artan tarımsal ürün ihtiyacını karşılamak için teknolojiler geliştirilmektedir.

Klasik Seleksiyon Islahı ve Melezleme

Melezleme ıslahı bin yıldır bitkileri geliştirmede (daha uzun koçanlı mısır, daha sulu elmalar, kültüre alınmış diğer pek çok bitki) kullanılmasına rağmen, klasik bitki ıslahı yöntemleri yavaş ve sonuçları belirsizdir. İstenen özelliklere sahip bir bitki geliştirmek için iki farklı bitki hattı arasındaki eşeyli çaprazlamayı ve hibrit bitkilerin yavruları ile orjinal ebeveyn bitkilerden birisi arasındaki tekrarlanan geri melezlemeyi kolaylaştırmayı gerektirmektedir. Bu şartlarda istenen bir özelliği aktarmak yıllar sürebilir. Örneğin Luther Burbank'ın beyaz böğürtleni geliştirmesi 65 000 başarısız melezlemeyi içermektedir. Gerçekte farklı türden bitkiler genellikle melezlenmez, dolayısıyla genetik bir karakter bir bitki türünde bulunmadıkça saflaştırılamaz ve izole edilemez.

Bitkilerin melezlenmesi ile gen transferi istenen özellikli bitki üretmek için tek geleneksel yol değildir. **Poliploid** (normalden daha fazla, çoklu kromozom setleri, genellikle 2n'den veya her bir ebeveynden bir kromozom setinden daha fazla) bitkiler uzun yıllar boyunca karpuz, tatlı patates, muz, çilek ve buğday gibi bitkileri kapsayan pek çok bitkinin istenen özelliklerinin (özellikle büyüklük, boyut) geliştirilmesi için kullanılmıştır. Melezlemeleri izleyen kolkisin kullanımı potansiyel olarak kültür bitkilerine akraba yeni türlerin önemli ticari özelliklerini aktarmak için bir araçtır (**Şekil 6.2**). Bu işlem, melez bitkilere akraba bitkilerden tek bir genden ziyade tüm kromozom setlerinin transfer edilebilmesiyle sonuçlanır. İlave kromozomlar çoğu kez doğal yabani çeşitlerden çok daha büyük meyve ve sebze üreten bitkileri ortaya çıkarır.



ŞEKİL 6.2. Protoplast Füzyonu ve Melez Bitki Rejenerasyonu Bir bitki yaprağını parçalara ayırdıktan sonra, selüloz enzimi ile hücre duvarının parçalanmasıyla protoplastların üretilmesi mümkündür. Melez bir bitki üretmek için, sürgün (sitokinin) ve kök (oksin) gelişimini teşvik eden steril bir ortamda kültüre alarak farklı bitkilerin protoplastları birleştirilir.

Klonlama: Tek Hücreden Bitki Üretimi

Bitki hücreleri pek çok açıdan hayvan hücrelerinden farklıdır. Ancak bitki hücrelerinin birçok özelliği biyoteknoloji için özellikle çok önemlidir; pek çok bitki türünde tek bir hücreden yeniden bir bitki üretilebilir (rejenerasyon). Sonuçta oluşan bitki ebeveyn hücrenin bir genetik kopyası ya da klonudur. Tabiî ki hayvanlar da klonlanabilir, ancak bu işlem daha karmaşıktır (hayvan klonlaması 7. Bölüm'de ayrıntılarıyla verilmiştir). Bitki hücrelerinin bu doğal yeteneği onları genetik araştırmalar için ideal kılmaktadır. Yeni genetik materyal bir bitki hücresine girdikten sonra, hücre hızlı bir şekilde olgun bir bitki üretir ve araştırıcı genetik modifikasyonun sonucunu oldukça kısa bir sürede görebilir. Daha sonraki konularda bitki hücrelerine genetik bilgi aktarımında kullanılan bazı yöntemlere değinilecektir.

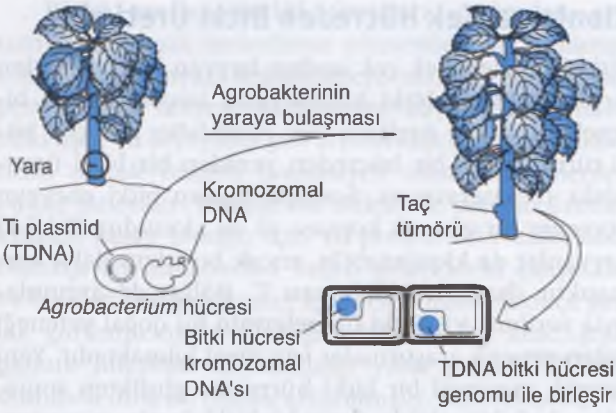
Protoplast füzyonu

Bir bitki yaralandığında, yaranın etrafında **kallus** adlı bir hücre kitlesi gelişir. Kallus hücreleri tekrar sürgün ve kök haline farklılaşabilme ve tam bir çiçekli bitki üretebilme yeteneğine sahiptir. Sevdiğiniz bir ev bitkisinin kesilip köklendirilmesiyle klonlanması bitkilerin bu yeteneğinden kaynaklanmaktadır.

Bu hücrelerin tekrar programlanabilme doğal potansiyelleri onları genetik manipülasyon için ideal adaylar yapmaktadır. Ancak kallus da, herhangi bir bitki hücresi gibi, yeni DNA'nın alımını engelleyen bir bariyer olan kalın bir selüloz duvarı ile çevrilidir. Neyse ki hücre duvarı, **protoplast** adlı soyulmuş bir hücre bırakacak şekilde, selülaz enzimi ile eritilebilir. Protoplastın farklı bir türden bir diğer protoplast ile birleşebilmesi melez bir bitkide büyüyebilen bir hücreyi oluşturabilir. **Protoplast füzyonu** olarak adlandırılan bu yöntemin, yeni bir bitki olan ve brokoli ile karnabaharın birleştirilmesiyle geliştirilen brokobaharın (brocccoflower) üretilmesinde kullanımı Şekil 6.2'de verilmiştir.

Yaprak parçalama tekniği

Genetik aktarım bitkilerde bazı patojenik organizmalara tepki olarak doğal bir şekilde gerçekleşir. Örneğin, bir yara *Agrobacterium tumefaciens* (son yıllarda genom analizlerinde *Rhizobium radiobacter* olarak tekrar sınıflandırılmıştır. Ancak hala yaygın olarak kullanımı bizim de kullandığımız, *Agrobacter* adıdır) adlı bir toprak bakterisi tarafından enfekte edilebilir. Bu bakteri, bitkilerde kontrol edilemeyen bir hücre büyümesine (tümör) neden olan, *plazmid* olarak adlandırılan büyük bir halkasal çift iplikçikli DNA molekülüne sahiptir. Bu nedenle bu plazmid **tümör indükleyici (Ti) plazmid** olarak bilinir. Sonuçta ortaya çıkan tümör **taç tümörü** olarak adlandırılır. Eğer herhangi bir



ŞEKİL 6.3. Taç Tümörünün Oluşumu *Agrobacter* Ti plazmidi hassas bitkilerde "taç tümörlerine" neden olmaktadır. Genetik mühendisliği aracılığıyla tümöre neden olan genleri susturmak ve gen transferi için bir vektör oluşturarak istenen genleri plazmide yerleştirmek mümkündür.

ağaçta ya da gül çalısında şişkin bir kısım görmüşseniz, *Agrobacterium*'un etkilerini görmüşsünüz demektir (bakınız **Şekil 6.3**).

Bakteriye ait plazmid biyoteknologlara DNA transferi için ideal bir araç sunmaktadır. Araştırıcılar bu aracı kullanmak için çoğunlukla **yaprak parçalama tekniğini** kullanırlar. Bu yöntemde bir yaprak küçük parçalara ayrılır. Bu parçacıklar rejenerasyona başladığında, **Şekil 6.4**'te gösterildiği gibi, genetik olarak değiştirilmiş *Agrobacter* içeren bir ortamda kısa süreliğine kültüre alınır. Bu sırada Ti plazmid DNA'sı konukçu hücre DNA'sı ile birleşir ve genetik yükleme yapılır. Daha sonra, yeni bitkiler toprağa ekilmeden önce, yaprak parçacıkları sürgün ve kök gelişimini teşvik eden bitki hormonları ile muamele edilir.

Bu işlemin temel sınırlayıcı faktörü *Agrobacter*'in mısır ve buğday gibi **monokotiledon** bitkileri (tek bir tohum embriyosundan gelişen) enfekte edememesidir. Domates, patates, elma ve soya fasulyesi gibi **dikotiledon** bitkilerin (iki tohum yarımından gelişen) tümü bu işlem için iyi adaylardır.

Gen Tabancaları

Araştırıcılar mikrobiyal bir araca bel bağlamak yerine, **Şekil 6.5**'de gösterildiği gibi, DNA ile kaplanmış küçük metal boncukları bir embriyonik bitki hücresinin içine aktarmak için **gen tabancası** kullanabilirler. Bu işlemde isabet olur ya da olmaz – hatta ortalığı biraz dağıtsa da – ancak bitki hücrelerinin bazıları yeni DNA'yı kabul edecektir.

Gen tabancaları genelde bir bitki hücresi çekirdeğindeki DNA'ya ateş etmek için kullanılır, ancak klorofil içeren hücre parçası olan **kloroplastlar** da vurulabilir. Bitkiler hücre başına yaklaşık 10-100 kloroplast içerir ve her bir kloroplast kendi DNA'sına sahiptir. Araştırıcılar ister çekirdek ister kloroplastı hedef alsın-

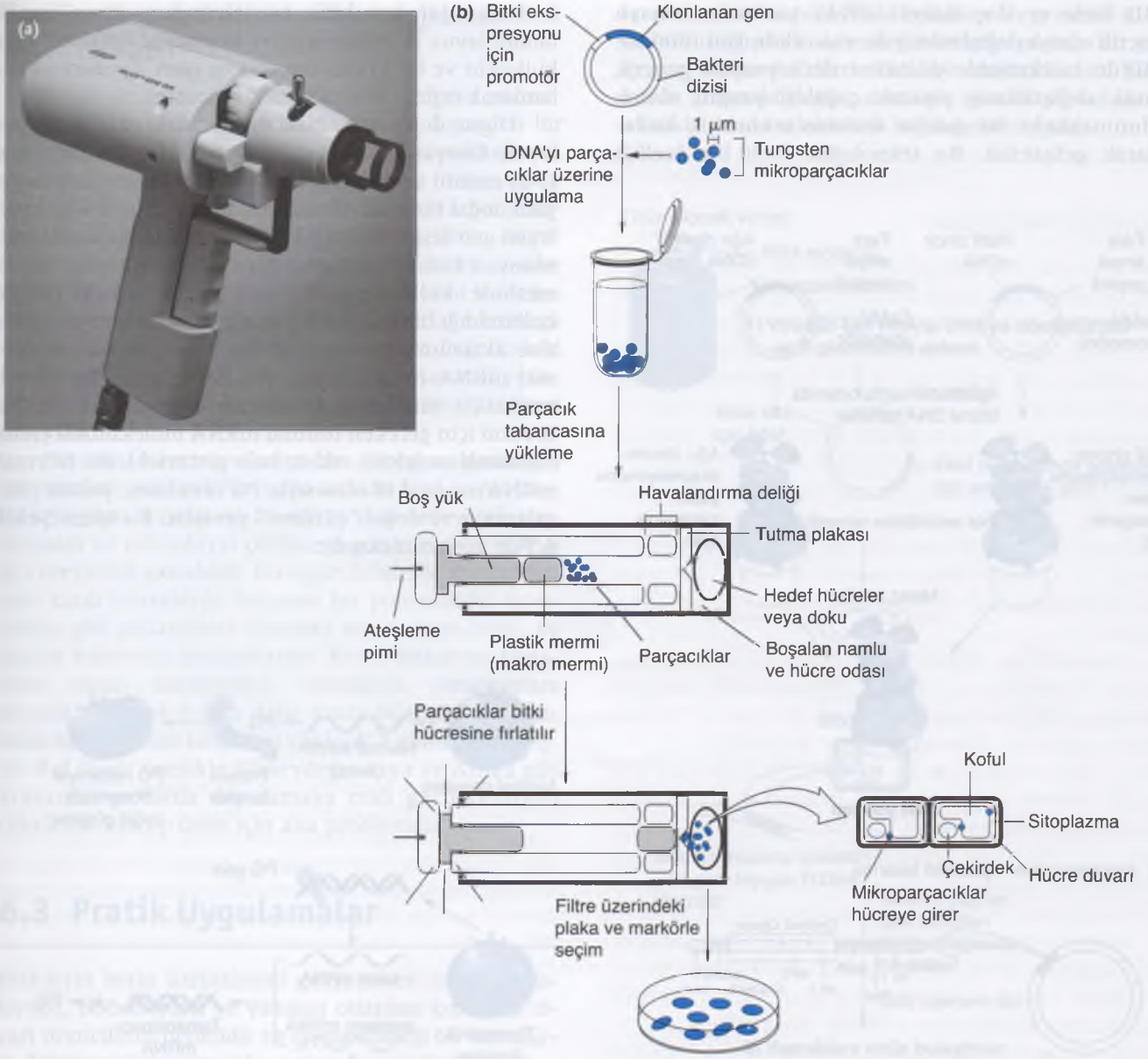


ŞEKİL 6.4. Genetik Olarak Değiştirilmiş Ti Plazmidlerin Doku Kültürü Aracılığıyla Hassas Bitkilere Aktarımı

lar, yeni DNA'nın aktarıldığı hücreleri diğerlerinden ayırabilmelidirler. Bu konuda genel bir yaklaşım; aktarım olan hücrelerde belli antibiyotiklere dayanıklılık sağlayacak bir geni asıl aktarılacak gen ile birlikte hücreye vermektir. Bu gen **markör gen** ya da raportör gen olarak adlandırılır. Gen tabancası ateşlendikten sonra, araştırıcılar hücreleri toplar ve onları belli bir antibiyotik içeren bir ortamda yetiştirmeye çalışır. Sadece genetik olarak değiştirilmiş hücreler yaşayacaktır. Eğer araştırıcı isterse, hücreleri olgun bitkilerde üretmeden önce antibiyotiğe dayanıklılık genini uzaklaştırabilir (gen markörleri hakkında daha ayrıntılı açıklamalar için 5. Bölüm'e bakınız).

Kloroplast mühendisliği

Kloroplast biyomühendisler için cazip bir hedef olabilir. Çekirdek DNA'sınm aksine bir kloroplast DNA'sı



ŞEKİL 6.5. Gen Tabancaları (a) Gen tabancalarının mermileri 1 mikro metre çapındaki tungsten boncuklardır. (b) Boncukların yüzeyi DNA ile kaplanır ve saniyede 430 metre hızla ateşlenir. Embriyonik hücreler, sağlam yapraklar ve yumuşak tohum taneleri süspansiyonları hedeflenebilir.

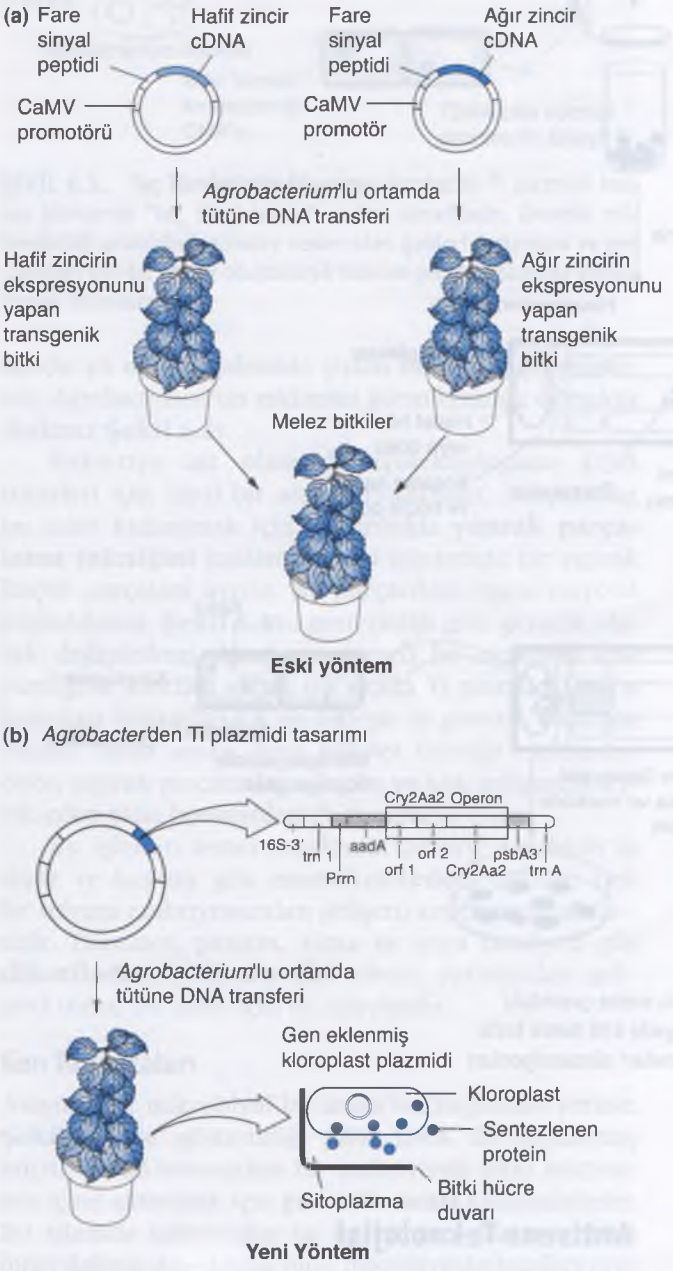
tek seferde bir kaç yeni geni kabul edebilir. Ayrıca kloroplasta eklenen genlerin büyük bir çoğunluğu bitki olgunlaştığında aktif kalacaktır. Bir diğer avantajı da kloroplasttaki DNA'nın bir bitki poleninde serbest bırakılan DNA'dan tamamen ayrı olmasıdır. Kloroplastlar genetik olarak değiştirilirse transfer edilen genlerin uzaktaki bitkilere rüzgârla taşınma olasılığı yoktur. Bu işlem **Şekil 6.6**'da gösterilmiştir.

Antisens Teknolojisi

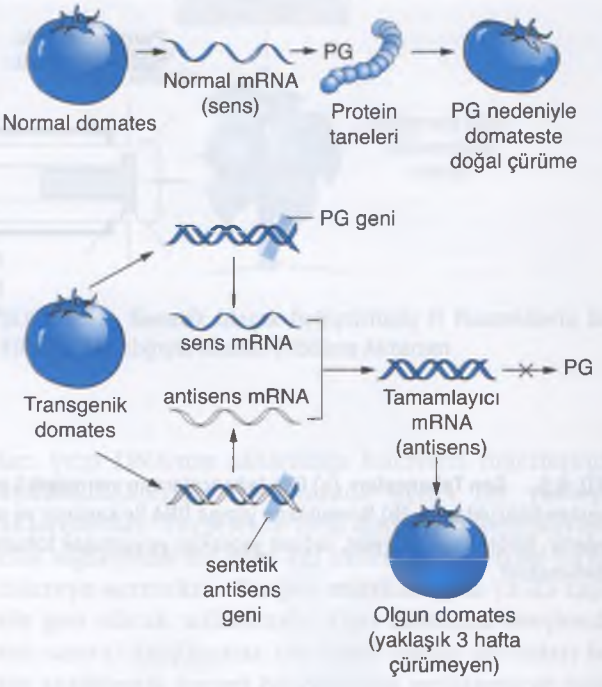
Domatesi anımsayalım. Kırmızı, sulu, tatlı ve son derece dayanıksızdır. Çoğu domates olgun halde toplandığında kısa zamanda ezmeye dönüşecektir. Fakat yıllar süren denemelerden sonra, 1994'de geliştirilen Flavr Savr domatesi olgun ve taze halde haftalarca kalabilmektedir. Flavr Savr domatesi artık kullanılmamasına ve ekonomik bir başarı olmamasına rağmen,

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından onaylı genetik olarak değiştirilmiş ilk yiyecektir. Günümüzde ABD'de marketlerde domatesi de kapsayan genetik olarak değiştirilmiş yiyecek çeşitleri yaygın olarak bulunmaktadır. Bu gıdalar antisens teknolojisi kullanılarak geliştirildi. Bu teknolojide belli bir özelliği kodlayan bir gen bitki hücrelerinden alınır, kendi tamamlayıcı (komplementer) kopyasını üretmek için kullanılır ve bir vektör organizma olan *Agrobacter* kullanılarak orjinal hücreye tekrar aktarılır.

Olgun domatesler bitki duvarındaki pektini parçalayan kimyasal bir madde olan **poligalakturonaz** (PG) enzimi üretirler. Bu parçalama olağan çürümeye yani doğal bir bitki döngüsüne neden olur. PG'yi kodlayan gen tespit edilmiş, bitki hücrelerinden uzaklaştırılmış ve kendisinin tamamlayıcı bir kopyasının üretilmesinde kullanılmıştır. *Agrobacter*'in vektör olarak kullanıldığı bir uygulamayla bu gen domates hücrelerine aktarılmıştır. Gen hücreye girdikten sonra, normal mRNA (tamamlayıcı dizi) ile eşleşen bir mRNA molekülü (**antisens molekül**) kodlamakta ve PG üretimi için gereken normal mRNA molekülünü (sens - anlamlı molekül) etkisiz hale getirmektedir. Normal mRNA'nın inaktif olmasıyla PG üretilmez, pektin parçalanmaz ve doğal "çürüme" yavaşlar. Bu işlem **Şekil 6.7**'de gösterilmektedir.



ŞEKİL 6.6. Bitkilerde Çoklu Genlerin Klonlanmasında Eski ve Yeni Yöntemlerin Karşılaştırılması Geçmişte, birden fazla gen ekspresyonu için her biri kendi ekli genini içeren iki bitkinin üretilmesi gerekiyordu. (a) Hibrit bitki üretimi için polen aktarımıyla standart melezleme gerekliydi. (b) Şu anda, kloroplast DNA'sı içine birden fazla genin eklenmesi mümkündür.



ŞEKİL 6.7. İlk Ticari Transgenik Bitki Ürünlerinden Biri Poligalakturonazı kodlayan genin ilk kez izole edilmesiyle yavaş bir şekilde çürüyen domatesler üretildi. Bu gen PG translasyonu için normal (sens) mRNA'yı kodlar. Bir cDNA (komplementer DNA) üretimi sağlandıktan sonra, PG'yi domatese aktarmak için bir vektöre yerleştirmek mümkündür (bakınız Bölüm 3). Yeni dizinin eklendiği transgenik bitkiler PG mRNA'yı ve PG'nin üretimini engelleyen antisens mRNA'yı üreteceklerdir. Bunun gerçekleşmesi çürüme işlemini yavaşlatır ve olgunlaştıktan sonra yaklaşık 3 hafta sağlam kalan bir domates üretilmiş olur.

Gen Susturma: Antisens Teknolojisine Bir Alternatif

Gelecekte gen susturmada daha çok ilerleme görmeyi umabiliriz. Araştırıcılar yaralanmaya dayanıklı bir patates üzerinde çalışıyorlar. Kabuğu soyulduğunda renk değişimini teşvik eden bir enzimin üretiminden sorumlu bir geni uzaklaştırdılar. Bu ustaca bir gelişmeydi, ancak pazar araştırmaları tüketicilerin dokunulmayla ezilmeyen patatesi tercih ettiklerini göstermektedir. Araştırıcılar ayrıca tavuk genlerini kullanarak patates gibi bitkilerin protein içeriklerini artırmaya da çalışıyorlar. Temel bir yiyeceğin besin değerindeki bu gelişme dünya çapındaki pek çok insanın diyetlerinde ihtiyaç duydukları proteini almalarına yardımcı olacaktır.

Purdue Üniversitesi'nden bir araştırıcı domatesin raf ömrünü yaklaşık bir hafta uzatan bir tazelik kaynağı keşfetti. Domatese bir maya geni ekleyerek yaşlanmayı ve mikrobiyal çürümeyi geciktiren bir bileşiğin üretimini artırabildi. Bu organik bileşik, spermidin, tüm canlı hücrelerde bulunan bir poliamindir. Spermidin gibi poliaminler domates meyvesinin besin ve işleme kalitesini artırmaktadır. Böyle bitkilerin tamamen olgun domatesleri, transgenik olmayanlara kıyasla, yaklaşık 8 gün daha sonra büzüşür. Mantarlarla ilgili çürüme belirtileri yaklaşık 3 gün ertelenmiştir. Raf ömrü özellikle Güneydoğu Asya ve Afrika gibi kontrollü şartlarda depolamaya mali gücü olmayan ülkelerde her tip ürün için ana problemdir.

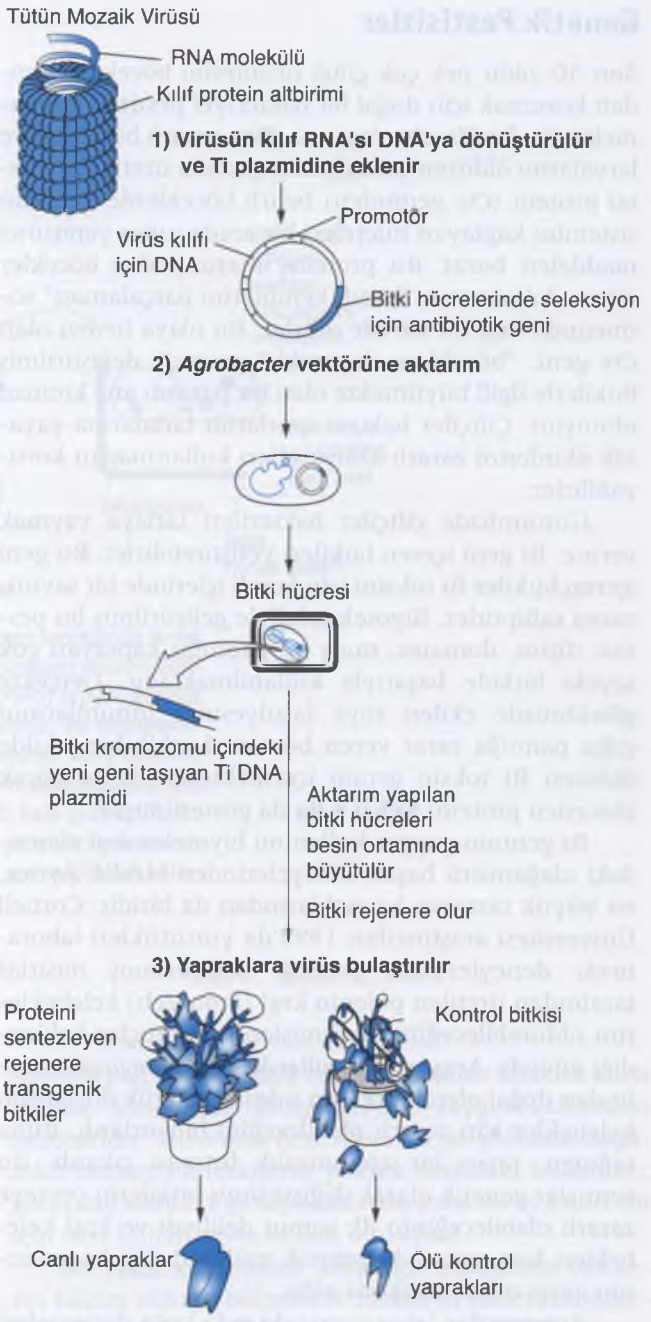
6.3 Pratik Uygulamalar

Bitkilerin besin özelliklerini geliştirirken onları virüslerden, böceklerden ve yabancı otlardan korumak ticari üreticilerin hedefidir ve biyoteknoloji bu konularda birtakım ilginç örnekler ortaya koymaktadır.

Bitkiler İçin Aşılar

Bitkiler çok çeşitli bitki virüslerine karşı savunmasızdırlar. Enfeksiyonlar büyüme oranında azalmaya, bitki veriminde düşüşe ve düşük tane kalitesine neden olabilir. Çiftçiler hastalıklara karşı bitkinin doğal savunma mekanizmasını aşılarla harekete geçirerek ürünlerini koruyabilirler. Tıpkı bir insan aşısı olan çocuk felci örneğindeki gibi, ölü ya da zayıflatılmış bitki virüsü suşlarını içeren bitki aşıları, bitkilerdeki bağışıklık sistemini harekete geçirerek, onları gerçek virüslere dayanıklı yapabilir.

Bütün bir alanı aşılamak kolay değildir, fakat artık gerekli de değildir. Aşıyı enjekte etmek yerine bir bitki DNA'sında kodlanması sağlanabilir. Örneğin, araştırıcılar son yıllarda tütün mozaik virüsü (TMV)'nün bir genini tütün bitkisine aktarmışlardır. Bu gen, tıpkı bir aşı gibi, virüsün yüzeyinde bulunan bir proteini üretir ve bitki bağışıklık sistemini harekete geçirir. Bu geni içeren tütün bitkileri TMV'ye dayanıklıdır. Şekil 6.8'de gösterildiği gibi, domates mozaik virüsü de bu teknikle durdurulabilecek biçimde benzerdir.



ŞEKİL 6.8. Bitki Aşıları TMV kılıf proteinini (CP) sentezleyen transgenik bitkiler *Agrobacterium* aracılı gen transferiyle üretildi. Viral CP ekspresyonunu yapan bitkiler çoğaltılıp TMV ile enfekte edildiğinde, enfeksiyona dayanıklılığın arttığı belirlendi. Kontrol bitkilerinde belirtiler 3-4 gün içinde geliştiği halde, CP ekspresyonunu yapan transgenik bitkiler enfeksiyona 30 gün dayanmıştır.

Genetik aşılar çok çeşitli bitkilerde zaten denenmektedir. Hastalıklara dayanıklı bitkilerin geliştirilmesi Havai'deki papaya endüstrisini yeniden canlandırmıştır. Ayrıca hastalık ve zararlılara dayanıklı patates çeşitleri hem yetiştirici hem de tüketicilere çok sayıda avantaj sunmaktadır.

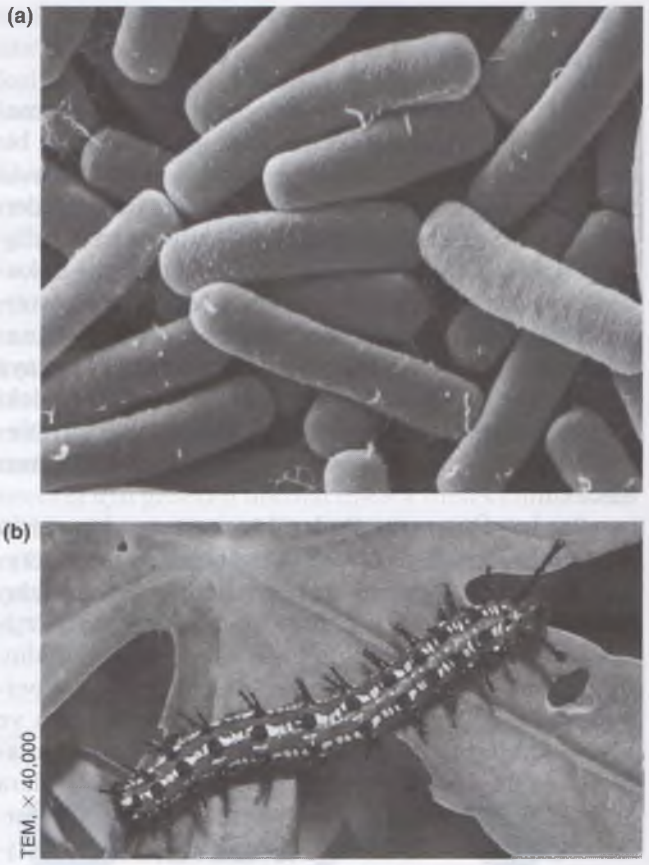
Genetik Pestisitler

Son 50 yıldır pek çok çiftçi ürünlerini böcek zararından korumak için doğal bir bakteriyel pestisite güvenmektedir. *Bacillus thuringiensis* **(Bt)**, zararlı böcekleri ve larvalarını öldüren kristalize bir protein üretir. Bu kristal protein (*Cry* geninden) belirli böceklerde sindirim sistemini kaplayan hücreleri bir arada tutan yapıştırıcı maddeleri bozar. Bu proteine maruz kalan böcekler vücut dokularının "kendi kendilerini parçalaması" sonucunda kısa bir sürede ölürler. Bu olaya neden olan *Cry* geni, "böceklere dayanıklı" genetiği değiştirilmiş bitkilerle ilgili büyümekte olan bir pazarın ana konusu olmuştur. Çiftçiler bakteri sporlarını tarlalarına yayarak ekinlerini zararlı kimyasalları kullanmadan koruyabilirler.

Günümüzde çiftçiler bakterileri tarlaya yaymak yerine, Bt geni içeren bitkileri yetiştirebilirler. Bu geni içeren bitkiler Bt toksini için kendi içlerinde bir savunmaya sahiptirler. Biyoteknolojiyle geliştirilmiş bu pestisit tütün, domates, mısır ve pamuğu kapsayan çok sayıda bitkide başarıyla kullanılmaktadır. Gerçekte günümüzde ekilen soya fasulyesinin tohumlarının çoğu pamuğa zarar veren böcekleri etkili bir şekilde öldüren Bt toksin genini içermektedir. Bt ve böcek öldürücü proteini **Şekil 6.9a**'da gösterilmiştir.

Bt geninin yaygın kullanımı biyoteknoloji alanındaki olağanüstü başarı hikâyelerinden biridir. Ayrıca, en büyük tartışma kaynaklarından da biridir. Cornell Üniversitesi araştırıcıları 1999'da yürüttükleri laboratuvar deneylerinde, genetiği değiştirilmiş mısırlar tarafından üretilen polenin kral (monarch) kelebeklerini öldürebileceğini bildirmişlerdir. Sonuçlar beklendiği gibiydi. Araştırıcılar yıllardır *B. thuringiensis* tarafından doğal olarak üretilen toksinin büyük dozlarının kelebekler için zararlı olabileceğini biliyorlardı. Buna rağmen, rapor bir anlaşmazlık fırtınası çıkardı. Bu sonuçlar genetik olarak değiştirilmiş bitkilerin çevreye zararlı olabileceğinin ilk somut deliliydi ve kral kelebekleri kısa zamanda genetik mühendisliği karşıtlarının gayri resmi maskotu oldu.

Araştırıcılar laboratuvar dışında tarla denemeleri yaptıklarında kaygılarının çoğu hızla kayboldu. Bazı araştırıcılar gerçek dünyada çok az kelebeğin herhangi bir zarara neden olabilecek dozda polene maruz kaldığını buldular. Gerçekte, kelebekler genetik olarak değiştirilmiş mısır tarlasından bir metreden daha az uzaklıktaki bitkilerle beslenseler bile toksik

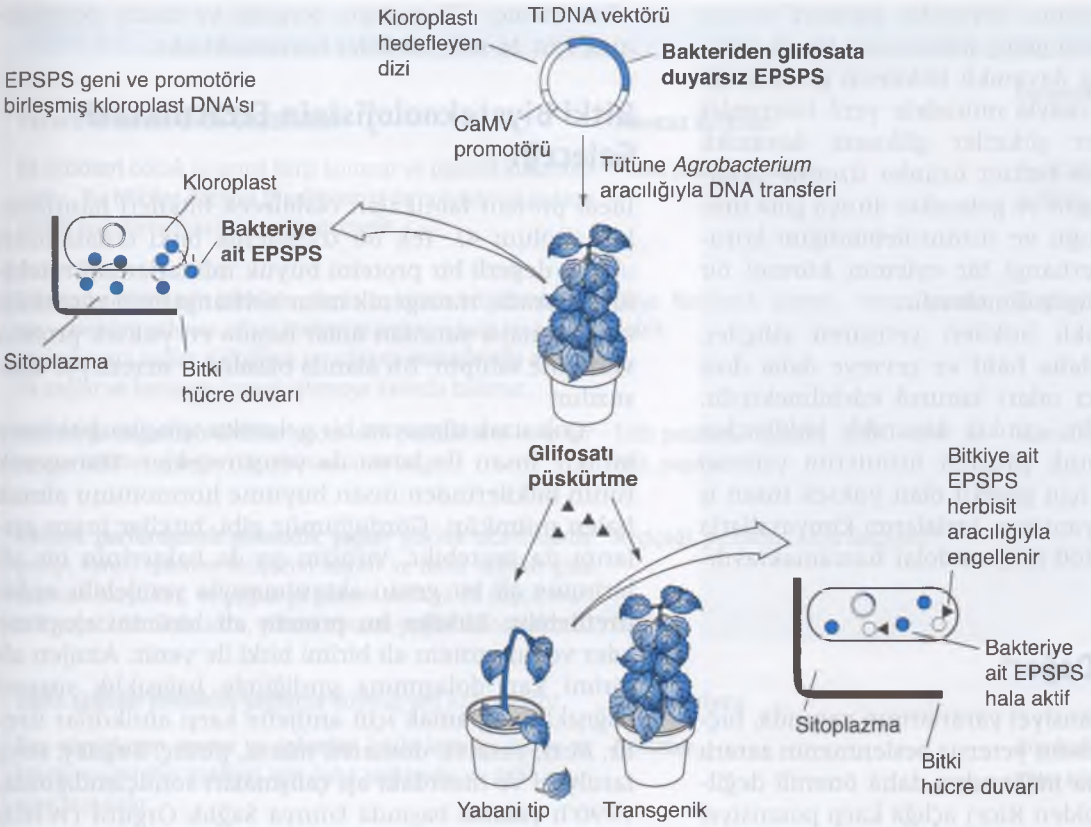


ŞEKİL 6.9. Bt ve Böcek Öldürücü Kristal Proteini Şekil (a) *Bacillus thuringiensis* bakterisi içinde bir kristal olan kristalin proteinini göstermektedir. *Cry* genini eksprese eden genetiği değiştirilmiş bitkiler bu bakteriyel proteinin küçük bir miktarının üretimi sayesinde böceklere dayanıklıdır. Normalde bitki dokularıyla beslenen böcek larvaları (b) eğer kristalin proteinini (*Cry* geni ürünü) tüketirlerse öleceklerdir.

miktarda polen yemeleri mümkün değildir. Yine de bilim insanları kaçınılmaz olarak, az sayıda kelebeğin öldürücü polen miktarını alacağını düşünmektedir. Kelebeklerin bazıları bu polenlere maruz kaldıktan sonra uzun göçler için güçsüz olacaktır. Ancak, genetiği değiştirilmiş mısırın kelebekleri öldürdüğü ile ilgili endişelerin aksi ispatlanmış görülüyor. Tarımsal Araştırma Servisi (USDA'nın bir bölümü) iki yıllık çalışmadan sonra 2002'de gerçek dünya koşullarında Bt toksininin kral kelebekler için küçük bir risk yarattığını bildirmiştir.

Herbisit Dayanıklılığı

Geleneksel ot öldürücülerin temel bir kusuru vardır. Genellikle yabancı otlarla birlikte istenen bitkileri de



ŞEKİL 6.10. Herbisite Dayanıklı Bitkilerin Tasarımı Glifosat bitki protein sentezinde temel bir enzimi engelleyen bir bileşendir. Bu bileşeni içeren spreylerin (örn., Roundup) püskürtüldüğü bitkiler temel bir enzim bloke edildiği için ölürler. Alternatif bir geni (*EPSPS*) taşıyan genetik olarak değiştirilmiş bitkiler, alternatif bir kimyasal yolu kullanan bir enzimle, bu engellemeyi aşabilirler. *EPSPS* genini (bakteriden) taşıyan TDNA vektörünün (Agrobacter'den) bitkilere aktarımı ve promotörün aktifleştirilmesi (kloroplastı hedefleyen bir dizinin yardımıyla), *EPSPS* geninin bitkide eksprese edilmesini sağlayarak, onları glifosata dayanıklı hale getirebilir. Bu işlem pek çok ticari bitki çeşidini herbisite dayanıklı yapmada kullanılır ve yetiştiricilerin hassas yabancı otları ve dayanıklı bitkileri ilaçlamasına (daha zararlı herbisitler yerine glifosat kullanarak) olanak tanır.

öldürürler. Günümüzde, biyoteknoloji çiftçilerin geçimlerini tehdit etmeden herbisit kullanımına olanak sağlamaktadır. Bitkiler genetik mühendisliği ile **glifosat** gibi yaygın herbisitlere dayanıklı hale getirilebilir. Bu herbisit, aromatik aminoasitlerin, bitki gelişimi ve yaşamı için hayati öneme sahip diğer bileşiklerin sentezinden sorumlu bir biyokimyasal döngüde işlevi olan EPSPS enzimini bloke eder. Biyoteknoloji sayesinde bilim insanları glifosat tarafından etkilenmeyen yani yabancı otları etkileyen, istenen bitkileri etkilemeyen alternatif bir enzim üreten transgenik bitkiler geliştirdiler. Bu yaklaşım özellikle soya fasulyesinde başarılmıştır. Günümüzde, yetiştirilen soya fasulyesinin çoğu herbisite dayanıklılık genine sahiptir. Bu işlem **Şekil 6.10**'da verilmiştir. Çok sayıda istenmeyen bitki türünü etkili bir şekilde kontrol eden glifosat şimdilerde dünyanın en yaygın kullanılan herbisitidir. 1996'dan beri Amerika'da glifosata dayanıklı transgenik bitkilerin yüksek orandaki kullanımı, glifosatın oldukça geniş alanlarda yabancı ot kontrolü için özel kullanımına neden olmuştur.

Ne yazık ki glifosata dayanıklı transgenik bitkilerin hâkim olduğu bölgelerde zararlı ot türlerinin glifosata dayanıklı popülasyonları gelişmiştir. ABD, Arjantin ve Brezilya'da bulunan bu glifosata dayanıklı otlarda *EPSPS*'de 101 konumundaki prolin aminoasidinde tek bir nokta mutasyonu saptanmıştır. Gelecek birkaç yıl boyunca glifosata dayanıklı daha fazla transgenik bitki yetiştirildiğinde, glifosata dayanıklı diğer ot türlerinin de gelişeceği tahmin edilmektedir. Bu geliş-

meye karşılık Monsanto, dayanıklı yabancı otların gelişimini azaltmak için geniş spektrumlu bir ot öldürücü ekledi. Glifosata dayanıklı bitkilerin gelecekteki kullanımları için bu olayla mücadele yeni tasarımlar gerektirecektir. Diğer şirketler glifosata dayanıklı otlarla mücadele eden benzer ürünler üzerine çalışıyorlar. Glifosatın, bugün ve gelecekte dünya gıda üretimi için gerekli olduğu ve sürdürülebilirliğini korumak için yapılan herhangi bir eylemin küresel bir zorunluluk olduğu düşünülmektedir.

Herbisite dayanıklı bitkileri yetiştiren çiftçiler, tipik herbisitlerden daha hafif ve çevreye daha dost kimyasallarla yabancı otları kontrol edebilmektedir. Bu gelişme önemlidir, çünkü dayanıklı bitkilerden önce, ABD'deki pamuk çiftçileri ürünlerini yabancı otlardan arındırmak için gerekli olan yüksek insan iş gücü maliyetlerinin yanı sıra, tarlalarını kimyasallarla ilaçlamak için yılda 300 milyon dolar harcamaktaydılar.

Artırılmış Besin Değeri

Biyoteknolojinin potansiyel yararlarının yanında, hiçbir şey milyonlarca insanı yetersiz beslenmenin zararlı etkilerinden kurtarma fırsatından daha önemli değildir. **Altın pirinç** (Golden Rice) açlığa karşı potansiyel bir silahtır. Bu pirinç, vücutta A vitaminine çevrilen bir provitamin olan beta karotenin yüksek miktarlarını üretmek için genetik olarak değiştirilmiştir. Son tahminlere göre, dünyanın pek çok yerindeki 500 bin çocuk A vitamini noksanlığı nedeniyle kör olacaktır. Şu anda sağlık çalışanları körlüğü önlemek için köyden köye A vitamini dozlarını taşıma çabası içindedir. Basit bir şekilde bu besini yiyeceklere eklemek çok daha etkilidir.

Buna rağmen, biyoteknoloji yetersiz beslenmeyi sonlandıracak sihirli bir mermi olmayabilir. Umut verici olsa da, genetik olarak değiştirilmiş gıdaların sınırlamaları vardır. Örneğin, Altın Pirinçteki bu provitamin vücutta kullanılmadan önce yağda çözülmelidir. Günlük beslenmelerinde yeterli yağı almayan çocuklar zenginleştirilmiş pirincin tüm yararlarından faydalanamayabilirler. Bazı gruplar dünya açlığıyla mücadele etmek için daha klasik ıslah yöntemlerinin kullanıldığını görmek istemektedir. Örneğin, Altın Pirinç geliştirilmesinden sonraki ilk iki yıl hazır gibi görünse de, çevresel örgütler tarafından dile getirilen endişeler nedeniyle hiçbir çiftçi bu çeltiği ekmedi. Bu gruplar gelişmekte olan ülkelerde transgenik bitkilerin girişine karşılık olarak Harvest Plus gibi programları desteklemektedir. Harvest Plus klasik ıslaha dayalı olarak A vitamini, demir ve çinko içeriği artırılması hedeflenen 12 bitkiden oluşan bir koleksiyondur. Ancak, aynı yerde transgenik bitkileri destekleyen diğer gruplar, örneğin Bill ve Melinda Gates Vakfı, Altın Pirinç, GD mango, sorgum ve muzu desteklemek için 36 milyon dolar harcamaktadır.

Bitki Biyoteknolojisinin Eczacılıktaki Geleceği

İdeal protein fabrikaları olabilecek bitkileri hatırlayalım (Bölüm 4). Tek bir transgenik bitki tarlası ticari olarak değerli bir proteini büyük miktarlarda üretebilir. Bu arada, transgenik mısır herhangi bir biyoreaktör organizmaya yatırılan dolar başına en yüksek protein verimine sahiptir. Bu alanda olasılıklar neredeyse sonsuzdur.

Çok uzak olmayan bir gelecekte çiftçiler bitkilerle birlikte insan ilaçlarını da yetiştirecekler. Transgenik tütün bitkilerinden insan büyüme hormonunu almak halen mümkün. Gördüğümüz gibi, bitkiler insan aşılarını da üretebilir. Virüsün ya da bakterinin bir alt birimine ait bir genin aktarılmasıyla yenilebilir aşılar üretilebilir. Bitkiler bu protein alt birimini eksprese eder ve bu protein alt birimi bitki ile yenir. Antijen alt birimi kan dolaşımına girdiğinde bağışıklık sistemi bağışıklık sağlamak için antijene karşı antikorlar üretir. Muz, patates, domates, marul, pirinç, buğday, soya fasulyesi ve mısırdaki aşı çalışmaları sonuçlandığında, 1990'lı yılların başında Dünya Sağlık Örgütü (WHO) ilk kez bu ucuz aşıların buzdolabında saklanmasına gerek olmadığını dile getirdi. Cornell Üniversitesi'ndeki araştırıcılar en son Hepatit B viral enfeksiyonuna karşı bir insan aşısı üreten domates ve muzu geliştirdiler. Araştırıcılar başka bir farmasötik kaynak olarak domatesle etkin bir şekilde çalışmaktadır. Kloroplast (yeşil domateste boldur) mühendisliği sayesinde, bilim insanları Tablo 6.1'de gösterildiği gibi yenilebilir bir aşı ve antikor kaynağı oluşturmayı ümit ediyorlar.

Bitkiler, fitokimyasallar adlı geniş bir kimyasal bileşik yelpazesi üretirler ve biyoteknologlar bitkileri insan sağlığı için yararlı kimyasalları üreten küçük çaplı fabrikalara dönüştürüyorlar. Biyoteknoloji antikorlar, kan ürünleri, sitokininler, büyüme faktörleri, hormonlar ve rekombinant enzimleri içeren örneklerle, kompleks teknik teröpatik (tedavi edici) proteinlerin üretimini bitki yolu ile değiştirebilir. Bu "moleküler çiftçilik" muhtemelen kistik fibroz, non-Hodgkin lenfoma, hepatit, Norwalk virüsü, kuduz ve bir dizi mide ve bağırsak ile ilgili rahatsızlıklar gibi hastalık ve durumların tedavisi için kullanılan birkaç ürünü yakın gelecekte piyasaya sunacaktır.

Biyoeczacılar insan ve hayvan hücrelerini, besin açısından zengin pahalı ortamlarda büyütmek yerine, bitki hücrelerine genleri eklerler ve bu bitkiler proteinlerin kopyalanması ve çoğaltılmasında iş görür. Bitkiler hücre kültürlerinden daha büyük miktarlarda yetiştirilebildiğinden, bir bitki üretiminden çok daha

TABLO 6.1

Yararlı Bitkisel Ürün Özellikleri	Mevcut Bitkiler	Gelecekte Olabilecek Bitkiler
Bt bitkileri böcek zararına karşı korunur ve pestisit kullanımı azalır. Bu bitkiler *Bacillus thuringiensis*'de bulunan ve sadece belirli böceklere toksik bir protein üretir.	Mısır, pamuk, patates	Ayçiçeği, soya fasulyesi, kanola, buğday, domates
Herbisite toleranslı bitkiler çiftçilere, kültür bitkilerine zarar vermeden yabancı otları kontrol etmek için belli bir herbisit kullanımı sağlar. Çiftçilere zararlılarla mücadelede esneklik sağlar ve koruyucu toprak işlemeye katkıda bulunur.	Soya fasulyesi, pamuk, mısır, kanola, çeltik	Buğday, şeker pancarı
Hastalığa dayanıklı bitkiler yıkıcı viral hastalıklara karşı bir aşının bitkisel eşdeğeri ile silahlandırılırlar.	Tatlı patates, manyok, çeltik, mısır, kabak, papaya	Domates, muz
Yüksek performanslı yemeklik yağlar yüksek sıcaklıklarda yapıyı korur, işlenme ihtiyacını azaltır ve daha sağlıklı gıda ürünleri oluşturur. Bu yağlar ya yüksek oleik ya da düşük linoleik yapıdadır. Gelecekte, yüksek stearat yağlar da olacaktır.	Ayçiçeği, yerfıstığı, soya fasulyesi	
Daha sağlıklı yemeklik yağlarda doymuş yağ azaltılmıştır.	Soya fasulyesi	
Geç olgunlaşan meyve ve sebzeler üstün lezzete, renge ve tekstüre sahiptir; nakliyat için daha sağlamdır ve daha uzun süre taze kalır.	Domates	Ahududu, çilek, kiraz, domates, muz, ananas
Katı maddesi artırılmış domatesler domates salçası ve sosu yapımı için üstün tada ve yapıya sahiptirler.	Domates	
Besin içeriği zenginleştirilmiş gıdalar besin, vitamin ve diğer sağlığa faydalı fitokimyasal miktarlarında artış sunacaktır. Yararları gelişmekte olan ulusların temel besin ihtiyaçlarını karşılamaya yardımcı olmaktan, hastalıklarla mücadeleyi hızlandırmaya ve sağlıklı olmayı destekleyen gıdalara kadar yayılır.		Proteince zenginleştirilmiş tatlı patates ve çeltik; yüksek A vitaminli kanola yağı; antioksidanı artırılmış meyve ve sebzeler

KAYNAK: BIO üye sürveyi.

fazla miktarda ürün sağlanabilir. Ancak, Virjinya Politeknik Enstitüsünde 1992'de ilk kez insanınkine benzer bir enzimin transgenik tütün bitkilerinde üretilmesinden bu yana, biyoeczacılık endüstrisi onay almayan birçok deneme gerçekleştirmiştir. Yine de, ilk bitki bazlı farmasötik ürün çok uzun olmayan bir zamanda pazardaki yerini alabilir.

İsrail'deki bir biyoteknoloji şirketi Protalix'in, Gaucher hastalığını tedavi eden bir ilaç için FDA onayı vardır. Bu hastalığın tedavisi yoktur, ancak geliştirilen ürün yağlı maddelerin birikimini engeller ve hastalar bu ilacı hayatları boyunca almak zorundadırlar. Henüz hazırda başka tedarik kaynağı olmadığından, bu ilaç hızlı bir şekilde onay almıştır ("yetim" ilaç onaylarının tam bir anlatımı için Bölüm 12'ye bakınız). İlaç, tek kullanımlık plastik biyoreaktörler içinde havuç hücre kültüründe üretilen proteinlerden elde edilmektedir. ABD şirketi olan Medicago ise, serada yetiştirilen tütün bitkilerinde grip aşısı geliştiriyor (bakınız **Şekil 6.11**). *Agrobacter* aracılı transformasyondan sonra, bu bitkilerin ürettiği gerekli protein iskeletleri toplanır ve bir aşıya dönüştürülür.

Bitki Biyoteknolojisinin Geleceği: Yakıtlar

Biyoyakıtlar (bitkiler gibi biyolojik ürünlerden üretilen yakıtlar) dünyadaki hemen her yerde yurt içinde üretilen ham materyallerden üretilebilir ve muhtemelen bitki biyoteknolojisinin gelecekteki önemli bir kullanım alanıdır. Fosil yakıtların alternatiflerine olan ihtiyaç arttığı için ABD hükümeti çözüm aramak için biyoteknolojiye yönelmiştir. 2007 Biyoyakıt Girişimi



ŞEKİL 6.11. Botanik Biyoeczacılık Farmasötik proteinler üretmesi için transforme edilen genetik olarak değiştirilmiş su bitkileri.

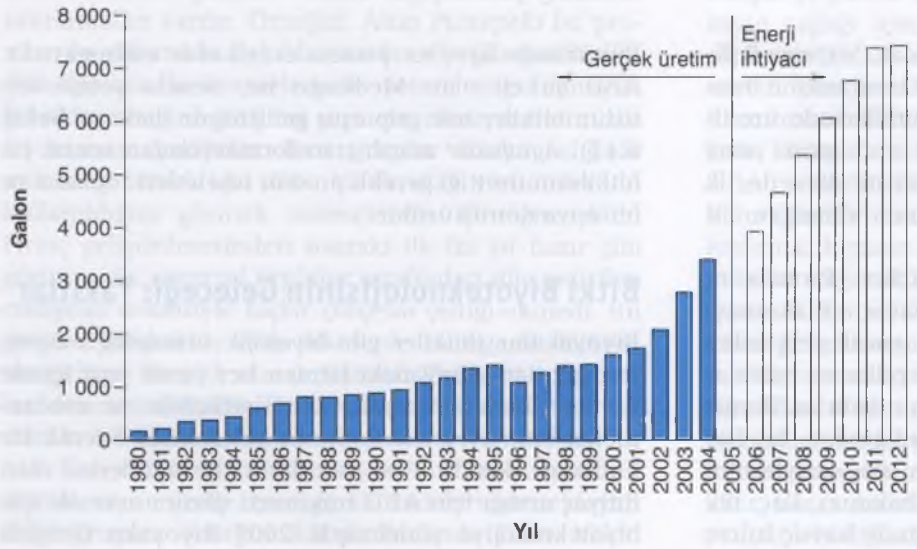
2030 yılı itibariyle ABD mevcut yakıtının % 30'unu biyoetanol ile değiştirmek amacıyla devlet desteğini 2006 bütçesinde % 60'lara çıkarmıştır (bakınız **Şekil 6.12**).

Biyoetanol rafinerileri, Orta Batı'nın tamamına yayılmıştır (büyük çoğunlukla devlet desteği ve teşviklerinin sonucunda) ve herhangi bir selüloz kaynağından şekere dönüşümde kullanılabilir. Ancak, 10 varil mısır tanesi etanolü üretmek için 7 varil petrol harcanması, kısmen orta düzey bir net kazancı temsil eder. Bu nedenle hali hazırda var olan selülozik kaynakları – geliştirilen biyoyakıt üreten organizmalar aracılığıyla – biyoyakıta dönüştürmek için biyoteknoloji gereklidir ve bu işlemi ekonomik olarak daha uygulanabilir yapar.

Bitki artıklarından biyoyakıtlar

Gelecekte bitkiler yakıt sağlamak için başka olanaklar da sunabilir. Özellikle bilim insanları bitki artıklarında bulunan enerjiyi kullanmak için bazı yöntemler geliştiriyorlar. Güneş enerjisi, fotosentezle bitki hücre duvarı polimerlerinde (selüloz, lignin, samandaki hemiselüloz, kavuzlar, kabuklar ve ağaçlar) enerji depolanmasını sağlar. Bu enerji bitki yakmadıkça depolanmış olarak kalır. Nişasta bazlı etanol ve biyodizel kullanımındaki artışa rağmen, bitki yan ürünlerinden yakıt üretimi şimdiye kadar yapılmamıştır. Eğer bu enerji serbest bırakılırsa ot, odun ve bitkisel artıklar şekerin yakıta dönüşümü için yenilenebilir, coğrafik olarak yaygın bir kaynak sunar. Bu işlem toplama, hücre duvarlarının parçalanması (ön işlem) ve şekerlerin biyoyakıtlara dönüşümlerini içerir.

Böyle şekerlerden biri – beş ya da altı-karbonlu şeker fibrillerinden oluşan bir polisakkarit ailesi olan – hemiselülozdur. Lignin, dayanıklılığı sağlamak için bu fibrilleri çapraz bağlarla bağlayan yapıştırıcıdır. Bitki artıklarından yakıt geliştirilmesindeki bir sorun, lignini parçalamak için hemiselülozun ön işlenmesine gereksinim olduğu yüksek asitli durumlarda fonksiyonel olan enzimlerin bulunmasıdır. Şekerden biyoetanol üretimini gerçekleştiren rafinelerin bu bitkisel artıkları yakıta dönüştürme potansiyelleri olabileceği konusundaki araştırmalar devam etmektedir.



ŞEKİL 6.12 2005 ABD Enerji Önlemleri Yasası Amerikan yakıt arzına 2012 yılına kadar 7.5 milyar galon etanol ve biyoyakıt talebi eklendi (1 galon = 3.8 lt).

Alglerden biyoyakıtlar

Biyoyakıt üreticisi gruplar son zamanlarda petrolün gelecekteki alternatifi olarak mısır ve kızartma yağı yerine, mikroskobik algleri incelemektedir. Mikro algler, lipitleri (sebze benzeri yağları) doğal olarak üretir ve depolarlar. Biyokimyasal olarak değiştirilebilirlerse biyoyakıt üretiminde daha etkin olabilirler. ABD Enerji Bakanlığı (DOE), 1996'dan önce alglerin potansiyelini keşfetmesine rağmen, aynı yıl ham petrol fiyatlarının varil başına 50 dolardan 20 dolara düşmesi, DOE'nin ilgisini azalttı. 2007'de Biyoyakıt Girişiminin kurulması ve artan ham petrol fiyatıyla birlikte alglere olan ilgi de geri döndü. Buradaki zorluk günde en azından bir milyon varil yakıt üretiminin gerekmesi. San Francisco'daki Solazyme şirketi, atık gliserolden şeker küspelerine kadar her şeyi yiyerek triaçilgliserid ve metanol üreten alglerin bulunduğu kapalı bir biyoreaktor sistemi geliştirdi. Kimyasal modifikasyon ve yoğunlaştırmadan sonra, üretilen alkanlar biyodizele benzemektedir. Bir gram alg hücresi başına % 50-60 yakıt verimi mükemmel sayılırken, Solazyme'in algleri bir gram kuru ağırlık başına % 75 yakıt üretmektedir. Bu şirket bir varil mikrobiyal fuel oil üreten ilk şirkettir ve günde bir milyon varil yakıt hedefinin başarılabileceğinden emindir.

6.4 Sağlık ve Çevre Kaygıları

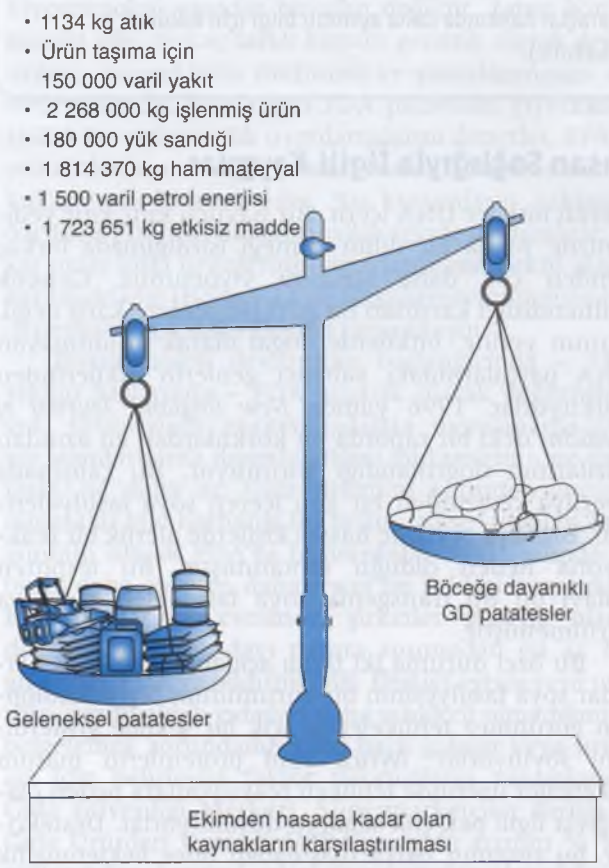
Transgenik bitkilerin başlangıcından bu yana, insanlar bu bitkilerin insan ve çevre üzerine potansiyel zararlı etkileri konusunda endişelenmektedir. "Doğal" olanın sıklıkla "güvenilir" terimiyle eş tutulduğu durumlarda şüphesiz doğal olmayan bitkiler bir tehlike havası taşımaktadır. Eylemciler genetik olarak değiştirilmiş bitkileri (GDO veya genetik olarak değiştirilmiş organizmalar) üreten şirketlere karşı protestolar düzenlemektedir (bakınız **Şekil 6.13**).

Böyle endişeler endüstriyi sarsma gücüne sahiptir. 2000 yılında kuzeybatıdaki patates işleyen şirketler genetiği değiştirilmiş patatesleri satın almayı durdurdular. Mühendislikle pestisitlere dayanıklı yapılan bu patateslerin kalitesiz ya da tehlikeli olduğuyla ilgili hiçbir işaret yoktu. Görünüşleri ve tatları tıpkı genetik olarak değiştirilmemiş patateslerinki gibiydi ve ayrıca çiftçilerin onları yetiştirmek için varillerce kimyasal kullanmalarına da gerek yoktu. Bu patatesler afitlere ve patates böceklerine dayanıklıydı, ancak halkın karşıt fikirlerine dayanıklı değildi (bakınız **Şekil 6.14**).

Bitki biyoteknolojisi karşıtları ne söylüyorlar ve karşıt görüşlülerin savundukları neler? GD bitki üretiminin artı ve eksileri nelerdir?



ŞEKİL 6.13. Boston'daki 2000 Yılı BIO Konferansında Genetiği Değiştirilmiş Gıdaları Protesto Gösterisi



ŞEKİL 6.14. GDO ve Geleneksel Olarak Yetiştirilen Patateslerin Üretimi için Kaynakların Karşılaştırılması Bir insektisitin üretimi ve uygulanması için, kendi böcek öldürücü genlerine sahip bitkilere kıyasla çok daha fazla ham materyal ve enerji harcanır.



TİCARET ARAÇLARI

Raportör Genlerin Kesilip Çıkarılması

Araştırıcılar bir bitki hücresine bir gen transfer edildiğini bilirler, çünkü antibiyotiğe dayanıklılık genleri (örneğin, kanamisin antibiyotik dayanıklılığı) genellikle ticari bitki mühendisliği için "raportör" olarak kullanılır. Bu genler yalnızca antibiyotikli ortamda yaşayabilen, aktarım yapılmış bitki hücrelerinin seçimine olanak sağlarlar. Bitkilerde antibiyotik genlerinin (ve küçük miktarlardaki antibiyotiklerin) varlığı bazı kamuoyu endişelerine neden olmaktadır. Ancak, Rockefeller Üniversitesi'ndeki dört bilim insanının bulduğu bir yöntemle, transformasyon ve seleksiyondan sonra belli genlerin uzaklaştırılmasının mümkün olduğunu biliyoruz. Bu işlem, aktarım yapılan hücrelerin antibiyotik seleksiyonundan *sonra* oluşan bitki embriyosu ya da bitki organ dokularında var olan doğal mekanizmalar aracılığıyla kesip çıkarılmasını teşvik etmeyi harekete geçirebilen bir promotör kullanımını içermektedir (Yukarıda tanımlanan işlemde kullanılan özel bilimsel araçlar hakkında daha ayrıntılı bilgi için Bölüm 3'e bakınız).

İnsan Sağlığıyla İlgili Kaygılar

Bütün bitkiler DNA içerir. Bir havucu kıtır kıtır yediğinizde ya da bir dilim ekmeği ısırdığınızda birkaç genden çok daha fazlasını yiyorsunuz. Genetik mühendisliği karşıtları bu görüşle genlere karşı değil. Bunun yerine, bitkilerde doğal olarak bulunmayan DNA parçalarındaki yabancı genlerin etkilerinden korkuyorlar. 1996 yılında *New England Journal of Medicine*'deki bir raporda bu korkulardan en azından bazılarının doğrulandığı görünüyor. Bu çalışmada Brezilya cevizinden bir gen içeren soya fasulyelerinin, Brezilya cevizine hassas kişilerde alerjik bir reaksiyona neden olduğu saptanmıştır. Bu tespitten dolayı bu tip transgenik soya fasulyeleri piyasaya sürülmemiştir.

Bu özel duruma iki farklı açıdan bakabiliriz. Karşıtlar soya fasulyesinin bu durumunun biyoteknolojinin görünmez tehlikelerini açık bir şekilde gösterdiğini söylüyorlar. Ayrıca yeni proteinlerin masum tüketiciler üzerinde tehlikeli reaksiyonlara neden olacağıyla ilgili pek çok senaryo düşünüyorlar. Destekçiler, bu sistemin halka ulaşmadan önce beklenmedik tehlikeleri saptamasını bir başarı hikâyesi olarak görüyorlar.

Günümüzde pek çok bilim insanı genetik olarak değiştirilmiş gıdaların yaygın alerjik reaksiyonlara neden olmayacağı konusunda hemfikirler. Amerikan Tıp Derneğinin son bir raporuna göre, çok az sayıda protein alerjik reaksiyonlara neden olma potansiyeline sahiptir ve bunların çoğu zaten bilim insanları tarafından iyi bilinmektedir. Bilinmeyen bir alerjenin manav raflarındaki genetik olarak değiştirilmiş bir yiyeceğe gizlice girmesi çok küçük bir olasılıktır. Gerçekte biyoteknoloji günün birinde alerjiyle ilgili ölümleri önlemeye yardımcı olabilir. Araştırıcılar şu anda şiddetli alerjik reaksiyona neden olabilen proteinleri içermeyen yer fıstıklarını üretmeye çalışıyorlar.

Alerjiler tek endişe değildir. Bazı bilim insanları bazı transgenik bitkilerde markör gibi kullanılan antibiyotiğe dayanıklılık genlerinin insanlarda bakterilerin neden olduğu hastalıkları yayabileceğini bildirmektedir. Teorik olarak bu bakteriler tedaviye daha dayanıklı olurlar. Neyse ki bakteriler düzenli olarak besin kaynaklarımızdan gen almazlar. *Science* dergisindeki son bir makalede antibiyotiğe dayanıklılık geninin bir bitkiden bir bakteriye geçebilmesinin sadece küçük bir olasılık olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, bakterilerin çoğu antibiyotiğe dayanıklılık genlerini zaten evrimle kazanmışlardır.

Biyoteknoloji karşıtı literatürleri araştırırsanız çok daha fazla suçlama göreceksiniz. "Frankeştayn yiyecekler kansere neden olur" gibi manşetler yaygındır. Ancak, bugüne kadar bilim bu endişelerin hiçbirini desteklememiştir. Ulusal Bilimler Akademisi son raporlarında, bugün marketlerdeki transgenik gıdaların insan tüketimi için son derecede güvenli olduğunu bildirmiştir.

Çevre Konusunda Kaygılar

Transgenik mısırların çok sayıda kral kelebeğini öldürebileceği endişelerinin gerçekçi olmadığını açıklayan genetik pestisitler bölümündeki son çalışmaları anımsayalım. Bununla beraber, çevre hakkındaki endişeler yok olmamıştır. Bitkilerdeki genetik geliştirmeler süper yabancı ot olarak adlandırılan yeni nesillere öncülük edebilir. Nasıl ki antibiyotiğe dayanıklılıkla ilgili genler teorik olarak bitkilerden bakterilere geçebilirse, pestisit ya da herbisite dayanıklılık genleri de potansiyel olarak yabani otlara geçebilir. Kabak, kanola ve ayçiçeği dâhil pek çok bitki yabani otlara yakın akraba olduğundan, bazen bir bitkideki genlerin diğer bitkinin genleriyle karışmasına neden olan çaprazlamalar gerçekleşir. Ancak, az sayıda uzman genetik olarak geliştirilmiş yabani türlerin herhangi bir şekilde ani artışını tahmin etmektedir. Bu tehdidin tüm boyutunun ölçülmesine ve bu riskleri minimize eden yolların geliştirilmesi için daha fazla sayıda çalışmaya ihtiyaç vardır.

Biyoteknolojik olarak geliştirilmiş bitkilerin ekolojik açıdan potansiyel zararları, açık bir şekilde belirlenmiş yararlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. İlk ve



KARARI SİZ VERİN

StarLink Olayı

2000 yılında, genetik olarak değiştirilmiş StarLink mısırların izi bakkallarda satılan tako ekmeklerinde ortaya çıktı. Hayvan tüketimi için üretilen mısırdaki herbisite dayanıklılık geni toprakta ya da büyükbaş hayvanların midelerinde parçalanmaktadır. Görünürde bu haber şok edici değildi. Market raflarındaki işlenmiş ürünlerin çoğu genetik olarak değiştirilmiş mısır ya da soya fasulyesi ürünü içermektedir. Ancak, bu özel mısır tipi, yavaş ilerleyen potansiyel alerjik reaksiyon endişelerinden dolayı insan tüketimi için onaylanmamıştı. Çevre Koruma Dairesi (EPA) – tüm pestisitlerin kullanımını düzenleyen birim – StarLink'i sadece hayvan besleme ve endüstri kullanımı için onaylamıştı. Gıda zincirinde StarLink mısırların keşfi potansiyel olarak "kusurlu" ürünlerin büyük miktarda geri toplatılmasına neden oldu. Bu geri alımların hemen ardından, StarLink'i üreten şirket olan Aventis, EPA ile bir anlaşma yaptı ve bu mısırların yetiştiriciliğini durdurma konusunda anlaştı. Bu onaylanmamış pestisit gerçekten herhangi bir zarar yaptı mı? Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) araştırmak için derhal girişimlerde bulundu. Az sayıda kişi genetik olarak değiştirilmiş mısırı yedikten sonra alerjik tipte reaksiyonlardan şikayet etti ve CDC bu durumu yakından araştırdı. Toplamda 28 kişide alerjik reaksiyonla oluşan semptomların bulunduğu saptandı. Ancak, kan testleri bu kişilerin hiçbirinin Bt proteinine duyarlı olmadığını gösterdi.

Bu olay nasıl ele alınmalıydı? Halk zarardan yeterince korundu mu? Hükümet aşırı tepki mi gösterdi? Denetlemeler ve ticari çıkarlar arasındaki en iyi denge nedir? Kararı siz verin.

en başta geleni, Şekil 6.14'de görüldüğü gibi, biyoteknolojinin kimyasal pestisit kullanımını önemli ölçüde azaltabildiğidir. Biyoteknoloji bitkilerinin çevresel yararlarının kilit noktalarından biri, bitkilerdeki insektisit ve herbisit uygulamalarındaki azalmadır. Biyoteknolojik bitkilerin yetiştirildiği ülkelerde soya fasulyesi, mısır, pamuk ve kanoladan oluşan dört biyoteknolojik bitkide kullanılan pestisit yılda 791 milyon sterlin (% 8.8) azalmıştır. Bu çevresel etkilerle birlikte % 17.2'lik bir azalma anlamına gelmektedir.

Genetik olarak değiştirilmiş ağaçlardan oluşan ormanlar her yıl atmosferden milyarlarca ton karbon çekebilir ve Lawrence Berkeley ve Oak Ridge Ulusal Laboratuvarlarındaki araştırıcılara göre küresel ısınmayı azaltabilir. Bu araştırıcılar köklerinde daha fazla karbonu harcamaları için ağaçları genetik olarak değiştirebilmenin mümkün olduğunu ileri sürmektedir. Bu değişiklik vejetasyonun doğal olarak havadan aldığı karbon miktarını büyük ölçüde artırabilirdi. Bu değişim ABD'de genetiği değiştirilmiş ağaçların üretimi için mevcut düzenleyici ortamda bir modifikasyon gerektirmekte ve genetik olarak değiştirilmiş organizmaların kullanımını çevreleyen konular hakkındaki toplumsal algılarda bir değişime ihtiyaç duymaktadır. Potansiyel vardır, ancak uygulamaya koymak çevremizdeki genetik olarak değiştirilmiş organizmaların daha fazla kabulüne bağlıdır.

Her şeyi hesaba katarsak, biyoteknoloji bizi ekolojik felaketin eşiğine sürecek gibi görünmüyor, aksine çevresel sorunlara gerçekten bazı çözümler sunuyor. Ulusal Bilimler Akademisi yakın geçmişte biyoteknolojik olarak geliştirilmiş bitkilerin geleneksel bitkilerden daha fazla bir çevresel tehdit yaratmadığını bildirmiştir.

Yasal Düzenlemeler

Biyoteknoloji yasadışı bir alan değildir. Zaten gördüğümüz gibi, birkaç farklı kurum genetik olarak değiştirilmiş yiyeceklerin üretimini ve pazarlanmasını denetlemektedir. Bunlardan FDA pazardaki yiyecekleri, USDA ise yetiştiricilik uygulamalarını denetler, EPA Bt proteinlerinin ve diğer pestisit olarak adlandırılanların kullanımını kontrol eder. Bu kurumların yaklaşımı özellikle FDA'nın durumu yıllar içinde değişmiştir, fakat onlar bitki ürünlerinin onaylanmasına aktif olarak katılmaktadır (Bölüm 12'de bitki biyoteknolojisindeki denetimler çok daha detaylı tartışılmıştır).

Biyoteknoloji devriminin başlangıcında – 1992 yılının başlarında – FDA genetik olarak değiştirilmiş gıda ürünlerinin normal gıdalara uygulananla aynı zor standartlarda denetlendiğini bildirmiştir – ne daha fazla, ne daha az. Gıda şirketleri kanunen zorunlu olmasalar bile herhangi bir ürünü pazarlamadan önce gönüllü olarak FDA'ya başvurdular. 2001 yılında bu birim daha otoriter, daha resmi bir yaklaşım uyguladı. Bu kurallar çerçevesinde, şirketler genetik olarak değiştirilmiş bir gıdayı pazara sunmadan en az 120 gün önce FDA'ya bildirmelidir. Üretici ayrıca yeni ürünün, yerini aldığı gıdadan daha tehlikeli olmadığını da belgelemek zorundadır. Bitki bazlı gıdalar veya ürünler için belirleyici faktör tüketicilerin tutumlarıdır. Gıda Güvenliği Merkezi, Süpermarketçiler Birliği ve Gıda Ürünleri Derneği USDA'ya "gıda arzının % 100 sağlandığını kontrol eden uygulamalar olmadığında, farmasötik amaçlı bitkisel üretime güçlü şekilde karşı olduklarını" bildirmişlerdir. Bu kaygıları giderecek gıda olarak tüketilmeyen pek çok bitki ve bitki büyütme sistemleri bulunmaktadır ve hiçbir üretici şimdiye kadar bu kuralları çiğnememiştir.



KARİYER PROFİLİ

Günümüzün Ziraatçısı

21. yüzyıldaki ziraatçılar genetik mühendisliğinden (ve ilgili düzenlemelerden), botanikten, istatistikten, kimyadan ve küresel görüntüleme sistemlerinden anlamak zorundadır. Diğer bir deyişle, yoğun emek gerektiren tarım sanayisinin günümüzde bilimsel araçlara ihtiyaç duyduğunu biliyoruz. Amerikan çiftçileri ve hayvan yetiştiricileri, onları dünyadaki en etkin üreticiler yapmaya olanak sağlayan teknolojiyi zaten benimsemişlerdir. Eğitim, dünyadaki mevcut yiyecek ve liflerin miktar ve kalitesi hakkında son kararı verebilmek için anahtar rolündedir. USDA ve Purdue Üniversitesi tarafından mali desteğin sağlandığı ulusal bir çalışmada, tarım bilimleri mezunları için yılda yaklaşık 58 bin iş olanağı bulunduğu öngörülmüştür; bu sayı tarım alanındaki üniversite mezunlarının sayısından oldukça fazladır.

Tarımsal biyoteknoloji, biyoteknoloji ve tarım alanında yetenekli personeli içeren sanayileriyle birlikte en iyi biyoteknoloji uygulamalarından biridir. Dünyanın toplam kara yüzeyinin yaklaşık % 2'sinde her 45 yılda ikiye katlanan insan nüfusunu beslemek için ihtiyaç duyulan besinleri üretmeye devam etme kabiliyeti, teknolojideki ilerlemeler olmaksızın gerçekleşemeyebilir ve biyoteknoloji tarıma son 10 yılda en büyük değişimi sunmuştur. Tarımsal biyoteknoloji gerekli yetenekleri geliştirmeyi amaçlayanlar için büyük bir geleceğe sahiptir.

BİR FARK YARATMAK

Petrol kökenli yakıtların kullanımı küresel ısınmayı içeren bir takım çevresel sorunlara neden olmuştur. Bitki ve alg bazlı biyoyakıtların ticarileştirilmesi hareketi bu soruna potansiyel bir çözüm sunmaktadır. ECO Solution Şirketi, mikro alglerden yağ üretimini stres yaratma yoluyla artırmak için girişimde bulunmuştur. ECO Solution Şirketi, "doğal evrimin" genetik varyantlar arasında seleksiyonla yağ üretimini geliştirdiğini ileri sürmektedir. Algler suya batmamak için bir gıda rezervi olarak bazı yağları üretir. Fotosentez için karbondioksidi kullanırlar. Toplanan alglerden elde edilen biyoyakıt metan üretimi için de kullanılabilir. Diğer şirketler biyoyakıt üretimi için Orta Amerika'daki Jatropa bitkisi gibi diğer organizmaları kullanmaktadır. SG biyoyakıt şirketi bu bitkiden elde edilen yağı incelediğinde bir jet yakıtı olarak petrol bazlı jet yakıtlarından daha sıcak yandığını ve daha az salınım ürettiğini tespit etti. Bitki üretimi, yakıt ekstraksiyonu ve çevresel endişelerle ilgili sorunlar biyoteknolojinin gelişimini teşvik etmek için gerekli yetenek ve bilgiye sahip kişiler tarafından çözülebilir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Yediğiniz ürünlerin, varsayalım mısır ya da soya fasulyesi, biyoteknolojiyle geliştirilip geliştirilmediğini nasıl anlarsınız?
2. Tarımsal biyoteknolojinin çevresel yararları nelerdir?
3. Tarımsal biyoteknolojinin tüketicilere sağladığı yararlar nelerdir?
4. Tarımsal biyoteknolojinin üreticilere yararları nelerdir?
5. Biyoteknolojik olarak geliştirilmiş ürünler etiketlenmeli mi?
6. Böceklere dayanıklı bitkiler, böcek dayanıklılığının gelişmesini teşvik edecek mi?
7. Biyoteknolojik olarak geliştirilmiş bitkisel ürünleri içeren gıda ve yemleri tüketen insan ve hayvanlarda uzun vadede herhangi bir sonucun olmayacağını nasıl biliyorsunuz?
8. Bitkilere gen transferinde hangi koşullarda gen tabancaları öncelikli olarak kullanılır?
9. Altın Pirinç gelişmekte olan ülkelerde doğan çocuklarda hastalıkları önleme ve pek çok hayatı kurtarma potansiyeline sahiptir. Bu teknolojinin bu ülkelere maliyeti ne kadardır?
10. Biyoteknoloji aracılığıyla böceklere dayanıklı bitki üretiminde gen kümelemesinin nasıl kullanılabileceğini açıklayınız.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

7

Hayvan Biyoteknolojisi

Çeviren: Zihni DEMİRBAĞ

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Hayvan araştırma modellerini kullanarak yapılan bazı tıbbi gelişmeleri listeleyebilmelisiniz.
- Bir hayvanın ilaç çalışmaları için model olarak nasıl seçildiğini açıklayabilmelisiniz.
- Hayvan modellerinin iki alternatif kullanılışını açıklayabilmeli ve kısıtlamalarını tartışabilmelisiniz.
- Hayvan araştırmalarını kuşatan etik endişelerin bazılarını tartışabilmelisiniz.
- Hayvan klonlamada kullanılan işlemleri sıralayabilmelisiniz.
- Güncel hayvan klonlama çalışmalarının bazı zorluklarını tartışabilmelisiniz.
- Transgenik hayvanların biyoreaktörler gibi kullanılmasıyla üretilebilen bazı biyolojik ürünleri listeleyebilmelisiniz.
- Gen çıkartılmış veya gen aktarılmış hayvanların, genetik bozukluklar ve diğer hastalıklar hakkında bilgi sağlamak için nasıl kullanılabildiklerini açıklayabilmelisiniz.
- Hibridomlardan monoklonal antikorların geliştirilmesinde kullanılan işlemleri tanımlayabilmelisiniz.



Biyoteknoloji sayesinde, domuzlar insan organlarının bir kaynağı olabilir.

Dolly bir koyun gibi görünüp ve davranırken sıradan koyundan farklıydı. Bir klon (donor bir hücreden oluşturulan benzer ikiz) olması nedeniyle televizyon kameralarının önünde yeterince zaman geçirdi.

Bazı insanlar *hayvan* ve *mühendislik* kelimelerinin aynı cümlede kullanılmasının kolay olmadığını düşünürler. Onlar için, bu kelimeler ayaksız sığırlar veya tüysüz tavukları çağrıştırır. Fakat biyoteknologlar tuhaf yeni hayvanlar oluşturma işiyle uğraşmazlar. Genetik olarak tasarlanmış hayvanlar, yeni tıbbi yöntemler geliştirmede, besin kaynaklarımızın artırılmasında ve insanlar dâhil bütün hayvanların daha iyi anlaşılmaları amacıyla kullanılırlar. Hayvanlar aynı zamanda insani olmayan ve etik olmayan amaçlar için de kullanılabilirler, fakat yasalar böylesi ihtilaflı uygulamaların yaygın hale gelmesini önler.

Hayvanlar biyoteknolojik fırsatlar sunarken, aynı zamanda çeşitli katı bilimsel ve etik endişelere de neden olurlar. Bu zorlu fakat fırsatlarla dolu özellikleri sağlayan araştırıcılar, bilim ve insanlığa önemli katkılar sunma kapasitesine sahiptirler. Örneğin, hayvan sağlık ürünleri 2005'te 17.4 milyar doların üzerinde ve 2010 yılında ise 21.7 milyar dolara ulaşan bir gelir oluşturmuştur. Böylece, veteriner sağlık ürünleri hem insanlara hem de hayvanlara fayda sağlar.

Bu bölüm hayvan biyoteknolojisinin çeşitli alanlarını gözden geçirmektedir. Hayvanların araştırmalarda kullanılmasının incelenmesiyle konuya başlayacağız ve daha sonra biyoteknolojinin uç sınırlarındaki bazı konulara (klonlama, transgenikler ve hayvanların biyoreaktörler gibi kullanılması) değineceğiz.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Sağlık giderleri kolay çözülemeyecek bir şekilde kontrolün dışına çıkmaktadır. Maliyetin azaltılmasına yardımcı olabilecek bir yol, hastalıkları önleyen aşıların sunumunu arttırmaktır. Aşıya yapılan her bir dolarlık sağlık yatırımı, 7-20 dolar arasında sağlık gideri kazancı şeklinde geri dönmektedir. Bu tasarruf rahim ağzı kanserine sebep olan insan papilloma virüsüne karşı geliştirilen aşı (Gardisil) ve H1N1 domuz gribi aşısındaki başarılarla çok açık şekilde görülmektedir. Aşılar, 2009'da dünya ilaç piyasasının % 2'sini oluşturmasına rağmen, gelecekte bunların ilaç piyasasında daha geniş bir yer tutacağı beklenmektedir. Biyoteknoloji endüstrisi, aşı geliştirmedeki fırsatları gördüğü için hayvan ürünlerinin insan aşıları olarak kullanılabilme potansiyellerini araştırmaktadır. Son zamanlarda, bir çeşit tam renk körlüğü (konjenital akromatopsi) olan köpekler, Pensilvanya Veterinerlik Okulu'nda (University of Pennsylvania) Andrias Komaromy tarafından gen terapisi kullanılarak iyileştirildi. Akromatopsi 30 000 ile 50 000'de 1 bireyde rastlanılan nadir bir genetik bozukluktur. Bu bireyler için bir aşının geliştirilmesi veterinerlik başarısının sonucudur. İnsan sağlık hizmetleri uygulamaları ve sağlık giderlerinde tasarruf potansiyeline sahip başka veterinerlik ürünleri de bulunmaktadır.

7.1 Araştırmada Hayvanlar

Beyaz fare, laboratuvar önlüğü ve mikroskop ile birlikte bilimsel araştırmaların bir simgesi olup keşifler sahasını temsil eder. Hayvanlar onlarca yıldan beri araştırma yöntemlerinin merkezi olmuş olmasına rağmen, kullanımları tartışmalıdır. Burada, hayvanların araştırmalardaki rolünü ve bunlardan sonuçlanan olayları gözden geçireceğiz.

Araştırmalarda Niçin Hayvanlar Kullanılır?

Hayvanların kullanıldıkları araştırmalar geçen yüzyılda çoğu tıbbi keşiflerin kilit noktası olmuştur. Böylesi araştırmaların insanların çoğu sorunlarını önlediği soru götürmez bir gerçektir. Bazı örnekler vermek gerekirse:

- Hayvanlar kullanılarak geliştirilen çocuk felci aşısı olmasaydı, her yıl binlerce çocuk ve yetişkin ölecekti veya hastalığın zayıflatan yan etkilerinden acı çekecekti.
- Hayvanlardaki diyaliz testleri olmasaydı, böbrek hastalıkları nedeniyle on binlerce kişi ölecekti.
- Hayvanlarda mükemmelleştirilen katarakt ameliyat teknikleri olmasaydı, bir milyondan fazla insan her yıl en azından gözlerinden birini kaybedecekti.

Hayvan araştırmaları aynı zamanda hayvan sağlığına da direkt fayda sağlar:

- Biyoteknoloji kullanılarak yuvarlak kurt, eklem iltihabı, parazitler, alerjiler ve kalp hastalıklarını iyileştiren, USDA-onaylı, 111 hayvan kökenli tıbbi ilaç geliştirilmiştir.
- Hayvanlar üzerindeki araştırmalar aynı zamanda veterinerlerin kuduz ve kedi HIV'sini önlemek için günlük kullandıkları aşıların gelişimine yol açmıştır.

Hücreler üzerinde yapılan *in vitro* (vücut dışındaki hücrelerin kültürü) testlerin neden yeterli olmadıklarını merak edebilirsiniz. Bunun cevabı, yeni ilaçlar ve tıbbi prosedürler doku veya organdaki izole hücrelerin ötesinde etkiye sahiptir ve bir organizmanın tümündeki etkisini belirlemek için hayvanlarda test edilmek zorundadırlar. Örneğin, bir ilaç kanser hücrelerini öldürmek için güçlü bir ajan olabilir, fakat aynı zamanda ilgili olmayan organlarda tahrip edici olabilir.

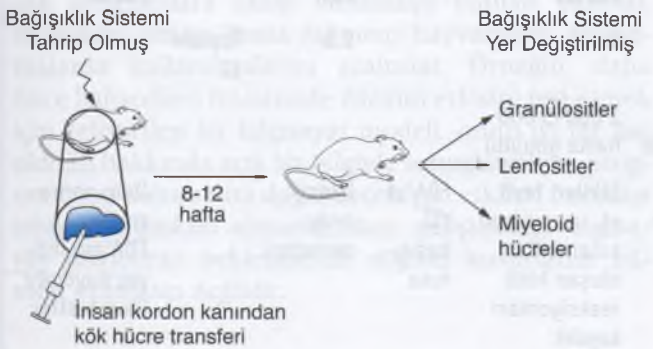
Beklenmedik yan etkili bir ilaç olan finasteride (Propecia) saç büyümesini artırmak için kullanılır. Üzerinde, açıkça hamile kadınların kırılmış veya parçalanmış tabletleri ellememeleri uyarısı bulunmaktadır. Bu

uyarı ve tablet üzerindeki özel bir koruyucu tabaka hayvanlar üzerindeki testlerden elde edilen bilgilerden kaynaklanmaktadır. Bu testler ilacın yüksek dozlarda ağızdan alınması durumunda, doğan erkek yavrularda ciddi doğum kusurlarını (üreme organlarının kusurlu olması) ortaya çıkarmıştır. Tabletlere sadece dokunmak bile yeni doğan bebeklerde istenmeyen kusurların oluşmasına yol açtığından, ilaç piyasaya sunulmadan önce uyarı yapılır. Bu durumda, hayvanlar kullanılarak yapılan testler beklenmedik hastalıkların önlenmesine yardımcı olur. Hamile kadınlara bu ilacın asla verilmemesi bilgisini hayvan testlerine borçluyuz.

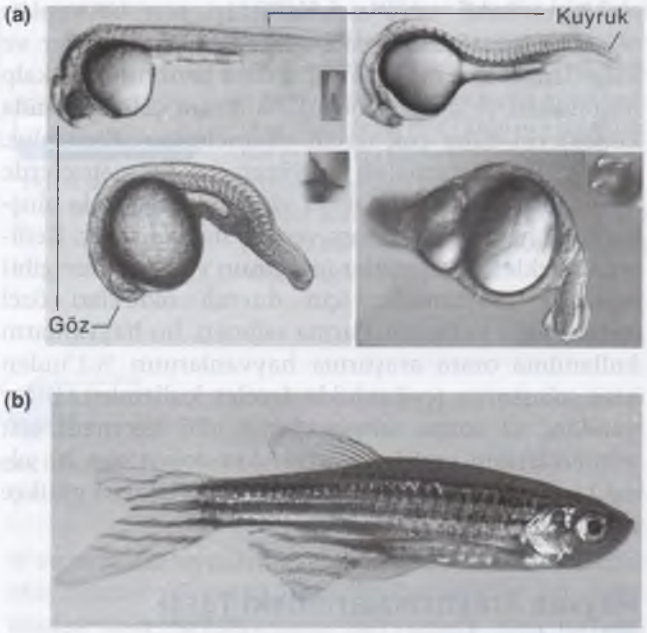
Araştırmalarda Kullanılan Hayvan Türleri

Fare ve insanlar arasındaki farklılıklar ortada olmasına rağmen, her ikisi arasında çok sayıda genetik ve fizyolojik benzerlikler bulunmaktadır. Bundan dolayı fare veya diğer hayvanlar üzerinde yürütülen deneyler bizlere kendimiz hakkında çok şeyler söyleyebilir (**Şekil 7.1**). Araştırmalarda saf-ırk fare ve sıçan (genellikle genetikleri bilinir ve kontrol edilebilir) ve daha az sıklıkta diğer hayvanlar da kullanılırlar. Araştırıcılar omurgalıları (zebra balığı) ve omurgasızları (meyve sineği ve kurtları) kullanarak model hayvan sistemleri geliştirmişlerdir. Küçük zebra balığı (*Brachydanio rerio*) en değerli araştırma hayvanı olup, çok ünlü ve zor koşullara dayanıklı bir akvaryum balığıdır (**Şekil 7.2**).

Zebra balığı çok küçük (ergin boyu 3 cm, yaklaşık bir ataç büyüklüğündedir) olduğundan dar bir alanda çok sayıda hayvanın yetiştirilmesi mümkündür. Bu aktif sıcak su balığının yumurtlaması sürekli olup, nesiller arası yaklaşık 3 aydır. Yumurta sayısı her bir dişiden haftada 200'ü aşabilir. Zebra balığı embriyogenezi (erken dönem organ gelişimi) yaklaşık 120 saatte tamamlar; bağırsak, karaciğer ve böbrekler ilk 48 ile 72 saatte gelişir. Balık çok hızlı büyüdüğünden bilim insanları toksisite veya diğer kötü şartların etkisini



ŞEKİL 7.1. Fareler Hakkımızda Bilgiler Verir Burada, gelişen bir farenin bağışıklık sistemi tahrip edildikten sonra, insan kök hücreleri enjekte edilerek değiştirilebilir. Bu durumda, fareyi model gibi kullanarak insanlar için terapi çalışmaları yapılabilir.



ŞEKİL 7.2. Zebra Balığı Hayvan Araştırmalarında Yaygın Olarak Kullanılır Zebra balığı gen çalışmaları ve toksisite analizleri için diğer hayvanlara göre hızlı büyüyen bir alternatiftir. Embriyolarına gen transfer edildikten sonra (a) balık ergin olmadan önce gelişme farklılıklarını (kan damarı büyümesi gibi) çalışmak mümkündür. (b) Şeffaf embriyolar, hızlı büyüme oranı ve çalışma kolaylığı zebra balığını denemeler için yaygın bir hayvan modeli yapar.

yaklaşık 5 günde bu canlı üzerinde test edebilirler. Eğer bir ilaç zebra balığına karşı toksik ise, muhtemelen insanda da toksiktir.

Zebra balığı gelişim çalışmaları ve genetik araştırmalar için idealdir. Şekil 7.2a'da görüldüğü gibi, zebra balığı embriyoları, yumurtaların içinde kolaylıkla gözlenebilmektedir. Ayrıca, embriyonun hızlı büyümesi de çalışmaların başarılı olmasına imkan sağlar. Yumurtalar gen transferine uygun bir halde olup, yumurtadan yavru oluşumu için yumurtanın bir donör anne içerisine yerleştirilmesine ihtiyaç yoktur ve şeffaf olduklarından gelişimlerinin ilk saatlerinde mikroskop altında embriyoların hücre bölünmesini çalışmak mümkündür.

Sıçanlar, fizyolojik özellikleri ve ilaçlara karşı insanlara benzer cevap oluşturduklarından, erken ilaç toksisite testlerinin çoğu için fareden daha uygundur. Buna ilaveten, sıçanların büyük yapıları ameliyat ve fizyolojik deneyler için de uygundur. Bu uygunluk, özellikle diseksiyona ihtiyaç duyan veya ilaçların dokularla nasıl etkileştiklerini ve nasıl sindirildiğini açıklayan farmakokinetik durumlarda olduğu gibi, özel tip hücrelerin izolasyonu ve doku yapılarının çalışılmasında da önemlidir. Bu durum, sıçanlardan elde edilen çoğu toksikolojik veriler ile birleştirildiğinde, sıçanların ilaç metabolizması ve erken toksikoloji profillerinin belirlenmesi için model organizma olarak tercih edilmelerini sağlar.

Fare, balık veya sıçanların iyi test hayvanları olmadıkları zamanlar da vardır. Örneğin, akciğer ve kalp damar sistemlerinin insanlara benzemeleri, kalp hastalıkları ve akciğer bozukluklarının çalışılmasında köpeklerin daha çok tercih edilmelerine sebep olur. HIV/AIDS araştırmaları maymun ve şempanzelerde yürütülür, çünkü bunlar bu virüsün insanlarda oluşturduğu hasarları gösteren yegâne hayvanlardır. Kediler, köpekler ve primatlar (maymun ve şempanze gibi) biyolojik araştırmalar için önemli oldukları özel durumlarda kullanılmalarına rağmen, bu hayvanların kullanılma oranı araştırma hayvanlarının %1'inden azını oluşturur (çoğunlukla fareler kullanılır). Diğer yandan, az sonra tartışacağımız gibi alternatif test yöntemlerinin varlığı ve artışından dolayı son 20 yıldır bu hayvanların deneylerde kullanılmaları gittikçe azalmaktadır.

Hayvan Araştırmalarındaki Yasal Düzenlemeler

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration, FDA) tarafından konulan yasal düzenlemelere göre, yeni ilaçlar, medikal prosedürler ve hatta kozmetik ürünler, piyasaya sürülebilmelerinden önce güvenlik testlerinden geçmek zorundadırlar. Güvenlik testleri Tablo 7.1'de gösterildiği gibi **faz testleri** olarak bilinen son derece hassas bilimsel yöntemleri içerir.

Faz testinin bir parçası olarak FDA, üreticilerin böylesi ürünleri halka sunmadan önce, istatistiksel olarak yeterli sayıda denemenin hücre kültürlerinde ve aynı zamanda canlı hayvanlar ve gönüllü insanlar üzerinde yapılmasını zorunlu kılar.

Eğer hücre kültüründeki başlangıç testler toksik seviyenin tehlikeli olduğunu gösterirse, ürün asla canlı hayvanlarda test edilmez. Test edilecek hayvanın seçimi, insana genetik benzerliğine veya insandaki durumu taklit etme potansiyeline bağlıdır. Farklı hayvanlarda farklı etkiler oluşabileceğinden, bu testlerde iki veya daha fazla tür kullanılır. Toksisite veya beklenmedik hedef olmayan etkiler genel olarak insan genlerine homolog genleri olan birden fazla tür ile tespit edilebilir. Emilme oranı, özel kimyasal metabolizma ve maddenin salınması (vücuttan dışarı atılması) için gerekli zaman tamamıyla hayvan modellerde belirlenebilir. Eğer hayvan testlerinde önemli problemler belirlenirse, gönüllü insan araştırmaları asla yapılmaz. Çok nadir olmasına rağmen, beklenmedik sonuçlar olabilir; gönüllüler bilgilendirmenin bir gereği olarak bu risk durumundan haberdar edilirler.

Hayvanların Kullanımına Alternatifler

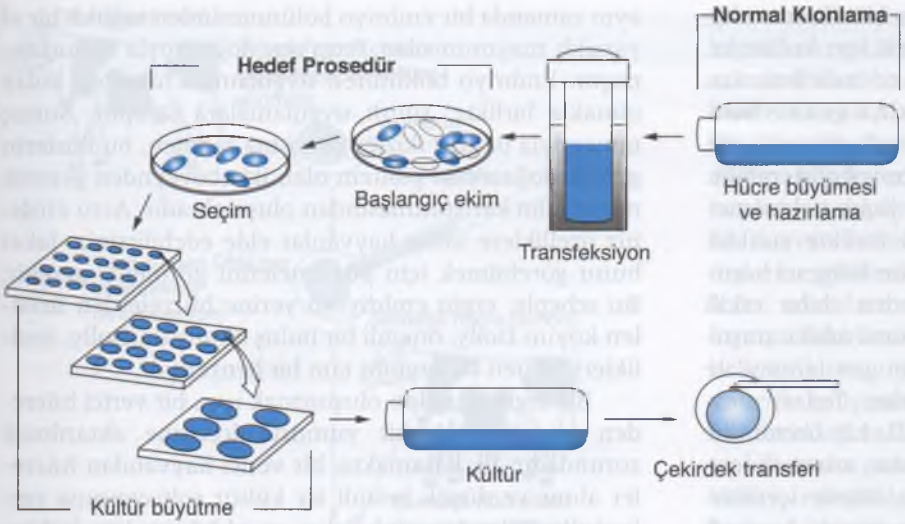
Başlangıç testlerde araştırıcılar mümkün olduğunca hücre kültürleri ve bilgisayar esaslı modeller kullanırlar. Bunların her ikisi de araştırma hayvanlarının kullanımından çok daha ucuz ve az süre gerektirir.

TABLO 7.1 İLAÇ ONAYI İÇİN GIDA VE İLAÇ DAİRESİNİN İHTİYAÇ DUYDUĞU FAZ DENEMELERİ

FDA faz testi, ilaçların insanlarda kullanımına müsaade edilmeden önce ön-klinik test için hayvanların kullanılmasını içerir. Yeni ilaç adayının toksik olmadığı ve faydalı olduğu ispatlandıktan sonra ödüllendirilir ve bu Araştırılan Yeni İlaç (AYİ) olur. Eğer üç faz insan testinde başarılı olunursa bir Yeni İlaç İzni (Yİİ) alabilir ve muhtemelen piyasa sürümü için onaylanır. FDA Yİİ için 2.5 yıl daha değerlendirmeye devam eder, böylece başarılı bir ilaç onayı toplam olarak 12 yıl alır.

	Klinik Öncesi Testler		Faz I	Faz II	Faz III		FDA		Faz IV
Yıllar	3.5		1	2	3		2.5	Toplam 12	
Test edilen	Laboratuvar hayvanları		20–80 sağlıklı gönüllü	100–300 hasta gönüllü	1 000–3 000 hasta gönüllü				
Amaç	Güvenlik ve biyolojik aktivite değerlendirmesi	FDA'ya AYİ başvurusu	Güvenlik ve dozu belirle	Etkiyi değerlendir ve yan etkilere bak	Etkileri teyit et, uzun süreli kulanımdan oluşan kötü reaksiyonları kaydet	FDA'ya Yİİ başvurusu	İşlem/ onay denetimi		Onay sonrasında FDA'nın ihtiyaç duyduğu ilave testler
Başarı oranı	5 000 bileşik değerlendirilmiş		5 deneme girişimi				1 onay		

Kaynak: www.fda.gov/cder/handbook/develop.htm



ŞEKİL 7.3. Nüklear Transfer için Doku Seçimi ve Hazırlanması Hedef hücreler eklenecek geni transfeksiyonla alır. Doğru eklemenin gerçekleştiği az sayıda hücre seçilir ve kültürde (in vitro) defalarca çoğaltılır. Her basamakta hücre kültüründeki somatik (vücut) hücrelerin kısa ömürlü olmaları nedeniyle azalma vardır. Sonunda kültürden nüklear transfer için uygun somatik hücre nükleusu elde edilebilir.

Daha önce de bahsedildiği gibi, hücre kültürü çalışmaları maddelerin toksisitelerini kontrol etmek için başlangıç taraması olarak sıklıkla kullanılırlar. Buna ilaveten, biyolojideki temel sorular genellikle hücresel seviyede delillerin toplanmasıyla iyi bir şekilde cevaplandırılırlar. Hangi bileşiklerin ilaç yapımında en iyi şekilde kullanılabileceği genellikle *in vitro* araştırmalarda anlaşılır (bakınız **Şekil 7.3**). Fakat daha önce de belirtildiği gibi, hücre kültürleri tüm canlı organizma üzerindeki etkiler hakkında bilgileri yansıtamaz.

Aynı şekilde bilgisayarlar da maddelerin özel moleküler ve kimyasal yapılarını ve bu yapıların organizma ile etkileşimlerini taklit etmek için kullanılırlar. Bilgisayar modelleri, gün geçtikçe oldukça büyük önem kazanırken, programlama kapasiteleri bilgisayarların avantajlarını sınırlandırmaktadır. Bilgisayarlar sayesinde ipuçları temin edilebilir, fakat son cevapları onlar veremezler. Canlı bir sistem üzerindeki etkiyi bilmedikçe, o sistemi taklit edebilen bir bilgisayar programı geliştiremeyiz. Bilgisayarlar verileri işleme ve sonuçlar ortaya çıkarmada mükemmel derecede yardımcı olurlar, fakat bu işlemleri gerçekleştirecek programlara sahip olmadıkça bunları yapmak mümkün olmaz. Buna rağmen, hayvanların araştırmalarda kullanılmalarını azaltırlar. Örneğin, daha önce bahsedilen finasteride ilacının etkisini test etmek için geliştirilen bir bilgisayar modeli, onun iyi bir ilaç olduğu hakkında açık bir bilgiyle sonuçlanırken, programcının daha sonra doğabilecek yan etkileri önceden bilmesi mümkün olmadığından, geliştireceği bilgisayar modelinin beklenmedik doğum kusurlarını bilmesi mümkün değildir.

Hayvan Araştırmaları Mevzuatı

Hayvan araştırmaları çok sıkı bir şekilde takip edilir. Hayvan Hakları Beyannamesi, araştırma hayvanlarının muhafaza edilmeleri, beslenmeleri, temizlenmeleri ve medikal uygulamaları hakkında özel standartlar oluşturmuştur. Hayvanların kullanıldıkları bir çalışmadan önce, araştırıcıların hayvanlara olan ihtiyaçlarını ispatlamaları gerekir. Aynı zamanda en uygun türü seçmeleri ve mümkün oldukça az hayvan kullanacakları bir plan oluşturmaları da beklenir. Araştırma devam ederken, kurum yetkilisi bir etik komite gözlemcisi ulusal ve uluslararası standartların uygulanıp uygulanmadığını denetler. İlgili devlet birimi düzenli olarak laboratuvarlardaki durumları kontrol eder. Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH), FDA veya Hastalıkları Kontrol ve Önleme Merkezi'nden araştırma desteği alabilmek için araştırıcılar Ulusal Bilimler Akademisi tarafından belirlenen '*Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Kılavuzu*'nda belirtilen standartları takip etmek zorundadırlar. Araştırma maliyeti göz önüne alındığında bu kurumlardan maddi destek zorunlu hale gelmektedir, böylece çoğu enstitü bu talimatları takip etmek için titizlik gösterirler. Araştırıcılar hayvan araştırmalarının 'Üç önemli madde'sini (biyoteknolojide hayvan kullanımı düzenlemeleri için Bölüm 12'ye bakınız) sağlamayı hedeflerler:

- Kullanılan yüksek türlerin (kediler, köpekler, kemiriciler) sayılarının azaltılması (*Reduce*).
- Mümkün oldukça hayvanların alternatif modellerle değiştirilmesi (*Replace*).
- Mümkün olduğunca en insani şartları oluşturacak test ve deneylerin araştırılması (*Refine*).

Veterinerlik: İnsan ve Hayvanlara Faydaları

Laboratuvarlarda yürütülen hayvan araştırmalarının tamamı, sadece insanların faydalanmaları için değildir. Hayatlarını hayvanlara adayan veterinerler de araştırmalarda önemli rol oynarlar. Veterinerlik kliniklerindeki araştırmalar, ev hayvanları için yeni kanser tedavilerine öncülük etmektedir. Hayvan ve insan kanserleri

genel anlamda benzer olduklarından, bir türden elde edilen bilgiler diğer türün iyileştirilmesi için kullanılır. Örneğin, insan göğüs kanserlerinin % 65'inde bulunan BRCA1 geni köpeklerde bulunan BRCA1 genine benzerdir. Ev hayvanlarındaki kanser terapilerine yönelik klinik denemeler, insan denemeleri için yol gösterebilir.

Hem köpekler hem de insanlarda yapılan denemeler, bir tümör bölgesine radyasyonla birlikte sıcaklık uygulamasının (hipertermiya), tümörün bölgesel kontrolünde sadece radyasyon tedavisinden daha etkili olduğunu göstermiştir. Duke Üniversitesi'ndeki araştırıcılar, katı tümörleri tahrip etmek için gen terapisi ile birlikte hipertermiya kullanmaktadırlar. Tedavi sırasında, tümör içerisine interlökin-12 (IL-12) üreten bir geni doğrudan enjekte ediyorlar. Daha sonra sadece tümöre sıcaklık uygulanıyor. Sıcaklık, tümör içerisindeki ısı-şok kontrol genini harekete geçirerek, kanserli dokuyu tahrip etmeye yardım eden IL-12'nin üretimini harekete geçirmektedir. Şu anda kediler üzerinde test edilen bu tedavi eğer başarılı olursa, aynı zamanda bu tümörün görüldüğü insanlar için de faydalı olur. Daha önce insan kültür hücrelerinde yürütülen denemelerle hızlı etki gösterdiği belirlenen bu yöntem için insan denemelerine geçilebilir.

7.2 Klonlama

Bir ergin hayvanın nükleusundan başka bir hayvanın üretilmesi, 1997'de koyun Dolly'nin bu yolla üretilmesiyle büyük bir bilimsel hamle olmakla birlikte, insanların da aynı şekilde klonlanabileceği tartışmalarını başlatmıştır. Burada, klonlamada rol oynayan yöntem ve konuları gözden geçireceğiz.

Dolly'i Oluşturmak: Klonlamada Büyük Hamle

Bütün yüksek hayvanlarda olduğu gibi, insan DNA'sı iki ebeveynden genler içerir. Genlerin karışımı şansa bağlıdır. Bunu ispatlamak için herhangi bir geniş ailedeki çocuklara bakmak gerekir; bazıları kıvırcık saçlı olurken bazıları düz saça sahiptirler, bazıları dillerini yuvarlayabilirken diğerleri bunu yapamazlar. Bir çocuk genetik bozukluğa sahip olurken diğeri olmaz. Bu belirsizlik klonlama ile ortadan kaldırılır. Bir hayvan üretmek için klonlama kullanıldığı zaman, sadece bir genetik rol oynayıcı vardır. Eğer donör koyun uzun yumuşak yüne sahipse klon kuzu da öyle olacaktır. Yavru tamamıyla ebeveyninin genetik programıyla aynı olacaktır.

Embriyo ikizlenmesi (embriyonun ikiye bölünmesi) klonlamada ilk basamaktı. İlk başarılı deney iki tane çok sağlıklı ikiz buzağı üretti. Bu uygulama günümüzde, verimli nesilden çok sayıda sığırın üretilmesinin avantajlı olduğu durumlarda, sığır endüstrisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Embriyo ikizlenmesi çabaları aynı zamanda bir embriyo bölünmesinden sağlıklı bir al yanaklı maymun olan Tetra'nın doğumuyla sonuçlanmıştır. Embriyo bölünmesi uygulaması nispeten kolay olmakla birlikte, sınırlı uygulamalara sahiptir. Sonuç tamamıyla benzer ikizler olmasına rağmen, bu ikizlerin gerçek doğası eski yöntem olan iki ebeveynden genetik materyalin karıştırılmasından oluşmaktadır. Arzu ettiğiniz özelliklere sahip hayvanlar elde edebilirsiniz, fakat bunu görebilmek için büyümelerini görmeniz gerekir. Bu sebeple, ergin embriyosu yerine hücrelerden üretilen koyun Dolly, önemli bir buluş olmuştur. Dolly, özellikleri bilinen bir erginin tam bir benzeriydi.

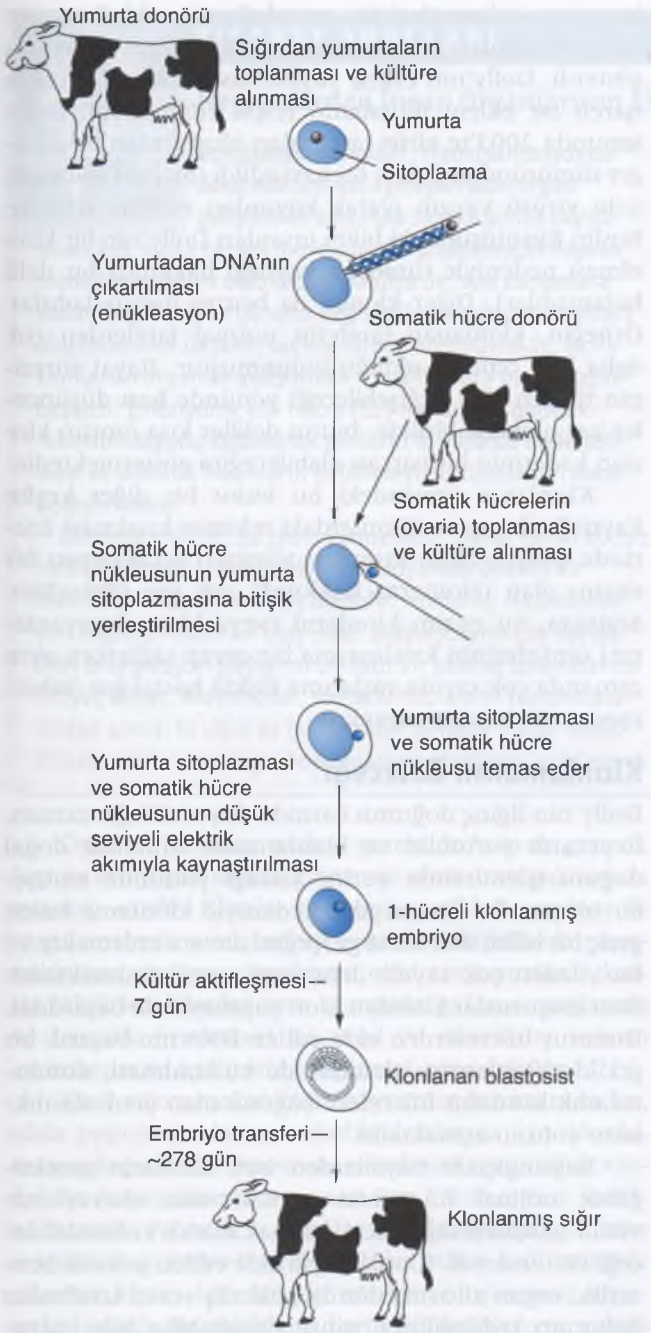
Bir erginden klon oluşturmak için, bir verici hücreden alınan DNA bir yumurta içerisine aktarılmak zorundadır. İlk basamakta, bir verici hayvandan hücreler alınır ve düşük besinli bir kültür solüsyonuna yerleştirilir. Hücreler canlı fakat aç oldukları için bölünmeyi durdurur ve aktif genleri susar. Verici hücreler daha sonra **Şekil 7.4'**te görüldüğü gibi alıcı bir yumurtaya aktarılmaya hazırdır.

Önce **nükleusun çıkartılmasıyla (enükleasyon)** yumurtanın kendisi hazırlanır. Yumurtanın nükleusundaki DNA kümesi bir pipetle nazikçe emilir. Araştırıcı daha sonra arzu edilen genetik karışımı yumurtaya aktaracak yöntemi seçer. Şekil 7.4'te ilgili bir yöntem gösterilmektedir. Honolulu tekniği olarak bilinen bir başka yöntemde, verici hücrenin nükleusu nükleusu çıkarılmış yumurta hücresinin ortasına direkt olarak enjekte edilmektedir. Hangi teknik kullanılırsa kullanılsın, mikroskobik hücrelerin çalışılması oldukça zordur.

DNA yumurtaya aktarıldıktan sonra, biyoloji rol oynamaya başlar. Yeni hücre bir ergin hücreden çok sanki bir embriyonik hücre gibi davranarak cevap verir. Eğer herşey yolunda giderse, tıpkı normal döllenmiş bir yumurta gibi hücre bölünmesi başlar. İlk bir kaç gün için, embriyo bir inkübatörde büyür. Daha sonra, yeni embriyo hazır olduğu zaman, gelişme için bir taşıyıcı anneye transfer edilir. Taşıyıcı, genetik verici ile genetik olarak aynı olan bir klon doğurur. Bu yolla başarılı olarak klonlanan türlerin listesi koyun, keçi, domuz, sığır ve gaur olarak adlandırılan asya yaban sığırını içerir.

Klonlamanın Sınırları

Klonlama teknolojisinin gücünün sınırları vardır. Birincisi, verici hücre canlı bir organizmadan gelmek zorundadır. Serbest dolaşan '*Jurassic Park*' dinazorları, muhtemelen bilimsel bir kurgu olarak kalacaktır. Bazı insanlar Sibirya'da keşfedilen donmuş mamutlardan toplanan hücrelerin klonlanabileceğini ve günümüzdeki filler kullanılarak büyütülebileceğini hayal etmektedirler. Bununla birlikte, çoğu uzman, canlı bir mamut hücresi bulma şansının, bunun klonlanabilmesinin ve bir fil veya uzak akrabaları kullanılarak doğurulabilmesinin gülünesi derecede uzak bir olasılık olduğunu düşünmektedirler.



ŞEKİL 7.4. Nüklear Transferle (Çekirdek Transferi) Klon Hayvan Üretimi Klonlama genellikle döllenmiş bir yumurtadan yumurta nükleusunun çıkartılmasıyla ve bir başka nukleus (muhtemel bir yetişkin hayvandan, bir inek) ile yerinin değiştirilmesiyle başlar. Eğer işlem başarılı olursa, arzu edilen özellikler yüksek başarıyla elde edilebilir. Başarı her zaman kolay değildir (çünkü özellikle, sığırlarda çalışıp çalışmadığını anlamak yaklaşık 278 gün alır!).

Klonların tam genetik eşler oldukları düşünülmesine rağmen, bunlar bazı yönleriyle atalarına tam olarak benzemezler. Hayvanlar genleri aynı olmakla birlikte, ikiz insanlarda olduğu gibi, deneyimleri ve çevresel etkileşimleriyle tamamıyla aynı olmayıp farklı kişiliklerle şekillenirler. Bu yüzden, hücreleri stoklayarak sevdikleri ev hayvanlarını yeniden üretmeyi planlayan insanlar hayal kırıklığına uğrayabilirler. Örneğin, bir köpeğin kişiliği önemli ölçüde onun aynı anda doğan kardeşleriyle ilişkileri ve hayatındaki olaylar tarafından şekillenir. Genetik olarak tamamıyla benzer bir hayvan üretebilmemize rağmen, köpeklerin davranışlarını şekillendirmeye yönelik olan önceki tecrübelerini tekrarlatmak mümkün olmamıştır. 2002'de Kaliforniya'daki Genetics Savings & Clone (GSC) Şirketinin, belirsizliklere rağmen, canlı bir hayvanı klonlamaya yönelik çalışmalarında bir kediyi başarılı bir şekilde klonladıklarına dair manşetler atılmıştır (**Şekil 7.5**).

Zorunlu genetik özelliklere sahip olmak için dikkatlice eşleştirilen yarış atları bile genetik dışındaki başka faktörler tarafından şekillenirler. Yarışma zevki ve kazanma isteği genetik olarak kodlanmayabilir. Bu sebepten dolayı yarış kazanacak bir at klonlamaya yönelik bir heyecan olmamaktadır.

Daha önemlisi, klonlama için günümüzdeki başarı oranı, gelişiyor olmasına rağmen, nispeten düşüktür. Dolly 277 girişimin sonucudur. Bunların tümü arasında sadece 29 tane suni döllenen embriyo 6 günden daha uzun süre yaşadı ve bu 29 embriyodan sadece



ŞEKİL 7.5. Klonlanan Kediler. 2004'de, New York'taki Kedi Sevenler Derneğinin / IAMS yıllık kedi gösterisinde, 4-aylık klon kediler olan Tabouli ve Baba Ganoush ve genetik vericileri olan Tahini tanıtıldılar. Bu Bengal kedileri Kaliforniya'da Genetic Savings & Clone of Sausalito Şirketi tarafından klonlandı.

Dolly doğdu. Klonlamaların başarısızlığı önemli bir haber olmamakla birlikte, çoğu durumda aslında araştırıcıların hedefi olmayan "hayvan montaj hattı" kurma gibi bir toplumsal korkunun önüne çekilen önemli bir settir. Bilim insanları hala klonlama sırasında meydana gelebilecek beklenmedik problemlerin bazılarını anlamaya çalışıyorlar. Çoğu klonlar genişlemiş dil, böbrek problemleri, bağırsak tıkanmaları, şeker hastalığı ve tendon kısalmalarından kaynaklanan sakatlıklar gibi kusurlarla doğar. Bunlara ilaveten, taşıyıcı anneler arasındaki ölüm oranı normal anneler arasındakinden daha fazladır. Bu karışık problemlerin hiçbirisinin oluşum şekilleri bilinmemektedir.

Çok daha ilginç bir problem de, klonun zamanından daha önce yaşlanmasıdır. Bu problem Dolly'nin hücrelerinin kendinden *daha yaşlı* olduğunun belirlendiği analizlerle anlaşıldı. Bu gözlem biraz açıklama gerektirir. Vücudunuzdaki her hücrenin kromozomları genetik yapınızı belirler. Kromozomun ucunda *telomer* adında çok sayıda tekrardan oluşan bir DNA iplikçiği bulunur (gözden geçirmek için Bölüm 2'ye bakınız). Her bölünmede hücreleriniz çoğaldıkça, telomerden bir tekrar kısalır. Bu durumda, canlı hücreler içerisinde gerçekte bir biyolojik saat vardır. Hücrenin kromozomal yaşı telomerlerinin uzunluğunu kontrol ederek okunabilir. Telomer tekrar sayısı azaldıkça, organizmada yaşlanma işaretleri görünür. Denemeler Dolly'nin telomerlerinin aynı yılda doğan diğer kuzulardan farklı olduğunu, bunlarınkinin yerine, yaklaşık olarak donör koyunun telomerlerinin uzunluğunda olduğunu ve Dolly'nin olması gerekenden 3 yıl daha yaşlı olduğunu gösterdi. Dolly'nin erken yaşlanmasının bir diğer olası işareti ise eklem iltihabının tespit edilmesiydi. Dolly sonunda 2003'te virüs tarafından oluşturulan bir akciğer tümöründen dolayı ötenazi edildi (bu özel solunum yolu virüsü yaygın olarak koyunları enfekte eder ve Roslin Enstitüsündeki bilim insanları Dolly'nin bir klon olması nedeniyle tümörün kaynağı hakkında bir delil bulamadılar). Diğer klonlar da benzer durumdadırlar. Örneğin, klonlanan farelerin normal farelerden çok daha kısa ömürlü olduğu bulunmuştur. Hayat süresinin türden türe değişebileceği yönünde bazı düşünceler var olmakla birlikte, bütün deliller kısa ömrün klonun kaderinin bir parçası olabileceğini göstermektedir.

Klonlama üzerindeki bu bulut bir diğer keşfin kaynağı olmuştur. Klonlardaki telomer kısalması üzerinde çalışan bilim insanları telomeri sentezleyen bir enzim olan telomeraz hakkında çok şey öğrendiler. Sonuçta, bu enzim klonların (veya klon olmayanların) ömürlerinin kısalmasına bir cevap sağlarken aynı zamanda çok sayıda yaşlanma ilişkili hastalığın önlenmesine de hizmet edecektir.

Klonlamanın Geleceği

Dolly'nin ilginç doğumu basında duyurulduğu zaman, heyecanlı yorumlar ve klonlamanın dünyada doğal doğum işlemlerinin yerini alacağı yönünde endişeler oluştu. Bu ön yargılar nedeniyle klonlama halen genç bir bilim dalı olma gerçeğini devam ettirmekte ve bu yüzden çok sayıda deneylere maruz kalmaktadır: Bazı araştırıcılar klondan klon yapmayı bile başardılar. Donmuş hücrelerden elde edilen DNA'nın başarılı bir şekilde klonlanma işlemlerinde kullanılması, dondurularak korunan hücrelere bağımlı olan yeni olasılıkların yolunu açmaktadır.

Başlangıçtaki hayallerden biri, klonların gerektiğinde orijinal hücrelerin vericisi olan ebeveynlere vücut parçaları sağlayacak kaynak olarak kullanılabileceği yönündeydi. Klonlamayla elde edilen genetik benzerlik, organ alıcısına dönüştürülmüş verici tarafından dokunun reddedilmesi şansını azaltabilse bile, transplant organ eksikliği problemine pratik bir çözüm değildir. Böylesi bir uygulama hakkında var olan etik sorunların ötesinde, klonların organ bağışlayacak kadar yeterli olgunluğa erişebilmesi uzun yıllar alacaktır. Daha çok ümit vaat edecek biyoteknolojik çözümler önümüzde beklemektedir: Uygun transgeniklerin kullanılması ile diğer türlerden organların kullanılması olan ksenotransplantasyonun gelecek 5 yıl içinde canlı organların kaynağı olacağı beklenilmektedir. (Ksenotransplantasyon daha detaylı bir şekilde Bölüm 11'de tartışılacaktır). Diğer bilim insanları hücre kültürlerini kullanarak iribaş kurbağadan sığıra kadar çeşitli hayvanlar için transplant deri, göz ve gelişmemiş böbrek büyütülmesi gibi erken başarılar elde etmişlerdir.



KARARI SİZ VERİN

Genetik Koruma ve Klon

2002'de Kaliforniya'daki Genetics Savings & Clone (GSC) Şirketi bir kediyi: Cc (karbon kopya) başarılı bir şekilde klonladığı zaman olayın haberi manşetten verildi. Daha sonra iki kedi daha klonladılar, Baba Ganoush ve Tabouli (Şekil 7.5).

2004'te şirket klonlanan kediyi Teksas'ta bir kadına sattığında tekrar haber oldular. Dahası, GSC herhangi bir kediyi 50 000 dolara klonlayacağını belirtti. Bir kaç yıl içerisinde GSC fiyatı 32 000 dolara indirdi ve 2006'nın sonlarına doğru, yıl sonunda klonlamayı bitireceğini ve kedi klonlama için depozit veren herkesin parasını iade edeceğini duyurdu. Ticaretteki altı yıldan sonra, GSC 5 kedi klonladı ve bunların sadece 2 tanesini sattı. Pek çok kişi klonlama ücretini dikkate alarak klonlanan ev hayvanlarının bir şirket için karlı bir iş olup olmadığını sordu. Bir kısmı da insan zevki için, ölen bir kedinin genetik olarak bir benzerinin yapılmasının etik olup olmayacağını sordu. Siz ne düşünüyorsunuz? Eğer evinizdeki bir hayvan ölürse ve eğer imkan dahilinde ise benzer bir klonu satın almak ister misiniz? Kararı siz verin.



TİCARET ARAÇLARI

Hayvanlardan İnsan Organlarının Elde Edilmesi?

Son zamanlara kadar, transplantasyonda doku reddine yol açmayan klon organ geliştirmek amacıyla sadece sınırlı sayıda insan kök hücre hatları mevcuttu. Bu problem için hayvan modellerin çözüm olabileceği görülse de, son zamanlara kadar, hayal edilen genetik değişikliklere sahip memelileri oluşturabilme başarısı sadece farede mümkün oldu. Dolly klonlanan organlar geliştirmek için alternatif bir yaklaşım başlattı: Embriyonik kök hücre (ES) hatlarında genetik rekombinasyonu kullanarak genlerin in vitro'da hedeflenmesi ve somatik hücrelerin bölünmeyi durdurmadan önce değiştirilmesi.

Bununla birlikte, bu işlem karmaşıktır: Hedef genin etkisiz hale getirilmesi, hayvan biyoteknolojisinde önemli bir tekniktir, fakat işlem kolay değildir. Homolog rekombinasyon nispeten nadir bir olay olup, araştırıcıların çok sayıda DNA entegrasyon olaylarını dikkatli bir şekilde taramalarına ihtiyaç duyar. Araştırıcılar, somatik hücrelerin toplanmalarından sonra, in vitro'da bu hücreleri genetik olarak değiştirmek, nadir homolog rekombinasyon olaylarını izole etmek için yeterli süre bu hücreleri yetiştirmek ve Şekil 7.3'de görüldüğü gibi nükleus transferi için kullanılabilen bu hücrelerden bir embriyoyu yeniden yapılandırmak zorundadırlar. Eğer yeniden yapılandırılan bu embriyo yeterli süre yaşayabilirse, ancak o zaman genetik değişiklik gerçekleştirilebilecektir.

PPL Therapeutics'teki araştırmalarda, domuzdan insana organ naklinin önemli derecede reddine sebep olan domuzlardaki bir gen çıkartılarak bu teknolojide önemli bir ilerleme sağlanmıştır. Ortak bir karbonhidrat yapısı, bazı primatlar (insanlar, insansı maymunlar ve Eski Dünya maymunları) dışındaki bütün memelilerin hücrelerinin yüzeylerinde bulunur. Bu yapının varlığı α (1,3) galaktosidaz geninin sonucudur. İnsan hücreleri bu gene sahip değildir ve organ yüzeylerindeki fonksiyonunu bir antijen gibi algılar. Bunun sonucunda insanlar yabancı karbonhidratı reddedecek kadar büyük miktarda antikor üretirler. Eğer bilim insanları bu geni (ve diğer muhtemel doku reddi alakalı genleri) in vitro'da nasıl etkisiz hale getireceklerini öğrenirlerse, ihtiyaç duyulan verici insan organlarını bol miktarda üretebilirler.

Öyle ise klonlar neden gereklidir? Aynı genetik yapıya sahip çok sayıda hayvanın olmasının çok sayıda avantajı vardır. Klonlar benzer genetikleri nedeni ile uygulamaların sonuçlarının genetik farklılıklardan kaynaklanma endişesi olmaksızın tıbbi araştırmalarda kullanılabilirler. Klonlar aynı zamanda gelişme, yaşlanma ve hastalık üzerindeki hücresel ve moleküler sırların aydınlatılması için özel bir açılım oluşturabilirler.

Nesli tükenmekte olan hayvanlar konusunda ise, ıslah populasyonlarının sürdürülebilmesi için klonlamanın değerlendirilmesinde neredeyse zorunluluk vardır. Bu hayvanların korunması için klonlamanın kullanılmasına yönelik adımlar atılmaktadır. Türler arasındaki embriyo transferi Afrika yaban kedileri (*Felis silvestria libyca*) için taşıyıcı anneler oluşturmak amacıyla başarılı bir şekilde kullanılabilmiştir. Asya yaban sığırı yavrusu olan Noah evcil bir taşıyıcı sığırdan doğan bir klondur. Noah daha sonra klonlama işleminden bağımsız bir enfeksiyonla öldü. Bu hayal kırıklığına rağmen, siyah ayıların konak olarak kullanıldığı panda klonlanma çalışmaları şu an sürdürülmektedir.

7.3 Transgenik Hayvanlar

Bitki biyoteknolojisi ile ilgili transgenikleri daha önce (Bölüm 6) görmüştük. Bir organizmaya yeni genetik materyallerin aktarılması işlemi bitkilerle sınırlı değildir ve hayvanlar üzerinde de kullanılabilir. Bakteriyel (prokaryotik) kaynaklar ve diğer kaynaklardan üretilen proteinler arasındaki farklılıkların bazılarını görmüştük (Bölüm 4). Proteinler arasındaki yapısal farklılıklar çok az olduğundan, hücre ve hayvan kültürleri uygun yapılar için ihtiyaçlara iyi çözümler sunmaktadır. Biyoteknolojideki en heyecan verici gelişmelerin bazıları hayvanlardaki transgenik araştırmaların sonucudur.

Hayvan transgeniklerindeki ilk deneyler hücresel seviyede yürütülmüştür. Yeni bir gen kültürdeki bir hücreye ilave edildi ve bu hücredeki etkisi gözlendi. Klonlama teknolojisi kullanılmaya başlanılınca, transgenikler yeni bir hız kazandı. Tek bir hücreyi değiştirme yerine, genler çok sayıda hücrelere ilave edildiler. Daha sonra bu hücreler arzu edilen genleri hangilerinin taşıdığını keşfetmek için taranır. Bu hücreler seçildikten sonra, klonlama teknolojisi kullanılarak her bir hücre tam bir hayvan büyütmek için kullanılabilir (bakınız Şekil 7.5).

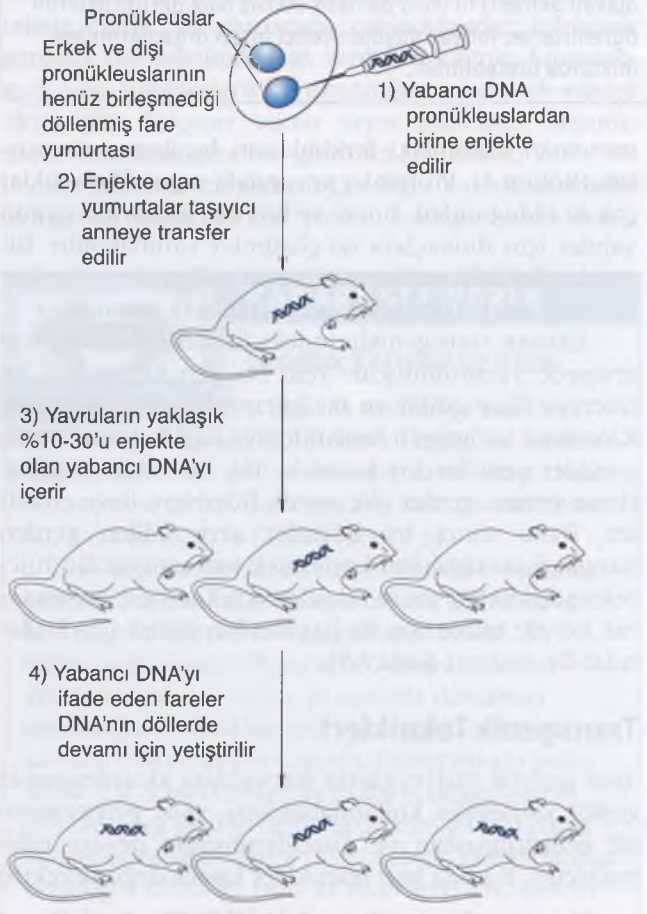
Transgenik Teknikleri

Yeni genetik materyallerin hayvanlara aktarılmasında çeşitli yöntemler kullanılabilirken, yeni yöntemlerin de geliştirilmesine ve düzenlenmesine devam edilmektedir. Burada bazı tekniklere kısaca değinilecektir:

- **Retrovirüs-esaslı transgenikler,** embriyo aşılanmadan önce fare embriyosu retrovirüslerle enfekte edilerek gerçekleştirilir. Retrovirüs yeni DNA için bir vektör gibi iş görür. Bu yöntem **transgen**in (veya *transfer edilen genetik materyal*in) büyüklüğü ile sınırlıdır. Diğer yandan, virüsün

kendi genetik materyali enfeksiyon işleminde etkinleşebileceğinden ve oluşacak transgeniklerin hedefsiz ve yanlış olmasına sebep olabileceğinden, bu tip uygulamalar sınırlıdır (retrovirüsler Bölüm 3'de tartışılmıştır).

- **Pronüklear mikroenjeksiyon yöntemi**, zigotun (döllenmiş yumurta) gelişiminin mümkün olan en erken basamağında, zigota transgen DNA'nın aktarılmasıdır. Sperm ve yumurta hücreleri birleştikleri zaman, DNA ya spermin veya yumurtanın nükleusuna direkt olarak enjekte edilir. Yeni DNA direkt olarak enjekte edildiğinden vektöre ihtiyaç duyulmaz; böylece retrovirüslerle enfeksiyon durumunda olduğu gibi işlemi karıştıracak harici genetik dizi olmayacaktır (bakınız **Şekil 7.6**).
- **Embriyonik kök hücre yöntemi**nde, ES hücreler blastosistlerin çevrelediği sıvı ortamdan toplanırlar. Daha sonra, bu hücreler rekombinant yöntemler kullanılarak oluşturulan DNA ile karıştırılırlar. ES hücrelerin bazıları, rekombinat DNA'yı içlerine alır ve yeni genetik materyal sayesinde değiştirilirler. Genetik olarak değiştirilmiş hücreler daha sonra bir konak blastosistinin iç kısmındaki hücre kitlesine enjekte edilirler.
- Benzer bir yöntem olan **sperm-esaslı transfer,** DNA'yı sperm hücrelerine tutturmak için 'bağlayıcı proteinler' kullanır. Sperm hücresi bir yumurtayı döllediği zaman, önemli genleri kendisi ile birlikte içeriye taşır.
- Son yöntem olarak, gen transferi için hayvan hücrelerinde gen tabancaları da kullanılabilir (bakınız Bölüm 6).



ŞEKİL 7.6 Pronüklear Mikroenjeksiyonla Klonlama Pronükleuslardan (döllenmede birleşen dişi ve erkek pronükleuslar) biri içerisine DNA'nın enjeksiyonu ve böylece dahil edilen yeni DNA'yı bulunduran klonları üretmek için kullanımı.

Tarımsal Üretimin Transgeniklerle Artırılması

Araştırıcılar evcil hayvanların verimliliklerini artırmak için gen transferini kullanırlar. Daha hızlı büyüme veya daha yavaş büyüme oranlarından sorumlu olan genler transfer edilerek, hayvanlar piyasaya daha hızlı sunulabilirler. Bu işlem seçici iyileştirme olarak bilinmektedir. Seçici iyileştirme tartışmalı olmasına rağmen, düşük maliyette besin kaynaklarının artışını sağlar.

Geleneksel melezleme tekniği, yıllardan beri piyasaya üretim seviyesi yüksek ve maliyeti düşük tavukların civcivlerden hızlı bir şekilde üretilmeleri için kullanılmaktadır. Son zamanlarda, üreticiler civciv oluşumundan itibaren 42 günden daha az sürede piyasaya sürülecek hale gelen tavukların, yumurta üretmediğini keşfettiler. Eti için yetiştirilen tavukların hedefi yumurtlama olmamasına rağmen, yumurta kuluçkalama olmaksızın tavukların yetiştirilmesi mümkün değildir. Tavukların böylesine hızlı üretilmeleri tartışılan bir durumdur. Bununla birlikte, yoksulluk ve gıdaların yetersizliği daha ucuz tarımsal yöntemlerin keşfedilmesini gerekli kılar. Her bir fazlalık gün ilave maliyeti ifade etmektedir. Amerikalılar yılda 10 milyar tavuk tüketmekte ve bu milyarlarca tavuğun üretilmesi için gereken süredeki herhangi bir azalma, üretici için önemli bir tasarrufu ve böylece tüketiciye yansımayı temsil eder. Bu olası tasarruflar hızlı büyüyen etçil hibrit tavuklardan elde edilecek genlerin, yumurtlayan hibritler tarafından üretilen yumurtalara aktarılmasına yönelik bazı güncel araştırmaları iştahlandırmaktadır. Bu araştırmalar sınırlı olsa da, bazı başarılar elde edilmiştir. Şimdiki denemeler endüstriyel ölçeklerde çalışabilecek yöntemlerin geliştirilmesi üzerinedir. Araştırıcılar gelecek bir kaç yıl içinde, yılda 30 veya 40 milyar tavuk embriyosuna arzu edilen özellikleri doğru bir şekilde enjekte edecek donanımları geliştirmeyi ummaktadırlar.

Yumurtaların kendileri de transgenikler aracılığıyla insan tüketimi için daha sağlıklı hale getirilebilirler. Yumurtalar ucuz, yüksek kaliteli protein kaynakları olmalarına rağmen, yüksek kolesterol içeriğinden dolayı çoğu insan onlardan uzak durmaktadır. Koleste-

rol üretiminden sorumlu genlerle oynanarak daha sağlıklı, düşük kolesterollü yumurtaların üretimleri sağlanabilir.

Aynı zamanda, süt endüstrisi de genetik gelişmelerin hedefindedir. Araştırıcılar süt üretimini artırmak, sütü protein bakımından zenginleştirmek ve yağ içeriğini azaltmak için transgenikleri kullanmaktadırlar. Bir transgenik boğa olan Herman (transgenik tekniği ve nükleus transferiyle üretilmiş) insan laktoferrin genini taşımaktadır. Bu gen insan sütünde bulunan yüksek demir içeriğinden (bebeklerin sağlıklı gelişmeleri için zorunlu) sorumludur. Herman'ın yavruları da laktoferrin geni taşımaktadırlar. Sonuç olarak, benzer şekilde insan poliklonal antikorları sığır plazmasında üretilebilirler (bakınız **Şekil 7.7**) ve Herman'ın yavruları çocuklar tarafından tüketilen en uygun sütü üretebilen ilk sığırlar olabilirler.

Bir başka gelişme, besin amacıyla yetiştirilen hayvanlardaki hastalıkların azaltılmasıdır. İngiltere'de 2000 yılında meydana gelen şap hastalığı epidemisi sırasında süt hayvanları ve et sığırları ile birlikte koyun ve keçi sürüleri de imha edildi. Tüm sürülerin yok olmaları çiftçiler ve ülkenin tarım endüstrisi için mahvedici oldu. Amerika Birleşik Devletleri'nde, şap hastalığının yayılma endişelerinden dolayı, hastalık taşısın veya taşımasın, İngiltere'den ithal edilen tüm koyunlara el konularak imha edildiler. Gelecekte hastalıkların yayılmasının korkusuyla panikleyen araştırıcılar, hastalık önleyici genler üzerinde çalışarak şap hastalığına dayanıklı hayvanlar geliştirmeyi ümit etmekteler. Benzer işlemler bir gün domuzlarda kolera ve tavuklardaki Newcastle hastalığının önlenmesine de yardım edebilir.

ABD Tarım Bakanlığı'nın Maryland'deki araştırıcıları genetik mühendisliği yöntemleriyle bakteriyel enfeksiyonla süt bezlerinde oluşan bir iltihap olan mastitise dayanıklı süt sığırları oluşturmaya başladılar. *Staphylococcus aureus* gibi bakteriler, meme bezlerini enfekte ederek aşırı derecede bulaşıcı olurlar ve bunun sonucunda süt endüstrisinde milyarlarca dolarlık kayıplara yol açarlar. Bilim insanları, *S. aureus*'a yakın bir tür olan *S. simulans*'ın *S. aureus*'u öldüren liyostafin adlı bir proteini kodlayan genini içeren transgenik sığırlar oluşturdular. İlk sonuçlar bu hayvanların mastitise karşı gerçekten dayanıklılık gösterdiklerini ortaya koydu. Fakat araştırıcılar dikkatli olmak zorundadırlar. Bilim insanları bu hayvanların *S. aureus* veya diğer mikroplara karşı tamamıyla korunmadıklarını ve sadece mastitise sebep olan bakteriye karşı ineklerin ilk anda dirençli olmalarına imkan sağladığını biliyorlar. Süt endüstrisinin bunu veya diğer oluşturulacak genetiği değiştirilmiş (GD) sığırları benimseyip benimsemeyeceği ileride görülecektir.

Kanada'nın Ontario şehrindeki Guelph Üniversitesi'ndeki araştırıcılar, son zamanlarda tükürüğünde fitaz



ŞEKİL 7.7 Sığırdan İnsanınkine Benzer Plazma Hastalar için insan plazması yeterli değildir ve insan kan faktörleri ve antikor genleri taşıyan klon sığırlardan temin edilebilir. Bu genleri taşıyan insan yapay kromozomları daha önce açıklanan yöntemlerle (Bölüm 4) başarılı bir şekilde transfer edilmişlerdir.

enzimi bulunan **EnviroPig** adında bir transgenik domuz geliştirdiler. Bu domuz, transgenik olmayan domuzlara oranla idrar ve dışkısında daha az fosfor oluşturduğundan çevre dostu olarak bilinir. Fosfatlar domuz çiftliklerinde oluşan ana kirleticilerdir. Fitaz domuz, besinindeki fosfatı parçalayarak fosfat atık miktarında yaklaşık % 30 azalmaya sebep olur.

Sofralarımıza ulaşan besinlerin güvenliği de aynı zamanda transgenik teknolojisiyle geliştirilebilir. İnsan besin zehirlenmeleri, çiftlik hayvanlarına antimikrobiyal genlerin transferiyle gelecekte azaltılabilir. Her yıl Amerika Birleşik Devletleri'nde gerçekleşen binlerce ölümü azaltabileceğinden bu uygulamalar tarımda daha az antibiyotik kullanılması anlamına gelir. Antibiyotik-

lerin gereksiz kullanımları *Salmonella*, *Listeria* ve *Escherichia coli*'nin dirençli suşlarının gelişmesine sebep olduğundan, bu güzel bir gelişmedir.

Araştırıcılar, aynı zamanda dünyadaki fakirlik ve açlığa daha iyi hizmet edebilmek için hayvanların transgenik olarak değiştirilmelerine yöneldiler. Çoğu bölgelerde, ekilebilir alanlar sınırlıdır ve hayvanların otlamaları için çok az alan ayrılmıştır. Bilim insanları daha verimli otlayıcı hayvanların geliştirilmesi problemine yönelmişlerdir ve böylece aynı alanda daha fazla hayvan yetiştirebilirler. Bu amaçla evcil hayvanlar için elverişli olmayan yerlerde otlayabilen Afrika antilopları gibi yabani otlayıcı hayvanların genetik yapılarına bakmaktadırlar. Aynı zamanda daha az besin tüketmesine rağmen çift sürme gibi daha ağır işler yapabilen sığırlar üretmek de mümkündür. Bilim insanları evcil hayvanları geliştirmeye yönelik çalışırken, aynı zamanda geleneksel evcil hayvanların ırklarının genetik yapılarının belirlenmesi ve korunmasını da dikkate almaktadırlar.

Biyoreaktörler Olarak Transgenik Hayvanlar

Tekrar hatırlamak gerekirse, proteinler önemli biyoteknolojik ürünler olup tüm hayvanlar bu proteinleri üretebilecek 'biyoreaktörler' gibi iş görebilirler (Bölüm 4). Bir hayvan biyoreaktörü şöyle çalışır: Birincisi, arzu edilen bir proteinin geni transgenikler aracılığı ile hedef hücreye yerleştirilir. İkincisi, klonlama teknikleri kullanılarak, hücre yetişkin bir hayvan olmak için büyütülür. Aynı zamanda, süt veya yumurta üreten bu yetişkin, yerleştirilen gen sayesinde arzu edilen bu protein bakımından zengin olur.

Bu teknolojinin uygulamasına iyi bir örnek olarak kurşun geçirmez yelek ve ameliyathanelerde dikiş ipliği olarak kullanılabilen Biyosteel adında bir ürün verilebilir. Aslında, Biyosteel dünyada en kuvvetli iplik olan örümcek ipeği proteininden yapılır. Geçmişte, örümcek tarafından bu ipeğin üretimi çok az olduğundan, örümcek ağı iyi bir endüstriyel ürün değildi. Transgenikler sayesinde, artık örümcek ipeği proteinlerinin kaynağı sadece örümcekler değildir. Örümcek ipeğini üretmeyi sağlayan gen, başarılı bir şekilde keçilere klonlanmış ve bu yeni gen onun yavrularına geçebilmiştir. Artık 'ipek-süt' üreten keçi sürüsü mevcuttur. Bu biyoreaktörleri herhangi bir şekilde kontrol etmeye gerek yoktur. **Şekil 7.8**'de görüldüğü gibi bu keçiler, ot, saman ve arpa yerler ve doğal olarak örümcek ipeği yapabilen proteinler üretirler. İpek proteini, daha sonra keçi sütünden saflaştırılır (protein saflaştırma yöntemlerini hatırlamak için Bölüm 4'e bakınız) ve kurşun geçirmez bazı malzemeler ve diğer ürünlerin yapılmasında kullanılır.

Transgenik hayvanlar, aynı zamanda terapötik proteinlerin üretilmeleri için de kullanılırlar. İnsanlarda *ATryn* adında bir gen, kan pıhtılaşmasını önleyici bir maddeden sorumludur. Bu yüzden, doğum veya ameliyat sonrası veya öncesi tromboembolizmin önlenmesini sağlayan bu gen, genetik kusurlu olan hastalar için gereklidir. Transgenik keçi (GTC) geliştiren bir şirket, *ATryn* genini süt ile ilişkili promotörlere bağlayarak, gen ürününün sütle beraber ifade edilmesini sağladı. Transgenik yöntem terapötik proteinlerin sentezi için kullanılan diğer kompleks yöntemlerden daha hızlı, daha güvenilir ve daha ucuzdur. Ürünün kullanımı 2009'da FDA tarafından onaylanmıştır. Bu durum, toplumda antitrombin eksikliğine sahip *ATryn* ile iyileştirilebilecek hasta sayısı çok fazla olmamasına rağmen, ameliyathanelerde antitrombinin başka



ŞEKİL 7.8 Sütlerinde Kıymetli Proteinler Üreten Transgenik Keçiler Keçiler, sığırlar ve tavukları kapsayan transgenik hayvanlar protein üretimi için düşük ürün ve üretim maliyeti avantajı sunarlar.

uygulamalarının olabileceğini göstermektedir. Biyoreaktör hayvanların kullanıldığı bu transgenik sistem nispeten ucuzdur ve büyük miktarda ihtiyaç duyulan diğer proteinler (monoklonal antikorlar gibi) için de geliştirilmesine çalışılmaktadır.

Araştırıcıların neden genellikle keçileri kullandıklarını merak edebilirsiniz. Keçiler, sığırlardan daha hızlı büyür ve yetiştirilmeleri daha ucuzdur. Fazla miktarda süt üretebilmelerinden dolayı, transgenik ürün geliştirme bakımından mükemmel tercihtirler. Pek çok hastalık transgenik hayvanlardan elde edilebilen yüksek miktarda rekombinant proteinlerle kısa sürede iyileştirilebilir. Gen terapisi yaygın olarak kullanılmaya başlanılıncaya kadar, transgenik esaslı terapötik proteinler hemofili gibi genetik bozukluklarda gen terapisi için en cazip seçenektir. Hemofili hastaları fonksiyonel pıhtılaşma proteini olan antitrombinIII'ten mahrumdur. Bu protein, transgenik keçilerde üretilmekte ve FDA onayı için test edilmektedir. Terapötik kompleks proteinlerin üretimi için transgenik hayvan biyoreaktörlerinin kullanılmaları, düşük üretim maliyeti, yüksek üretim kapasitesi ve hastalık etkeni içermeyen daha güvenli ürünlerin oluşturulmasını sağlar.

Biyoreaktör hayvanlar, sadece süt üreten hayvanlar değildir. Yumurtalar da biyoteknolojik ürünlerin üretildikleri bir başka verimli yöntemdir. Kümes hayvanları verimli bir üretim sistemine sahip olduklarından, küçük bir hayvan sürüsünden kısa sürede binlerce yumurta üretmek mümkündür. Bir tavuk yılda ortalama 250 yumurta üretir. Her yumurta beyazı yaklaşık 3.5 gram protein içerir ve yumurta beyazının küçük bir kısmının bile rekombinant protein ile yer değiştirmesi aşırı derecede verimli 'tavuk biyoreaktörü' oluşturur. Lizozim ve zayıflatılmış virüs aşıları gibi bazı tıbbi ürünler halen yumurtalardan elde edilmektedirler.

Nakavtlar: Transgeniklerin Özel Bir Durumu

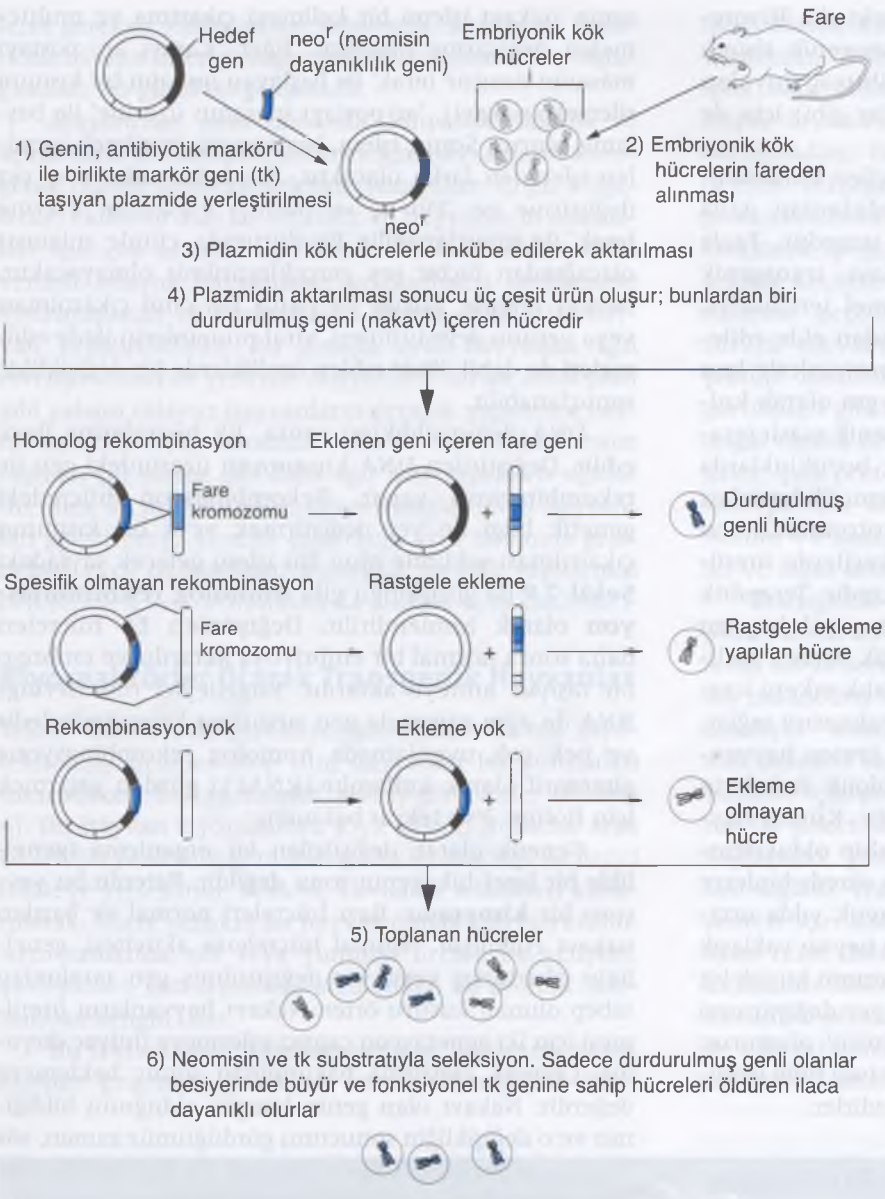
Gen ilave edilmesi transgenik hikâyesinin sadece bir yanıdır; bir genin etkisi aynı zamanda yok edilebilir de. Araştırıcılar bir gen çıkartıldığı zaman ne olacağını daha iyi anlayabilmek için nakavt fare adında transgenik fare ile çalışırlar. **Nakavt**lar özel bir gen çıkartılarak genetik olarak değiştirilirler. Bu durumu basitçe ifade etmek gerekirse, aktif bir gen herhangi bir fonksiyonel bilgi taşımayan DNA ile değiştirilir. Bir gen gereksiz bir DNA'yla değiştirildiği zaman, gen tarafından kontrol edilen özellik hayvandan çıkartılmış olur.

Nakavt fare, özel olarak DNA'sı değiştirilen embriyonik kök hücreleri ile başlar. Rekombinant teknikler kullanılarak DNA'nın özel bir kısmının kesilip atılmasıyla genetik kodda bir eksilme oluşturarak veya DNA'nın küçük bir parçasını fonksiyonu olmayan bir DNA ile değiştirerek hazırlanır. Eğer DNA'yı kelimelerin düzenlenmesinden oluşan bir cümle gibi düşünürseniz, nakavt işlemi bir kelimeyi çıkartma ve muhtemelen değiştirme olacaktır. Eğer 'Kapıyı aç, postayı masanın üzerine bırak' ile başlayan mesajın bir kısmını silersek (nakavt), 'aç postayı masanın üzerine' ile başlamış oluruz. Sonuç işlem, başlangıçta üretilmek istenilen işlemden farklı olacaktır. Farklı bir nakavt ve yer değiştirme ise 'Fili aç ve postayı masasının üzerine bırak' ile sonuçlanabilir. Bu durumda, cümle anlamsız olacağından hiçbir şey gerçekleştirilmiş olmayacaktır. Benzer şekilde, küçük bir parça DNA'nın çıkartılması veya yerinin değiştirilmesi, viral proteinlerin ifade edilmeleri de dahil, ifade edilen özelliklerde bir değişiklikle sonuçlanabilir.

DNA değiştirildikten sonra, ES hücrelerine ilave edilir. Değiştirilen DNA kromozom üzerindeki gen ile rekombinasyon yapar. Rekombinasyon hücredeki genetik bilgi ile yer değiştirmek veya bir kısmının çıkartılması şeklinde olur. Bu işlem gelecek sayfadaki **Şekil 7.9**'da görüldüğü gibi **homolog rekombinasyon** olarak isimlendirilir. Değiştirilen ES hücreleri daha sonra normal bir embriyoya aktarılır ve embriyo bir taşıyıcı anneye aktarılır. Engelleyici (interfering) RNA da aynı zamanda gen susturma kapasitesindedir ve pek çok uygulamada homolog rekombinasyona alternatif olarak kullanılır (RNAi'yi gözden geçirmek için Bölüm 2'ye tekrar bakınız).

Genetik olarak değiştirilen bir organizma (genellikle bir fare) hikayenin sonu değildir. Farenin bu yavrusu bir **kimera**dır. Bazı hücreleri normal ve bazıları nakavt edilmiştir. Normal hücrelerin aktivitesi, genellikle çıkartılmış veya yer değiştirilmiş gen tarafından sebep olunan kusuru örter. Nakavt hayvanların üretilmesi için iki generasyon çapraz eşleşmeye ihtiyaç duyulur. Genetik araştırma bakımından sonuç beklemeye değerdir. Nakavt olan genin hangisi olduğunu bildiğimiz ve o değişikliğin sonucunu gördüğümüz zaman, söz konusu genin görevi hakkında açık bir fikir sahibi oluruz. Bir gen hasar gördüğü veya olmadığı zaman, açıkça ne olduğunu görmemiz tip I şeker hastalığı, kistik fibroz, kas erimesi ve Down sendromu gibi konağın genetik bozuklukları hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar. Bunun en güzel örneklerinden biri göğüs kanserli faredir. Bu fare 1988'de Harvard Üniversitesi bilim insanları tarafından patentlenmiş ve yeni göğüs kanseri ilaçlarının denenmesi ve tedavisinde (bu teknoloji araştırıcılara çok az veya maliyetsiz olarak sunulmaktadır) yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Göğüs kanserli farede yeni tedavilerin denenmesi ve insan hastalardan daha çok tercih edilmeleri, çok sayıda kanser hastasını saatlerce gereksiz acı çekmekten kurtarmıştır.

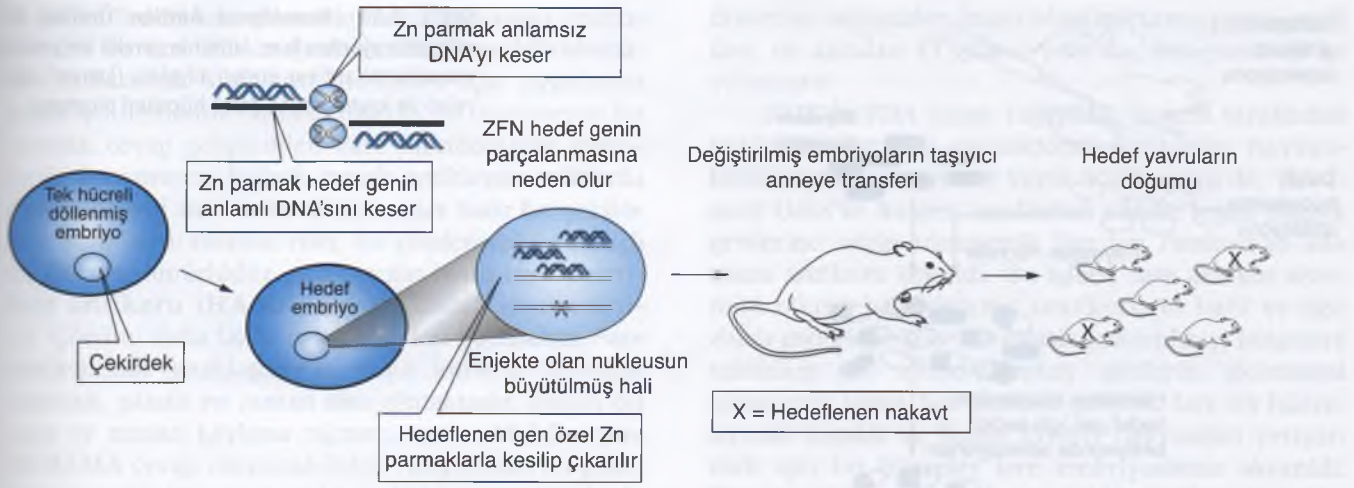
Günümüzde yaygın bir yaklaşım nakavt ve **nak-in** hayvanlarda potansiyel bir ilaç ürününün etkisinin karşılaştırılmasıdır. Hayvanlar, kendi genine benzer bir insan geni ile genlerinin homolog rekombinasyonla yer değiştirmeleriyle nak-inler oluşturulabilirler. Nakavt



ŞEKİL 7.9 Nakavt Fare Nasıl Yapılır Bir markör genin (neomisin dayanıklılık) homolog rekombinasyonla hedef fare geni içerisine transferi, fare geninin görevini durdurarak bu gen için seçime izin verir. Eklenen gene sahip hücreler DNA sentezi sırasında değişen bir nükleotid varlığında öleceklerinden antibiyotiğe dayanıklı transformantları seçmek için timidin kinaz (tk) kullanılır. Seleksiyondan sonra, tahrip olan gene sahip hücreler bu geni "nakavt olan" farelerde üretmek için fare embriyosuna aktarılabilir. Benzer yöntemlerle bir başka geni (bir insan geni gibi) "nak-in" yapmak ve bu geni bir deney hayvanında test etmek mümkündür.

bir farede gen ürünü mevcut olmadığından ilacın etkisi ya hiç olmaz veya minimum olurken, nak-in farede insan geninin varlığından dolayı etki meydana gelecektir. Eğer etki nakavt hayvanda görünürse, genin yanlış yerleştiğini ve aday ilacın muhtemel yan etkisini ifade edebilir (insanlarda denemeye gerek kalmaz).

Şimdiye kadar, fare ve zebra balığı nakavt hayvanlar olarak yaygın bir şekilde kullanılmışlardır. Nakavt primatlar üzerinde de araştırmalar yapılmaktadır. Muhtemel birçok değerli hayvan modeli geliştirmeye yönelik ilk adımlar, genetiği değiştirilmiş maymunlarda sonuç vermiştir. Portland'daki Oregon Sağlık Bilimleri Üniversitesi Oregon Bölgesel Primat Araştırma Merkezi'ndeki araştırıcılar, yeşil floresan protein (GFP) genini ANDi (dâhil olan DNA yazılışının tersten okunuşu) adında bir al yanaklı maymuna aktardılar. Orijinal olarak bir denizanasından alınan GFP geni, ANDi'nin karanlıkta ışımasına sebep olmaz tabii ki ve ANDi tam bir normal al yanaklı maymun gibi görünür. ANDi'nin hücrelerindeki 'parıltı'yı görmeyi ancak özel bir mikroskop sağlar. İnsanlara önemli biyolojik benzerliklere sahip olmalarına rağmen (bakınız 'Kararı Siz Verin: Maymun Nakavtlar'), maymunların nakavt araştırmaları için kullanılmaları fikrini herkes benimsemez. Maymunlar içerisine bir genin dâhil edilebilirliğinin gösterilmesi uygulanan yöntemin hayvanlarda çalıştığını göstermesine rağmen, halen daha önemli tıbbi uygulamalar başarılamamıştır.



ŞEKİL 7.10 Zn Parmaklar: İlaç Toksisite Testi İçin Nakavt Sıçanlar İlaç toksisite testlerinin süresini ve maliyetini indirme potansiyeli ve tekrar edilebilir sonuç elde edebilmek için ihtiyaç duyulan hayvanların sayısını azaltma, yeni bir yöntem olan nakavt sıçanlar oluşturularak sağlanmıştır. İlaç toksisitesi ile ilgili hedef genleri çıkartmak (nakavt) için hedefe-özel-çinko-parmak nükleazlar kullanılır. Bu sıçan embriyolarından yetişkin hayvanlar 6 haftada üretilir; bunlar yüksek sayıda klonlar üretmek için kullanılabilirler ve işlem homolog rekombinasyondan daha az süre alır.

Şimdiye kadar nakavt yapılarak genetiği değiştirilmiş sıçanların varlığı sınırlıdır. Sigma firması çinko-parmak nükleaz yöntemini (bakınız **Şekil 7.10**) kullanarak oluşturduğu ilk nakavt sıçanı 2009'da duyurdu. Nakavt sıçan modelleri, insan benzeri bir model sağlayan ve süreyi azaltarak ilaç geliştirme maliyetlerini düşürebilen bir alternatiftir. Sıçanda çinko-parmak nükleaz esaslı gen hedefleme, insanlarda kolay tahmin edilebilir ilaç metabolizma modellerinin geliştirilmesi için çok sayıda yeni seçeneklere imkân sağlar.

7.4 İnsan Antikorlarının Hayvanlarda Üretilmeleri

Antikorların gücü, onların protein ürünler arasında en değerli yere konulmalarına sebep olur. Burada, antikorların hayvanların biyoreaktör olarak kullanıldığı sistemlerde nasıl üretildiklerine bakacağız.

Monoklonal Antikorlar

Araştırıcılar vücutta özel bir yeri hedefleyen çeşitli kullanımlar için antikorların seçiciliğinden faydalanmayı uzun zamandan beri hayal etmişlerdir. 1980'lerde, antikorların bir yönlendirici cihaz gibi kullanılmaları, vücudun herhangi bir yerinde bulunan tümör hücrelerini etkili bir şekilde bulan ve tahrip eden bir



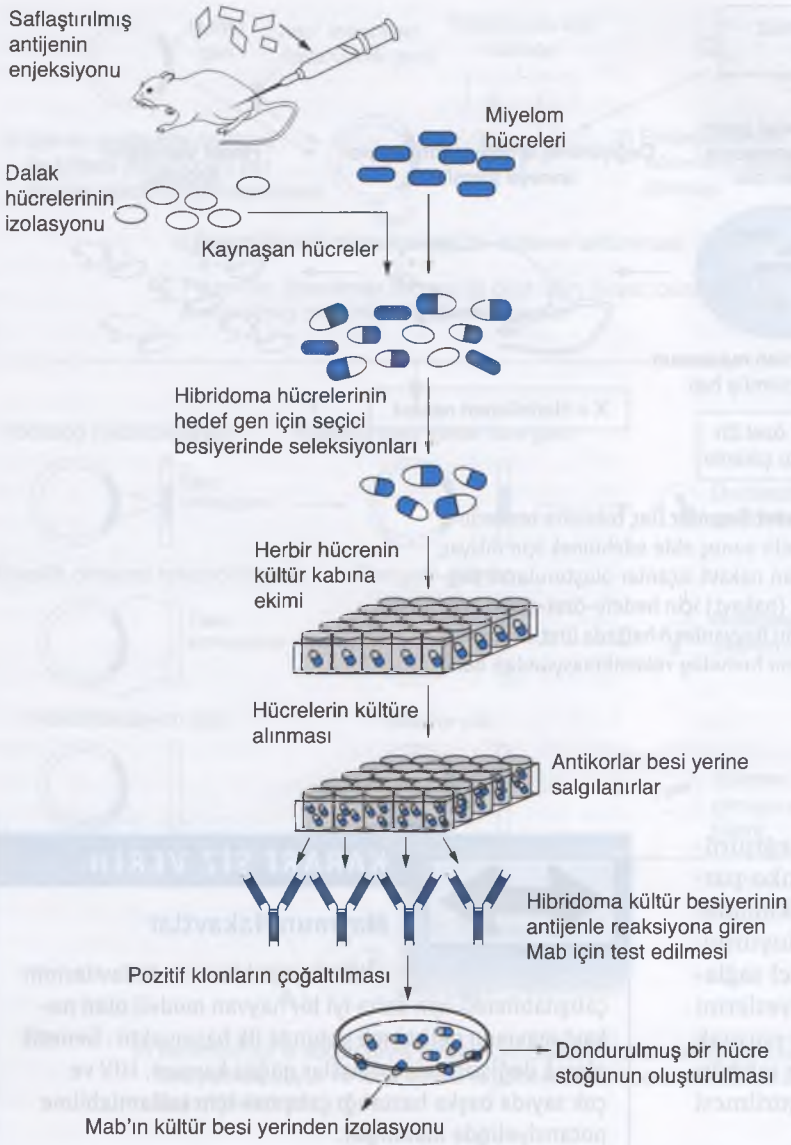
KARARI SİZ VERİN

Maymun Nakavtlar

ANDi, hastalıkların ve tedavilerinin çalışılabilmesi için daha iyi bir hayvan modeli olan nakavt maymun geliştirme yolunda ilk basamaktır. Genetik olarak değiştirilmiş primatlar göğüs kanseri, HIV ve çok sayıda başka hastalığı çalışmak için kullanılabilme potansiyelinde olabilirler.

Herkes nakavt bir maymunun oluşturulmasının bilimsel bir hedef olmasında hemfikir değildir. Bazıları fare, hatta zebrabalığının insan genlerinin çoğunu taşıdığına ve araştırmalarda verimli bir şekilde kullanıldığına dikkati çekmektedir. Diğerleri, bunun aksine, patojenin bir araştırma hayvanından insana geçebilmesinden dolayı nakavt maymunların halk sağlığı bakımından bir tehdit oluşturabileceğini düşünürler. Bir patojen olan HIV'in yabani maymunlardan insanoğluna beklenmedik ve yardımsız geçişinin mümkün olduğuna dikkat çekmektedirler. Başka bilim insanları primatların herhangi bir araştırmada kullanılmasından hoşnut değildir. Bunlar gerçekte primatların insanlara çok benzer olduklarından, ortak geçmişimizin olacağından böylesi araştırmaların etik olarak çirkin olacağını öne sürerler.

Ne düşünüyorsunuz? Nakavt maymun geliştirmeye devam etmeli miyiz? Yoksa primatlar bu yolda kullanılmak için insanlara çok mu yakındır? Kararı siz verin.



ŞEKİL 7.11 Monoklonal Antikor Üretimi Bir antijenle uyarılan fare, kültürde sürekli bir şekilde monoklonal antikor üreten miyelom (kanser) hücreleri ile kaynaşabilen dalak hücreleri oluşturur.

tedavi şekli olan 'sihirli mermi' düşüncesinin gelişmesine sebep oldu. Antikorların tedavi amaçlı kullanımlarındaki bir ana sınırlama, özel bir antikorun büyük ölçeklerde üretilmesi problemidir. Başlangıçta, araştırıcılar antikor salgılayan tümörler olan **miyelom**ları faydalı antikorların üretimi için taradılar. Fakat , miyelomları aranılan özelliklerde bir antikor üretecek şekilde programlayacak araçları yoktu. Bu durum monoklonal antikor teknolojinin gelişmesiyle önemli bir şekilde değişti. **Şekil 7.11**, monoklonal antikorların (Mab) tek bir klon hücreden üretim sürecini göstermektedir.

İlk önce bir fare veya sıçan, arzu edilen bir antikor için antijen (Ag) ile inoküle edilir. Hayvan antijenlere karşı bir bağışık cevap oluşturduktan sonra dalağı alınır. Dalak antikor üreten hücreleri veya lenfositleri içerir. Bu dalak hücreleri, kendi başına antikor üretmeyen özelleşmiş miyelom hücre suşu ile kaynaştırılır. Oluşan kaynaşmış hücreler veya hibridomalar, iki ebeveynin özelliklerini taşır. Miyelom (kanserli) hücresi gibi hızlıca ve sürekli bir şekilde kültürde büyür ve bağışık haldeki hayvanlardan elde edilerek kaynaştırılan lenfositler aracılığı ile de özelleşmiş antikor üretir. Tek bir füzyon olayında yüzlerce hibridoma üretilebilir. Hibridomalar daha sonra arzu edilen antikordan büyük miktarda üretilebilen klonu belirlemek için düzenli bir şekilde taranır. Bu klon belirlendikten sonra, antikor büyük miktarlarda üretilir.

Monoklonal antikor ürünleri günümüzde kanser, kalp hastalığı ve doku reddi hastalıklarını iyileştirmek için kullanılır, fakat işlemler her zaman çok kolay

değildir. Tedavi amaçlı antikorların başarısını sınırlayan bir durum immünojeniteleridir. Fare hibridomaları kullanarak Mab'ların üretilmesi için uygulanan klasik yöntemlerde hastalar insanlarda istenmeyen bir immün cevap geliştirdiler. Fare hibridomaları insanlarda istenmeyen bağışık cevabı tetikleyen miktarda 'fare' antijeni üretmektedir. Hastalar hızlı bir şekilde fare Mab'larını elimine eder, bu yüzden tedavi amaçlı etkiler kısa ömürlüdür. Araştırıcılar bunu **insan anti-fare antikoru (HAMA) cevabı** olarak isimlendirirler. Çözüm, daha fazla insan Mab'ları yapmaktır. Fare antijenlerini uzaklaştırmak veya kimerik hücreler yapmak, pahalı ve zaman alıcı olmaktadır. Bütün bu para ve zaman kaybına rağmen, sonuç Mab'lar yine de HAMA cevap oluşturabilirler. Araştırıcılar bu problemi çözmek için çalışmakta ve farklı organizmalarda Mab üretmektedirler. 2010'da FDA tarafından onaylanan 22 tedavi amaçlı Mab bulunmaktadır. Bunların sadece üç tanesi immünojenitelerini azaltmak için düzenlenmişler ve çoğunluğu ise bazı insan genetik dizilerine sahiptirler. İnsan Mab'ları üreten transgenik fare, en azından 33 güncel yeni ilaç denemesinde işe yaramıştır.

2007'de FDA insan bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeyen ilk monoklonal antikorun hayvanlarda üretilmesine onay verdi. Kaliforniya'da, Thousand Oaks'ta Amgen tarafından nak-in insan bağışık genlerine sahip transgenik fareden Panitumab adlı insan antikoru üretildi. Bu işlem, fare antikor sistemini etkisiz hale getirme (antikorların hafif ve ağır zincir proteinleri) ve bu etkisiz (çıkartılmış) bölgelere insanlara ait antikor-üreten genlerin eklenmesi işlemlerini içerir. Söz konusu çalışma, fare ES hücrelerinde yapıldı ve bunu üreten hayvanları yetiştirmek için bu hücreler fare embriyolarına aktarıldı. Transgenik fare (ksenofare), epidermal büyüme faktörü baskılayıcısına karşı tam insan antikoru (ileri derecede kolorektal kanserli hastaları iyileştirici olarak) üretmektedir. Bu antikor saflaştırılabilir ve HAMA cevabı oluşturmaz.



KARİYER PROFİLİ

Hayvan Teknisyenleri ve Veterinerler

Hayvan teknisyenleri biyoteknolojide araştırma veya ürün denemeleri için laboratuvar ve çiftlik hayvanlarını kullanan bilim insanlarına yardım ederler. Hayvanlar üzerinde tıbbi uygulamaları gerçekleştirirler, ameliyat öncesi ve sonrasında hayvanların bakımlarını yaparlar ve aynı zamanda bazı ameliyatları gerçekleştirebilirler. Teknisyenler yalnızca incelemeler ve inokülasyonlar sırasında hayvanların muhafaza edilmelerine yardımcı olmakla kalmazlar, aynı zamanda günlük hayvan gözlemleri, üremeleri ve bakımları ile de ilgilenirler. Hayvan sağlığının detaylı kayıtlarını tutma ve standart işleyen yöntemleri (SOP) yazmak da onların işlerinin önemli bir kısmıdır.

Hayvan teknisyenleri, genellikle veteriner bilimi veya ilgili bir alanda yardımcı bir dereceye sahiptirler. Biyoloji ve matematik bilgisi de tercih edilir. Çoğu biyoteknolojik pozisyon için, başvuruda bulunanlardan Amerika Laboratuvar Hayvanları Bilimsel Derneği (AALAS; bilgi için www.aalas.org internet sayfasını ziyaret ediniz) tarafından verilmiş sertifika istenir.

Maaş sınırları beceri seviyesine göredir. Teknisyenler geceleri, hafta sonları ve tatil günlerinde (çünkü hayvanlar günlük bakıma ihtiyaç duyarlar) çalışmaya hazır olmalıdırlar. Çoğu işyeri mükemmel personel hakları paketleri, esnek programlar ve sürekli eğitim için dışarıya gitme imkanları sunarlar. Bu pozisyonda yaygın olarak ek saat uygulaması mevcuttur.

Veterinerler her türlü ev hayvanı, çiftlik hayvanı, hayvanat bahçesi hayvanları, spor hayvanları ve laboratuvar hayvanlarının sağlık bakımlarında ana rolü üstlenirler. Bazı veterinerler hayvanlar tarafından taşınan hastalıklara karşı insanları koruma becerilerini kullanır ve insan ve hayvan sağlık problemleri üzerindeki klinik araştırmaları yürütürler. Diğerleri önemli teorik bilgilerin genişletilmesi ve uygulamalı araştırmada, bilgileri kullanmak için yeni yolların geliştirilmesi temel araştırmalarında çalışırlar. Veteriner adayları yetkili bir veteriner hekimliği yüksekokulunda 4 yıllık bir programdan mezun, bir veteriner hekimliği (DVM veya VMD) doktora dereceli ve pratik yapabilme lisanslı olmalıdır.

Bu pozisyonların tamamı lisans seviyesinde önemli derecede kredi saatine (dönemde 45'ten 90 saate kadar) ihtiyaç duyar. Veteriner okullarına giriş için yarış zordur; 2010'da başvuruların yaklaşık 11 de 1'i kabul edilmiştir. Bir özel alanda sertifika elde etmek isteyen veterinerler, iç hastalıkları, onkoloji, radyoloji, ameliyat, dermatoloji, anesteziyoloji, nöroloji, kardiyoloji, oftalmoloji (göz bilimi) ve egzotik küçük hayvanlar hekimliği gibi alanlarda 2-3 yıllık yoğun doktora ihtisası tamamlamalıdırlar. Veterinerlerin ortalama yıllık gelirleri 2010'da 92 570 dolardı.

BİR FARK YARATMAK

2001'deki İnsan Genom Projesi bir uluslararası işbirliği faaliyetiydi. Her genin görevini belirlemeye yönelik benzer bir uluslararası faaliyet de farede başladı. Bunu gerçekleştirmek için bilinen bir gen genomdan çıkartıldı (fare genomunu oluşturan 20 000 genden); daha sonra bu fare ırkı fiziksel ve davranışsal farklılıkları belirleyebilmek için düzenli olarak normal fare ile karşılaştırıldı. Fare genlerinin % 95'i insan genlerine benzediğinden, projeden elde edilen bilgiler insan hastalıkları ve ilaç araştırmalarına katkıda bulunacaktır. Çalışmanın 3 yıl alması beklenmektedir. Eğer sadece az miktarda faydalı ilaç elde edilirse bile (her biri yaklaşık 1 milyar dolar değerde), 900 milyon dolar işçilik kendi kendisini karşılayacaktır. İşlem uzun yıllar alsa bile, elde edilecek veriler çok değerli olacaktır. İşlemlerin birçoğunun otomatikleşmiş olmasına rağmen,her gen için çalışmanın çok sayıda tekrar gerektirmesi (kısmen NIH tarafından destekli), çok sayıda biyoteknolog ve laboratuvar analizcisine veya tam mesaili biyoteknologlara ihtiyaç göstermektedir. İnsan hastalıklarını iyileştirmeye yönelik uluslararası çabaların bir parçası olmak, hiçbir alanda biyoteknolojide olduğu kadar kolay değildir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1de bulabilirsiniz.

1. Hibridomalarda neden miyelom hücreleri kullanılır?
2. İnsan bağışıklık sistemi neden farede üretilen bir antikoru reddedebilir?
3. Bazı biyoteknoloji şirketleri HAMA-benzeri bir cevap uyarmayan antikorları nasıl üretirler?
4. Hayvanların araştırmalarda kullanılmaları hakkındaki etik endişeleri yasal düzenlemelerle birlikte tartışınız.
5. Nakavt ve nak-in hayvanlar, bir ilacın insanlarda çalışacağı konusunda nasıl iyi tahminler sağlar?
6. Hipertermiyanın hayvanlarda kanser tedavisinde kullanılışını açıklayınız.
7. Yeni insan ilaçlarının denenmesinde niçin yaygın olarak zebrabalığı kullanılır?
8. Model hayvanların nasıl seçildiklerini açıklayınız.
9. Biyolojik araştırmalarda hayvanların kullanılmasında 'azaltma, geliştirme ve yenilerini araştırma' anlayışını açıklayınız.
10. Bir transgenik yöntem olarak pronüklear mikroenjeksiyonu açıklayınız

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

8

DNA Parmakizi ve Adli Analizler

Çeviren: Zihni DEMİRBAĞ

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- DNA parmakizini tanımlayabilmelisiniz.
- Delil olarak kullanılan bir DNA örneğinin toplanması ve hazırlanması işlemlerini belirleyebilmelisiniz.
- DNA delillerini parçalayan bazı faktörleri ve DNA delilinin kararlılığını koruyabilmek için ihtiyaç duyulan bazı tedbirleri sıralayabilmelisiniz.
- DNA parmakizi oluşturmak için kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nu açıklayabilmelisiniz.
- DNA parmakizi analizinde kısa ardışık tekrar (STR) profillerinin nasıl karşılaştırıldığını açıklayabilmelisiniz.
- Bir şüpheliyi elemek için DNA parmakizinin nasıl kullanılabildiğini açıklayabilmelisiniz.
- Laboratuvardaki iki veya daha fazla DNA parmakizinin birbirine benzer olup olmadığını belirleyebilmelisiniz.
- DNA parmakizi tekniğinin akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılışını açıklayabilmelisiniz.
- Biyolojik araştırmalarda kullanılan bazı DNA analizlerini sıralayabilmelisiniz.
- DNA parmakizini kapsayan bazı etik konuları tartışabilmelisiniz.



Bir biyoteknisyenin bireyler arasındaki benzerlik ve farklılıkları belirlemek için DNA parmakizlerini incelemesi.

Adli bilim, yasa ve bilimin kesişimidir. Suçlunun mahkum edilmesi veya suçsuzun beraat edilmesi için kullanılabilir. Çoğu mahkeme vakaları adli bilimler tarafından sağlanan bilimsel delillere dayanır. Yıllar boyunca, bilim insanları kriminal araştırmalarda gerçekleri açığa çıkarmak için teknolojiler geliştirmiş ve hukuk kullanılmakta olan bu yeni teknolojileri hızlıca kabullenmiştir.

Örneğin, 1800'lerin sonlarında, suç ile mücadele girişimleri yeni bir teknoloji olan fotoğrafçılık ile desteklendi. Görüntüler referans olarak kullanılabildiği için, nezarette suçluların tasviri doğru bir şekilde yapılabildiğinden fotoğraf makinesinin icadına minnettarız. Fotoğrafların kullanımı, sözlü tanımlamalar ve elle çizilen "aranan" afişlerine göre suç ile mücadelede önemli bir gelişme olmasına rağmen, hala önemli sınırlamaları vardır. Suçlular saçlarını keserek, sakal bıyık ekleyerek veya gözlük kullanarak görünümlerini değiştirmenin bir yolunu bulup fotoğraf esaslı belirlenmelerini neredeyse imkansız hale getirirler.

Bilim insanları 100 yıl öncesinde insan parmakları üzerinde bulunan küçük çizgiler ve eğrilerin insanların kimliklendirilmelerinde kullanılabileceğini keşfettiler. İngiltere'de para kasasının tabanındaki kanlı bir parmak izinden bir katilin belirlenmesi mümkün olduktan sonra, şüphelinin parmak izinin alınması ve parmak izlerinin muhafaza edilmesi yaygın hale gelmeye başladı. FBI (The Federal Bureau of Investigation), CIA (Central Intelligence Agency) ve kanun uygulayıcı birimler bu parmak izlerinden büyük koleksiyonlar oluşturdular. İlk önce, görevli kişiler parmak izlerini inceleyip görsel olarak çizgileri karşılaştırmadan sorumlu oldular. Bununla birlikte, bilgisayarın gelişmesiyle, ayırt etme işlemi daha az sıkıcı ve güvenilir oldu. Fakat suç mahallinde parmak izlerine her zaman rastlamak mümkün değildir; parmak izleri silinmiş veya arkada parmak izi bırakılmaması için eldiven giyilmiş olunabilir.

1985'te devrim niteliğindeki yeni bir teknoloji önemli bir adli araç olarak ortaya çıktı. Bir suçlunun arkada bırakmış olduğu parmak izi lekelerini saymak yerine, araştırıcılar yeni bir çeşit "parmakizi" olan, her şahsın kendine özgü genetik yapısındaki özgünlüğe bakabilirler. Bu bölümde, DNA parmakizlerinin tanımlanmasına göz atacağız ve her şahsın DNA'sını neyin özgün kıldığını tartışacağız. Daha sonra, DNA örneklerini toplama ve analiz için DNA parmakizlerini oluşturma işlemlerini öğreneceğiz. DNA profillerini karşılaştıracağız ve bir DNA uyumunun olması için neyin gerekli olduğunu öğreneceğiz. Daha sonra, delil olarak DNA'nın önemini ve yararlanılabilirliğini gösteren örnekleri dikkate alacağız. Bunun ardından mitokondriyal DNA'nın akrabalık ilişkilerinin belirlenmesinde kullanılabilirliğine odaklanarak, DNA profillerinin akraba ilişkilerinin belirlenmesinde nasıl kullanılabileceğine bakacağız. Son olarak, DNA profilleri insanlarla sınırlı olmadığından, önemli bitki ürünlerinin kaynağının belirlenmesi ve yaban hayatının korunması için yasaların uygulanmasına yardımcı olunması ve biyolojik araştırmaların gerçekleştirilmesi için DNA analizlerinin kullanılmasına göz atacağız.

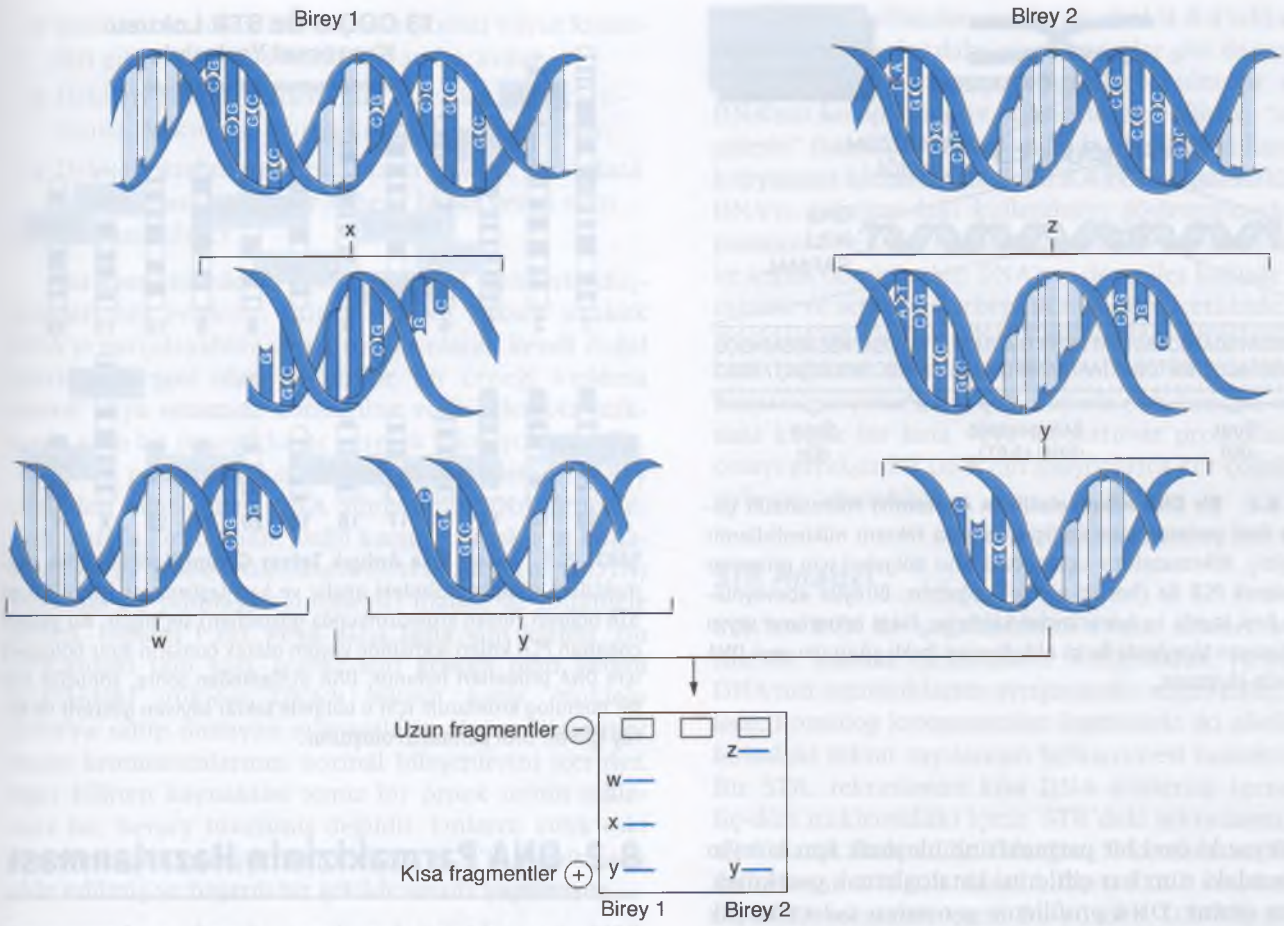
GELECEĞİ ÖNGÖRME

Bir hastanın DNA dizisi ne kadar iyi bilinirse, hastanın genetik esaslı durumlarını iyileştirmede etkili olacak hangi ilaçların kullanılması gerektiği konusunda tahminlerin yapılması o kadar kolay olacaktır. En uygun ilacı tahmin etmek için bireyin sadece DNA dizisini belirlemek, bazı genetik hastalıkları teşhis eden daha önceki testlerden (örneğin prostat kanseri, kistik fibroz ve şeker hastalığı) farklıdır. Günümüzde büyük ölçekte bireysel tedavilere izin veren teşhis testlerini geliştirmek için genetik dizi analizleri daha hızlı ve daha ucuz olmak zorundadır. Böylece ikinci ve üçüncü nesil icatlar üreten son zamanlardaki gelişmeler, insan DNA dizi analizi maliyetini son 10 yılda üçte ikiye düşürebilmiştir. Devlet sağlık güvencesi ve özel sigortalar hastaların DNA dizi belirlemeleri için gerekli ödemeleri kabul etme konusunda yavaş davransalar da, farmasötik araştırmalardaki bireysel ilaç için duyulan aşırı ihtiyaçlar bu yeni maliyetlerin kabulünü kolaylaştırabilmektedir. Gerçekte, muhtemelen yakın gelecekte, Amerika Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) genetik bozuklukları (Bölüm 12) iyileştirmek için test edilecek her ilaç için şirket teşhislerine (deneme fazı katılımcılarının DNA dizilemesi şeklinde) ihtiyaç duyacaktır. İlaveten, 2010 Haziran'ında, FDA beş farklı genetik test yapacak firmaların ürünlerini direkt olarak piyasaya sunmadan önce resmi onay almaları gerektiğini duyurdu. DNA varyasyonlarının biyolojisinin bazı hastalıklara gerçekte nasıl sebep olduğu hala aktif olarak araştırılmasına rağmen, bu gayretler hiç şüphesiz bireysel seviyede daha fazla DNA testine ihtiyaç duyulmasına yol açacaktır. Genetik testleri sağlık standardı yapmak tıbbi maliyetleri önemli ölçüde azaltma ve güvenliği artırma potansiyeline sahiptir.

8.1 DNA Parmakizi Nedir?

Her insanın özel bir genler seti taşıdığını biliyoruz. DNA'nın kimyasal yapısı daima aynı olmasına rağmen, her bireyin kromozomlarındaki baz çiftlerinin sırası farklıdır. 23 çift kromozomu oluşturan 3 milyar nükleotidin özel olarak bir araya gelmeleri, her birimizde kişiye özgü bir genetik kimlik oluşturur.

Her bir hücre farklı göreve (kalp kası hücreleri kalbimizin atmasına, nöronlar düşüncelerimiz olan sinyallerimizin aktarılmasına, vs) sahip olsa bile, her hücrenin bir organizmayı bir bütün olarak tanımlayan bir DNA kopyası taşıdığını biliyoruz. DNA'nın her bireydeki benzersiz yapısı ve bireyler arasındaki genetik çeşitlilik DNA parmakizini mümkün kılar. Vücuttaki her hücre aynı DNA'ya sahip olduğundan, bir kişinin



ŞEKİL 8.1 Restriksiyon Parçaları Uzunluk Polimorfizmleri (RFLP'ler) DNA Parmakizleri Üretmek İçin Kullanılabilirler Restriksiyon enzimleri kısa nükleotid dizilerini tanır ve DNA'yı keser. Rastgele mutasyonlar enzim tanımasını etkileyerek farklı uzunluklarda DNA oluşturur (mutasyon olursa kesim olmaz). Bu kesilen parçaların görünümü (elektroforezle bir jelde ayrıştırıldığı zaman) benzerlikleri ve farklılıkları belirlemek için kullanılabilir. İnsan DNA parmakizi, PCR işlemleri için daha az DNA'ya ihtiyaç duyulduğundan dolayı STR analizine dönüştürüldü. Şekildeki birey 1 DNA'sı üç kesim yerine sahipken birey 2 sadece 2 kesim yerine sahiptir. Elektroforetik ayrıştırmada oluşan bantlaşma şekli farklılığı göstermektedir.

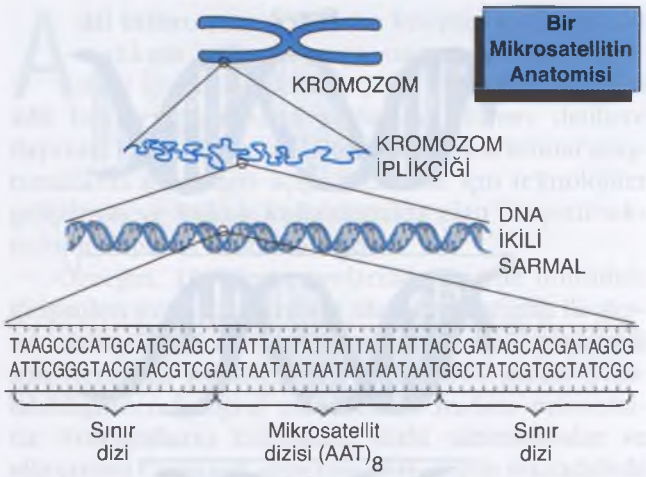
ağız içinden alınan hücreler, beyaz kan hücreleri, deri hücreleri veya başka herhangi bir dokuda bulunan hücreler ile mükemmel bir benzerlik gösterirler.

DNA Tiplendirmesi Nasıl Gerçekleştirilir?

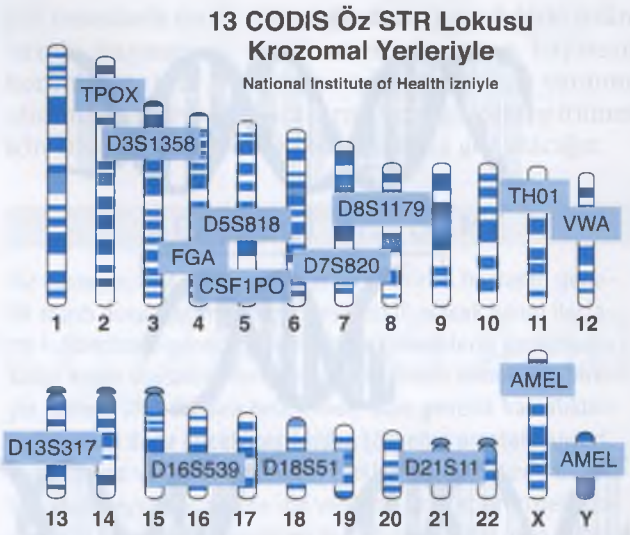
DNA'nın sadece % 0.1'i (yaklaşık 3 milyon baz) kişiden kişiye farklılık gösterir. DNA'ya sahip bir nükleus içeren kandan, kemikten, saçtan veya vücudun diğer dokularından alınan örnekler kullanılarak bu değişken bölgelerle bir şahsın DNA profili oluşturulabilir. Kriminal vakalarda bu genellikle suç delillerinden veya şüpheliden DNA elde edilmesini ve özel DNA bölgelerinin bir setinin varlığı için analizleri kapsar.

İki çeşit adli DNA testi vardır; biri restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmine (RFLP), diğeri ise polimeraz zincir reaksiyonuna (PCR) dayanır (bir RFLP görüntüsü için **Şekil 8.1**'e bakınız). Genellikle, RFLP testi PCR için ihtiyaç duyulandan fazla örneğe ihtiyaç duyar ve DNA'nın parçalanmamış olması gerekir (FBI, vakaların karşılaştırılması için dört tipin RFLP'sini kabul eder). Eski veya az miktarda olan olay yeri delili genellikle RFLP için uygun değildir. Sıcak ve nemli ortamlar parçalanmayı hızlandırdığından, DNA'nın kısa süre içerisinde RFLP testi için uygun olmamasına sebep olurlar. Bundan dolayı, RFLP, DNA testleri için geçmişte olduğu kadar sık kullanılmaz.

PCR esaslı testler RFLP testlerinden daha az miktarda DNA'ya ihtiyaç duyar ve örnek kısmen parçalanmış olsa bile kullanılabilir. Bununla birlikte, PCR esaslı testler suç delillerinde ve laboratuvar içerisinde yabancı DNA kontaminasyonuna karşı aşırı derecede duyarlıdır.



ŞEKİL 8.2 Bir DNA Mikrosatellit'in Anatomisi Mikrosatellit genomda özel yerlerde olan değişken sayıda tekrarlı nükleotidlerdir (AAT gibi). Mikrosatellitin uçlarındaki sınır bölgeleri için primerler kullanılarak PCR ile (her iki yönde) çoğaltılır. Bireyler ebeveynlerinden özel sayıda bu tekrarlardan kalıtırlar, fakat tekrarların sayısı ilgili olmayan bireylerde farklı olduğundan farklı görünüm veya DNA parmakizi oluşturur.



ŞEKİL 8.3 İnsan Kısa Ardışık Tekrar Görüntüleri FBI DNA parmakizleri kütüphanesindeki analiz ve karşılaştırmalar için 13 özel STR bölgesi (insan kromozomunda gösterilen) seçmiştir. Bu yerleri çoğaltan PCR kitleri içerisinde yaygın olarak bunların sınır bölgeleri için DNA primerleri bulunur. DNA dizilemeden sonra, sonuçlar her bir homolog kromozom için o bölgede tekrar sayısını gösterir ve birey için bir DNA parmakizi oluşturur.

Neyse ki özel bir parmakizine ulaşmak için bireyin DNA'smdaki tüm baz çiftlerini kataloglamak gerekmez. Bunun yerine, DNA profilleme genomun sadece küçük bir kısmına ihtiyaç duyar. DNA'nın her zinciri proteinleri kodlayan aktif ve kodlamayan inaktif genetik bilgilerden oluşur. Bu inaktif kısımların bazıları 1 ve 100 baz çifti arasında (tekrar için Bölüm 3'e bakınız) tekrar diziler içerir. **Değişken sayıda ardışık tekrarlar (VNTR'ler)** adındaki bu diziler genetik kimliği belirlemede özel bir önem taşımaktadır. Her kişi annesinden veya babasından gelen bazı VNTR'lere sahiptir. VNTR'leri annesi ve babasıyla aynı olan insan yoktur (bu sadece klonlama sonucu olabilir). Bunun yerine, bireyin VNTR'leri ebeveynlerin DNA bölgelerinin tekrarlarının bir karışımıdır. Bir bireyin VNTR'lerindeki özgünlük, DNA parmakizi olarak bilinen kimliğinin bilimsel belirtisini oluşturur.

PCR ile oluşturulan DNA parmakizleri, genellikle kromozom boyunca yayılan 1-6 nükleotidlik tekrarlar olan **mikrosatellitlerin** (Şekil 8.2) varlıklarının belirlenmesiyle sağlanır. Bu tekrarlanan diziler DNA içerisinde çok sayıda yerde olabildiklerinden, bunları belirlemek için kullanılan problar analiz edilecek olan özel mikrosatelliti çevreleyen DNA bölgelerine komplementerdir. Bu tekrarlanan dizilerin az bir kısmı **kısa ardışık tekrar** veya **STR**'la sonuçlanır. FBI DNA profillerini test etmek için Birleştirilmiş DNA Indeks Sisteminde (**Combined DNA Index System** veya **CODIS**, Şekil 8.3' te görüldüğü gibi) bulunan 13 özel STR'yi seçmiştir.

8.2 DNA Parmakizinin Hazırlanması

DNA parmakizini hazırlama, örnek toplanmasına, DNA izolasyonuna, kantitasyonuna ve PCR amplifikasyonuna ihtiyaç duyar. Bundan sonraki sayfalarda bu basamakları detaylı olarak tartışacağız.

Örneklerin Toplanması

Olay yeri inceleme ekipleri düzenli olarak DNA kaynaklarını araştırırlar. Bunlar; kirli çamaşır, yalanmış zarf, bir sigara izmariti veya insan hücreleri kaynağı olabilecek herhangi birşey olabilir. Bir olayı aydınlatmak için çok az bir kan veya tükürük izi genellikle yeterlidir.

Her canlı nesne DNA'ya sahiptir, bu nedenle olay yeri çok miktarda muhtemel kontaminasyon kaynaklarıyla doludur. Bundan dolayı, delillerin toplanması ve muhafaza edilmesinde detaylara aşırı derecede dikkat etmek gerekir. Delilleri korumak için, bir olay yerinde çalışanlar şu önlemleri almak zorundadırlar (önlemlerin tam listesi için FBI internet sayfasına bakınız):

- Tek kullanımlık eldivenler giyiniz ve sık sık değiştiriniz.
- Tek kullanımlık araçlar (cımbız ve swab'lar gibi) kullanınız.
- Tükürük mikrodamlacıklarıyla kontaminasyonu önlemek için konuşma, hapşırma ve öksürmekten kaçınınız.

- Delilleri tutarken DNA içeren (kendi vücut kısımları gibi) herşeye dokunmaktan kaçınınız
- Delilleri paketlemeden önce hava ile iyice kurutunuz. Mikroplar örneği kontamine edebilirler.
- Delilleri özel tasarlanmış materyallerde muhafaza ediniz; plastik poşetler örneğe hasar veren nem oluşturabilirler.

Bu kısmi listede de gösterildiği gibi, delillerin düşmanları her yerdedir. Güneş ışığı ve yüksek sıcaklık DNA'yı parçalayabilir. Ayrıştırıcılar olarak kendi doğal işleriyle meşgul olan bakteriler, bir örneği toplama öncesi veya sırasında kontamine edebilirler. Az miktarda nem bir örneğe hasar vererek yıkıp yok edebilir.

DNA parmakizi karşılaştırmalı bir işlemdir. Olay yerinden elde edilen DNA şüphelinin DNA örnekleriyle karşılaştırılmalıdır. Delili karşılaştırmak için kullanılan ideal örnek, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) adındaki bir pıhtılaşmayı önleyici madde ile muamele edilen, toplam 1 mL veya daha fazla tam kandır. Bu miktardaki tam kan, testler için gerekli olan yeterli miktardaki nüklear DNA'lı lökosit içerir. Nüklear DNA'ya sahip olmayan eritrositlerin aksine, lökositler insan kromozomlarının normal bileşenlerini içerirler. Eğer bilinen kaynaktan temiz bir örnek temin edilemez ise, herşey tükenmiş değildir. Onlarca yıllık eski örneklerden karşılaştırma için DNA PCR'la çoğaltılarak elde edilmiş ve başarılı bir şekilde analiz yapılmıştır.

Analiz için DNA'nın Elde Edilmesi

Bilinen bir kaynaktan örnek elde edildikten sonra, bir laboratuvar teknisyeni onun genetik profilini belirlemeden sorumludur. Öncelikle, teknisyen örnekten DNA elde eder. DNA ya kimyasal olarak (istenmeyen hücresel materyalleri yıkayıp uzaklaştırmak için deterjan kullanarak) ya da mekanik olarak (materyale basınç uygulayarak) saflaştırılabilir. DNA elde edildikten sonra, teknisyen özel DNA yapısını görünür delile dönüştürmek için çok sayıda diğer işlemleri takip etmek zorundadır.

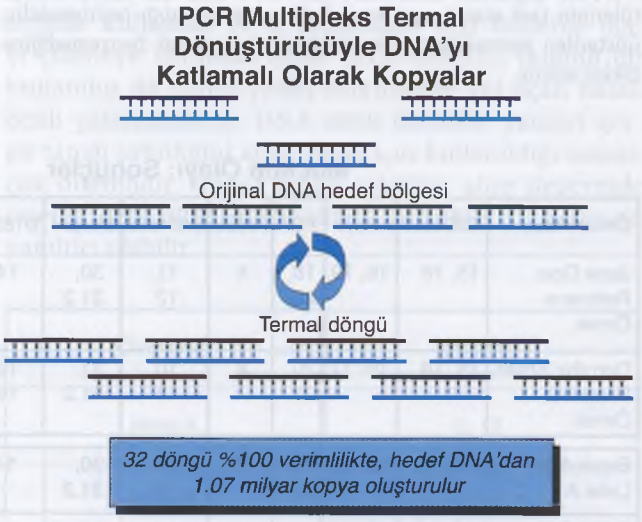
PCR ve DNA'nın Çoğaltılması

Bir RFLP analizi yapmak için binlerce hücreye ihtiyaç duyulur. Bu, genellikle olay yerinde toplanılabilenden daha fazladır. Bir zarfın yapışkan yerindeki tükürük veya çıplak gözle görülemeyecek haldeki bir kan lekesinin tek delil olduğu bir durumu düşünün. Bu durumda örneği analiz edebilecek miktarda çoğaltmak veya büyütmek için PCR kullanılır.

PCR, DNA için bir fotokopi makinesi gibidir. İlk basamak karşılaştırma için faydalı olabilen DNA kısımlarını belirlemekten oluşur. Primerler veya kısa DNA parçaları, her DNA zincirindeki bu kısmı 5'-3' yönünde bulmak için kullanılan araçlardır (**Şekil 8.4**'teki oklara bakınız). Primerler daha ziyade problar gibi davranır ve DNA'nın komplementer bölgelerini bulmaya çalışır. DNA'nın komplementer bölgesi tespit edilince, "*ısı döngüleyici*" (bakınız Bölüm 3) adında bir cihaz kullanılarak kopyalama işlemi başlar. Şekil 8.4 PCR'ın parmakizi için DNA'yı çoğaltmadaki kullanılışını göstermektedir. *Taq* polimeraz ve DNA nükleotidlerinin de yardımıyla sıcak ve soğuk dönüşümleri DNA'nın döngüler halinde ayrışmasına ve sentezine sebep olur. Saatler içerisinde, DNA zincirleri milyonlarca, hatta milyarlarca artırılabilir. Bu hızlı çoğalma muhtemel bir problem oluşturur: PCR kontaminasyona karşı çok duyarlı olduğundan ortamdaki küçük bir hata veya laboratuvar prosedüründen dolayı gereksiz bir DNA'nın milyonlarca kez çoğaltılmasıyla sonuçlanabilir.

STR Analizi

STR'ler PCR ile çoğaltıldıktan sonra, alleller ayrıştırılır ve kapilar elektroforez kullanılarak (çoğaltılan DNA'nın uzunluklarını ayrıştırarak) tespit edilir. Böylece, homolog kromozomlar üzerindeki iki allelin her birindeki tekrar sayılarının belirlenmesi mümkündür. Bir STR, tekrarlanan kısa DNA dizilerini (genellikle üç-dört nükleotidlik) içerir. STR'deki tekrarların sayısı allel olarak ifade edilir. Örneğin, 7. kromozom üzerinde bulunan D7S820 olarak bilinen STR 5 ve 16 arasında GATA tekrarları içerir. Bu yüzden, D7S820 STR dizisi için 12 farklı muhtemel allel vardır. Örneğin, 10 ve 15 D7S820 allelli bir birey, bir ebeveynden 10 GATA tekrarlı bir D7S820 kopyasına ve diğer ebeveynden de



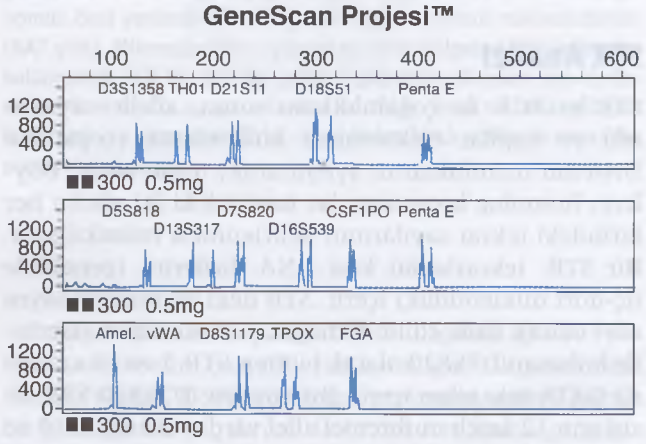
ŞEKİL 8.4 PCR ile Özel Yerlerdeki DNA'nın Çoğaltılması CODIS yerlerinin sınır bölgeleri için DNA primerleri özel STR bölgelerinde DNA çoğaltılmasını sağlar. Çoklu primerli reaksiyon dizilerini içeren çoğu PCR kitleri, aynı anda çoklu bölgeler için DNA çoğaltılmasını sağlar.

15 GATA tekrarlı bir D7S820 kopyasına sahip olacaktır. Bu STR için 12 farklı allel olup, bu bir bölge için 78 farklı muhtemel genotip veya allel çifti oluşturur. Her bir STR'nin çok sayıda çeşitliliği DNA parmakizini kullanarak farklı bireyleri ayırt etmede kullanılır. **Şekil 8.5** CODIS için FBI tarafından kabul edilen 13 STR bölgesinin tümünün allellerini göstermektedir.

8.3 DNA'nın Kullanıma Sunulması

DNA parmakizi eski moda parmakizi analizine önemli bir şekilde benzerlik gösterir. Her iki durumda da, bir olay yerinden toplanan deliller bilinen bir kaynaktan toplanan delillerle karşılaştırılır. Örneklerin değerlendirilmeleri sırasında, analizciler bantların eşleşmesine bakarlar. Eğer örnekler aynı kişiden ise (veya benzer ikizlerden ise), bantlar veya noktalar mükemmel bir şekilde hizalanmalıdır. Bütün testler eleme esasına dayanır. Diğer bir deyişle, bir farklılık bulununcaya kadar test devam eder. İstatistiksel olarak kabul edilebilir miktarda testten sonra bir farklılık bulunmaz ise benzerlik ihtimali yüksektir. **Şekil 8.6**'da görüldüğü gibi bir bireyin eliminasyonu doğrultusunda hemfikir olup olmadığınızı görünüz.

Daha sonra göreceğimiz gibi, böylesi belirgin görsel delil, kriminal araştırıcılar için paha biçilmez olabilir. Burada, DNA profillerinin kullanıldığı birkaç örneği gözden geçireceğiz.



ŞEKİL 8.5 CODIS tarafından kabul edilen 13 STR'nin tamamının Gen Tarama Ekranı Kapilar elektroforez kullanılarak çoğaltılan STR mikrosatellit DNA dizileriyle STR'lerin sayısını belirlemek mümkündür. Delil olarak elde edilen görüntüleri karşılaştırarak, DNA görüntülerinin tam olarak aynı veya farklı olup olmadığı belirlenebilir. Gösterilen parmakizlerinden hiçbirinin tam olarak benzemediğine dikkat ediniz.

Narborough Köyü Cinayeti DNA Ayrıştırmada Yeni Bir Yöntemin Geliştirilmesine Yol Açtı

Kriminal bir olayda genetik parmakizinin kullanıldığı ilk kayıt 1983'te Birleşik Krallık'ta (İngiltere) bir kız öğrencinin cinsel tacizi ve öldürülmesi olayıdır. Sir Alex Jefferies ve çalışma arkadaşları Dr. Peter Gill ve Dr. Dave Werrett eski insan doku örneklerini kullanarak DNA ekstraksiyonu ve profilini hazırlama tekniği geliştirdiler. Gill aynı zamanda vajinal hücrelerden spermleri ayrıştıran bir metot geliştirerek ilk önce vajinal hücreleri ve daha sonra sperm hücrelerini ayrıştırıp, parmakiziyle örneklerin karşılaştırılmalarını sağladı (**Şekil 8.7**). Bu yöntemde, bir deterjan vajinal hücreleri parçalarken sperm hücrelerini parçalamadan bütün olarak bırakır. Bu gelişmeler olmaksızın, olaydaki sperm hücreleri şüphelinin spermleri ile karşılaştırma için belirlenemeyeceğinden, ırza geçme olaylarını çözmek amacıyla DNA delillerini kullanmak zor olacaktı.

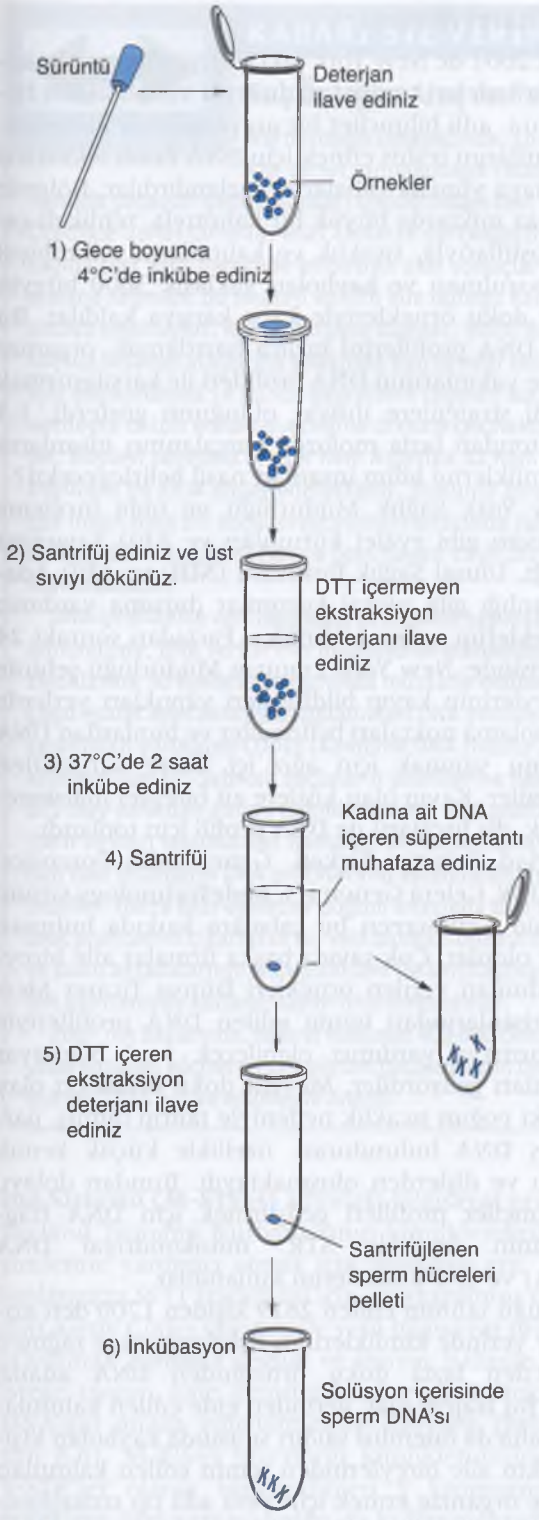
Bu durumda, Jefferies ve çalışma arkadaşları olay yerinden aldıkları bir meni örneğindeki DNA delillerini, daha önce benzer bir ırza geçme ve ölüm olayından alı-

Mockup Olayı: Sonuçlar

Örnek Adı	D3S1358	VWA	FGA	AMEL	D8S1179	D21S11	D18S51	D5S818	D13S317	D7S820
Jane Doe, Referans Örnek	15, 16	16, 19	18, 22	X	11, 12	30, 31.2	14	9, 12	9, 12	8, 11
Dorothy Smith, Referans Örnek	15, 18	16, 17	20, 21	X	10, 13	31, 31.2	12, 16	10, 12	11, 12	8
Bıçak Ağzı Leke A	15, 16	16, 19	18, 22	X	11, 12	30, 31.2	14	9, 12	9, 12	8, 11
Bıçak Ağzı Leke B	15, 16	16, 19	18, 22	X	11, 12	30, 31.2	14	9, 12	9, 12	8, 11

Sonuçlar: Dorothy Smith bıçak ağzında bulunan lekeler A ve B'de bulunan DNA'ya katkıdan HARİÇ TUTULABİLİR. Jane Doe bıçak ağzında bulunan lekeler A ve B'de bulunan DNA'ya katkıdan HARİÇ TUTULAMAZ.

ŞEKİL 8.6 DNA Karşılaştırmasıyla Kim Dışarıda Tutulur? Burada gösterilen DNA görüntüleri bir olay yerinden alınmıştır. Bıçak lekeleri A ve B olayda kullanılan bir bıçağın ağzında bulunurken, leke C bıçağın tutma yerinde bulunmuştur. Lekelerin üçü DNA analizi için çoğaltılmış. DNA profillerini karşılaştırma için iki birey test edilmiştir. Şekilden sonucu okuyunuz ve analizle aynı düşüncede olup olmadığınızı görünüz.



ŞEKİL 8.7 Sperm DNA'sı ve Vajinal Hücre DNA'sının Karışık Kaynaktan İzolasyonu Bir vajinal sürüntüyle alınan örnekte bulunan spermlerden elde edilen sperm hücre DNA'sı, parmakizi ile karşılaştırılabilir. Dithiothreitol (DTT) içeren tampon sperm hücre membranını parçalar ve karışık bir delilde bulunan vajinal DNA ayrı olarak analiz edildikten sonra sperm DNA'sını tespit etmek için kullanılır (sperm hücre membranının DTT'nin ilavesine kadar parçalanmaya dirençli olma özelliği sayesinde).

nan örneklerle karşılaştırdıklarında, her iki olayın da aynı adam tarafından gerçekleştirildiğini belirlediler. Bu noktada, polis asıl şüpheliye sahipti. Ancak, DNA delili şüphelinin kanından DNA örneği ile karşılaştırıldığı zaman birbirleriyle eşleşmedi. Asıl şüpheli böylece olayın dışında tutuldu.

Araştırma devam etti. Polis dünyanın ilk genel DNA taramasını yürüterek bölgedeki erkek popülasyonundan 5500 örnek topladı. Basit kan grubu testlerini kullanarak, hızlı bir şekilde başlangıç grubun yaklaşık % 90'ını elimine etti (RFLP metodunu kullanarak). Saatlerce süren zahmetli analizlerden sonra, araştırma çıkmaza girdi; geri kalan profillerin hiçbiri ırza geçen/katilinki ile eşleşmedi.

Daha sonra şanslı bir noktaya gelindi. Yargılanan bir adam arkadaşlarından birinin adına bir örnek vermiş olduğunu söyledi. Genel tarama testinden kaçan adam gözaltına alınarak, DNA'sı analiz edildi ve DNA'sının cinayetlerdeki meni örneğinden elde edilen DNA ile tam eşleştiği görüldü. Şüpheli suçunu itiraf etti ve ömür boyu hapisle cezalandırıldı.

Bu olay, DNA delilinin kullanılmasında önemli bir kısıtlamayı ortaya çıkardı; karşılaştırma olarak kullanılabilecek bilinen bir örnek olmadıkça, benzerlik ortaya konulamamaktaydı. **Şekil 8.8**'de gösterilen örnekte, kurbanın ve şüphelinin kan örnekleri bilinmektedir. Bu iki bilinen DNA parmakizlerini karşılaştırarak, araştırıcılar olaydaki şüpheliyi sadece şüphelinin elbisesinde bulunan kanın DNA parmakizinden belirleyebildiler.

Görgü Tanığı İfadesi DNA Testinden Daha mı Güvenilir?

DNA delili ilk kez 1987'de Amerika Birleşik Devletlerinde kullanıldı ve o zamandan beri binlerce olayı çözmeye yardımcı oldu. DNA delilinin önemli bir kullanılışı da bazen yanlış hükümlere yol açan hatalı delili yalanlamaktır. DNA delili özellikle yalancı görgü tanığı şahitliğini araştırmak için kullanıldığı zaman çok önemlidir. Görgü tanığı şahitliği, altın değerinde önemli delil olmasına rağmen, gerçekte çoğu zaman yanıltıcı olabilir.

Örnek Adı	D5S818
Birey A	9, 12
Birey B	8 (veya 8,8)

ŞEKİL 8.8 Şüpheli Birinden STR Esaslı Bir Eliminasyon Örneği Lokus D5S818'de (kromozom 5), A kişisi annesinden 9 tekrara ve babasından 12 tekrara sahiptir. B kişisi her iki ebeveyninden 8 tekrara sahiptir.



KARARI SİZ VERİN

DNA Parmakizi Suçluların Yakalanmalarını Hızlandırabilir mi?

Bazı suçlular yakalanır, bir günden az bir süre cezaevinde tutulur ve daha sonra kefaletle dışarıya salındıklarında tekrar suç işlerler. Eğer polis veri bankasındaki bilgilerle eşleşip eşleşmediğini görmek için zanlının DNA'sını hızlı bir şekilde test edebilirse, tehlikeli suçluları hapiste tutmaya devam eder. Son zamanlarda, çoğu genetik testler 24 ile 72 saat arasında bir süre almakta ve sonuçlar gelinceye kadar da, zanlılar dışarıya salınabilmektedir. Yeni bir test, suçlardan dolayı yakalanan insanların DNA'ları ile adli tıp veri bankalarında depolanan olay yeri DNA örneklerini karşılaştırarak, parmakizi eşleştirmesini oldukça kolaylaştırabilir. Bu testle, polis soruşturma altında olan bir insanın DNA'sının işlenmiş olan olay ile ilgili olup olmadığını kontrol edebilir. *Analytical Chemistry* dergisinin 5 Ağustos 2010 sayısında hızlı adli test hakkında bir rapor yayınlandı. Adli DNA testlerinin hızını artırmak için, bilim insanları bir pamuk sürüntü ile alınan DNA örneklerini kopyalamak ve analiz edebilmek için bir çip oluşturdular. Adli bilim teknisyenleri şüphelinin ağızından örnek aldıktan sonra örneği bir kaç kimyasalla karıştırıp ve ısıtarak DNA elde ederler. Bir çip üzerinde DNA testi herşeyi ortaya çıkarır. Günümüzde toplam işlem sadec e 4 saat almaktadır.

Hızlı bir sonuç için, bir şüpheli yakalandığında DNA'sının test edilmesi suçlunun yakalanması için mantıklı bir yol mudur, yoksa özel hayatın gizliliğine bir saldırı mıdır? Kararı siz verin.

Örneğin, 1988'de, Forest Hills suçlusu diye de bilinen Victor Lopez, üç kadına tecavüzden yargılanıyordu. Üç kadın da tecavüzcüyü polise anlatırken siyah bir adam olduğunu tanımladılar. Lopez siyah olmadığından dolayı, yanlış tanımlama durumu olabileceği endişeleri artmaya başladı. Acaba Lopez suçsuz bir insan olarak yanlışlıkla mı suçlanıyordu? Suçlanan Lopez'in kan örneği analiz edilerek olaya bulaşan spermle karşılaştırıldı ve DNA'ların eşleştiği görüldü. Çelişkili görgü tanığı ifadelerine rağmen Lopez saldırıların suçlusu olarak bulundu. Şimdi, öğrendiklerimizin ne kadarının delil olarak kabul edilebilir olduğuna bakalım.

Dünyadaki Olaylar Yeni Teknolojilerin Gelişmesine Yol Açar

Büyük bir facia olduğunda ve çok sayıda insanın kimliklerinin belirlenmesi gerektiğinde, DNA karşılaştırmaları yeterli değildir. Bireyleri belirlemek için daha hızlı ve daha güvenilir karşılaştırmalar veren yeni delil kataloglama yöntemleri geliştirilmiştir.

Dünya Ticaret Merkezi

11 Eylül 2001'de New York'taki Dünya Ticaret Merkezinin ikiz kuleleri terörist saldırısıyla vurulduktan hemen sonra, adli bilimciler bir araya gelerek kurbanların kalıntılarını teşhis etmek için DNA esaslı teknikleri kullanmaya yönelik çabalarını hızlandırdılar. Bölgede akıl almaz miktarda büyük bir kalıntıyla, tehlikeli çalışma koşullarıyla, sıcaklık ve kalıntıların mikrobiyal olarak bozulması ve kaybolan yaklaşık 3000 bireyin binlerce doku örnekleriyle karşı karşıya kaldılar. Bu durum, DNA profillerini hızlıca hazırlamak, organize etmek ve yakınlarının DNA profilleri ile karşılaştırmak için yeni stratejilere ihtiyaç olduğunu gösterdi. 1.5 milyon tondan fazla molozda parçalanmış insanların DNA kimliklerini bilim insanları nasıl belirleyecekti?

New York Sağlık Müdürlüğü ve tıbbi inceleme laboratuvarı gibi eyalet kurumları ve ABD Savunma Bakanlığı, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) ve ABD Adalet Bakanlığı gibi ulusal kurumlar duruma yardımcı olabileceklerini acilen bildirdiler. Faciadan sonraki 24 saat içerisinde, New York Emniyet Müdürlüğü şehirde aile bireylerinin kayıp bildirimleri yaptıkları yerlerde örnek toplama noktaları belirlediler ve bunlardan DNA izolasyonu yapmak için ağız içi hücre sürüntüleri temin ettiler. Kayıp olan kişilere ait bireysel malzemeler (tarak, diş fırçaları) de DNA profili için toplandı.

Myriad Genetics Şirketi, Gene Codes Forensics, DNA-VIEW, Celera Genomics, BodeTechnology Group ve Orchid Genescreen bu çabalara katkıda bulunan firmalar oldular. Çok sayıda başka firmalar aile bireyleri tarafından verilen örnekleri Dünya Ticaret Merkezi kurbanlarından temin edilen DNA profilleriyle karşılaştırmaya yardımcı olabilecek yeni bilgisayar programları geliştirdiler. Mevcut doku örnekleri olay yerindeki yoğun sıcaklık nedeniyle tahrip olmuş, parçalanmış DNA bulunduran, özellikle küçük kemik parçaları ve dişlerden oluşmaktaydı. Bundan dolayı, adli bilimciler profilleri geliştirmek için DNA fragmentlerinin özellikle STR, mitokondriyal DNA (mtDNA) ve SNP analizlerini kullandılar.

Öldüğü tahmin edilen 2819 kişiden 1700'den azının olay yerinde kimliklerinin belirlenmesine rağmen 15 000'den fazla doku örneğinden DNA analizi yapıldı. Bu trajedi olay yerinden elde edilen kalıntıların ve daha da önemlisi saldırı sırasında kaybolan kişilerin yakın aile bireylerinden temin edilen kalıntıları analiz ve organize etmek için yeni adli tıp stratejilerinin geliştirilmesini zorladı.

Güney Asya Tsunamisi

Aralık 2004'teki Güney Asya tsunamisi Endonezya, Sri Lanka ve Tayland afet bölgelerini ve 225 000'den fazla insanı etkileyen bir trajediydi. Michigan kökenli bir şirket olan Gene Codes **Kitlesel Ölüm Tanımla-**



KARARI SİZ VERİN

Suç Önleyen Araç mı Yoksa Özel Hayata Saldırı mı?

Narborough cinayetinde, çok sayıda kişi genel tanımlamaya (olay yeri civarında yaşayan genç insanlar) uyduğundan test edildiler. Özellikle genel tanımlar esas alınarak gerçekleştirilen çok sayıda test aşırı derecede birbirinin aksi sonuçlar sergilemesine rağmen, bu strateji katilin kim olduğu kanaatini ortaya koymuştur. Karşıt görüşte olanlar, 5000'den fazla suçsuz insanın araştırma sırasında kan örneği vermeleri için çağrılmasına ve bunca gayretlere rağmen suçlunun nerdeyse tespit edilemeyeceğine dikkati çekmektedirler. Böylesi sebepsiz testler hem Amerika'da hem de İngiltere'de artık engellenmektedir. Bununla birlikte, pek çok insan hala bir suçlu araştırılması sırasında rutin DNA delil testlerinin temel hak ve özel hayatı zayıflattığına inanmaktadır.

DNA-profilleme veri bankaları özel önem taşımaktadırlar. Günümüzde, DNA verilerinin bilgisayarla aranabilen koleksiyonlarına 50 eyaletin tamamında müsaade edilmektedir. Çoğu eyalet aynı zamanda topladıkları DNA profillerini FBI tarafından yürütülen CODIS (Kombine DNA Indeks Sistemi)'e kaydetmişlerdir. Sabıkalı suçluların profillerine ilaveten, CODIS olay yerinden alınan tanımlanmamış DNA profillerini de içerir ve bazı savunucular herhangi bir suçtan dolayı yakalanan tüm insanların DNA profillerinin eklenmesini istemektedirler. Hatta bazı eyaletler doğum sırasında tüm bireylerin DNA profillerini çıkartarak bir veri bankası oluşturulmasını ve bunu akrabalarının DNA profilleri ile karşılaştırarak suçluları belirlemede kullanılmasını önermektedirler.

2007'nin başlarında, federal hükümet 400 000'den fazla yasal olmayan göçmenin ve terörizm tutuklularının DNA profillerinin CODIS'e ilave edilmesini önerdi.

Kolluk kuvvetleri bilinen bir şüpheli olmadığı zaman veri bankalarını karşılaştırarak muhtemel şüpheliyi belirleyebilirler. (Suçların aydınlatılmasında bilgilerin nasıl kullanıldığını görmek için CODIS FBI internet sitesini ziyaret ediniz.)

Karşıt olanlar, veri bankalarının muhtemel kullanılabilirliğini tartışmaksızın, teknolojinin kötüye kullanılabileceğini düşünmektedirler. Bir kan örneğinin alınmasının bir parmakizi alınmasından çok daha müdahaleci bir işlem olduğuna dikkat çekmektedirler. Bazı durumlarda, mahkeme DNA toplamanın bir suç olduğunda hemfikirdir ve federal yasalar sebepsiz yere DNA araştırılmasını ve alınmasını yasaklar. DNA bilgilerinin ileride birgün iş arayanlar veya sağlık sigortasına başvuracakların aleyhine kullanılma ihtimali vardır. Profiller "atık" DNA esaslı olmalarına ve genetik ve diğer hastalıklar hakkında bilgi vermemelerine rağmen, orijinal örnek bir bireyin DNA'sının tamamını içerir. Bu yüzden bazıları, özel bir olay tanımlandıktan sonra tüm örneklerin imha edilmesini önermektedirler.

DNA koleksiyonlarını önerenler, veri bankalarının güvenli bir şekilde düzenlenip muhafaza edildiklerini ve örneklerin kaynağının ismiyle açık bir şekilde etiketlenmediğini işaret ederler. Sadece eğitilmiş yetkililer kan örneklerini toplar ve bu yöntem donöre herhangi bir sağlık riski oluşturmaz. Rutin kan toplanması ve DNA veri bankalarının oluşturulması suçlarla mücadele gayretlerinde önemli bir araç mı, yoksa özel hayata arzu edilmeyen bir saldırı mıdır? Araştırıcılar Narborough vakasında kullanılan genel tarama şeklini sürdürmeliler mi? Kararı siz verin.

ma Sistemi (M-FISys) adındaki bilgisayar programını Tayland Tsunami Kurbanlarının kimliklendirilme girişimlerine yardımcı olmak için modifiye etti. M-FISys başlangıçta 9/11 tradejidisi için oluşturulmuş olduğundan, Gene Codes tamamı ile yeni bilgisayar programları yazmak zorunda değildi ve ihtiyaç halinde M-FISys isteğe uygun hale getirilebilmekteydi. Mitokondriyal DNA'nın analiz edilebilmesine ilaveten (bakınız Kısım 8.6), M-FISys bireylerin kimliklendirilmelerinde Y-STR'ler olarak isimlendirilen Y kromozomundaki erkeklere özel varyasyonları da kullanmaktadır. Üç ay içerisinde yaklaşık 800 kurban kimliklendirildi.

Gene Codes aynı zamanda DNA Shoah Projesi (*Shoah* Soykırımın İbranice ismi)'nde de M-FISys kullanarak, Nazi-asrı soykırımından kurtulan ve dünyanın çeşitli yerlerine dağılmış olan yaklaşık 10 000 civarında yetimin nesillerini biraraya getirme gayretlerini sürdürmektedir.

8.4 DNA ve Delil Kuralları

DNA parmakizleri mahkemelerde kullanılmadan önce, DNA parmakizi delillerinin geçerliliğine yönelik aşırı derecede esnek olan yasal standartları karşılamaları gerekir. Mahkemeler bilimsel delillerin bir olayda kullanılıp kullanılamayacağına izin verebilmek için beş farklı standart kullanırlar. Kullanılan test yargı dairesine bağlıdır. Delilleri toplamak, işlemek veya analiz etmek için yeni bir teknik veya yöntem kullanılacağı zaman, yöntemin delilin kabul edilmesinden önce bu standartların birini veya birkaçını karşılaması gerekir.

- İlişki testi (Ulusal Delil Kuralları 401, 402 ve 403) mahkeme tarafından ilişkili olduğu düşünülen herşeye izin verir.
- *Frye* standardı (1923), delilleri bir araya getirmede kullanılan teori ve tekniklerin "bilimsel

camiada yeterince kullanılmış ve test edilmiş ve genel kabul görmüş olmasına" ihtiyaç duyar. Bu genel kabul gören test olarak bilinir.

- *Coppolino* standardı (1968), bir meslek tümüyle yeni bir yöntem ile aşina olmasa bile, eğer yeterli bulgu birikimi varsa yeni veya tartışmalı bilimin kullanılmasına müsaade eder.
- *Marx* standardı (1975), basitçe bir genel kanı testi olup, mahkemenin sunulan bilimsel delilleri değerlendirme ve anlayabilmesine ihtiyaç duyar. Bu bazen teknik dili olmayan kural olarak ifade edilir.
- *Daubert* standardı (1993), bilimsel delil için özel hazırlık aşamalarında elde edilen ifadelere ihtiyaç duyar. Daubert standardı altında, delilleri biraraya getirme ve analiz etmede kullanılan herhangi bir bilimsel işlem hakemli bir dergide tanımlanmış olmalıdır.

Hedef, delil toplamada kullanılan deneyimlerin ve bilimsel yöntemlerin güvenilir olmalarını sağlamaktır.

DNA Parmakizi ve Deliller Zinciri

DNA analizi, kötü şöhretli O.J. Simpson olayında Los Angeles Emniyet Müdürlüğü tarafından 1994'te kullanıldığı zaman, oldukça yeni bir adli araçtı. Simpson'un eski eşi Nicole Brown Simpson ve onun arkadaşı Ronald Goldman katledildiler ve Simpson ana şüpheliydi. Olay yerinden DNA analizi için kırkbeş örnek toplandı. Hazırlık soruşturması sırasında, olay yerinden toplanan DNA'nın O.J. Simpson'un DNA'sı ile eşleştiği duyuruldu.

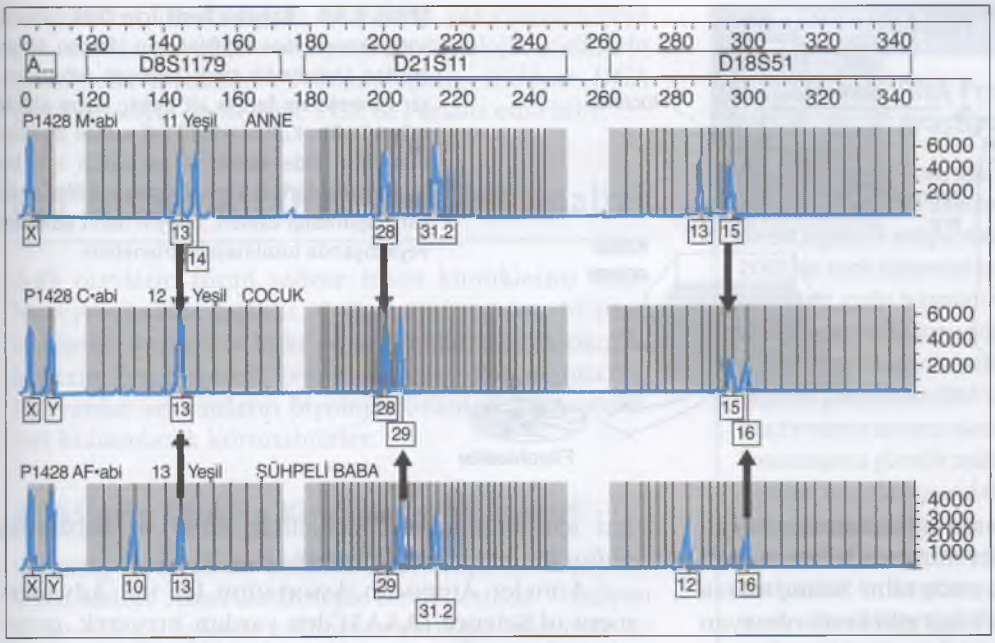
Savunma avukatı derhal örnek toplamada, işaretlemede ve delillerin test edilmesinde kullanılan işleme itiraz etti. Dava esnasında savunma, örnek toplama yöntemlerinin bir video kaydını gösterdi ve sunulan delillerin geçerlilikleri hakkında kuşku oluşturmak için, uzman görüşüne başvurulmasını istedi. Savunma, bir teknisyenin zemine dokunduğunda, plastik poşetlerin ıslak sürüntüleri muhafaza etmek için kullanıldıkları zaman ve örnek toplama penslerinin örneklere dokunmalar arasında su ile silindiklerinde kontamine olmuş olabileceği konusunda kuşku uyandırdı. Mahmekemede bir kamu görevlisi örneklerden birini yanlış işaretlediğini itiraf etti. Delilin bozulmuş olma ihtimali mahkeme ve jürinin dikkati dahilindeydi. Sonuç olarak, kovuşturma için olayı aydınlatacağı beklenilen DNA delili etkili olmadı. O.J. Simpson suçlu bulunmadı. Deliller zinciri kırıldığı zaman (delil kuralları takip edilmediği zaman), DNA örnekleri mahkemede önemlerini kaybederler.

İnsan Hatası ve Bulaşma Kaynakları

DNA delili için en önemli endişelerden biri insan hatasıdır. Daha önce, olay yeri incelemecilerin DNA delillerini toplama ve uygun bir şekilde depolamaları konusunda bazı önlemleri gözden geçirdik. Bir hapşırma, yanlış depolama, her bir örneği işaretlememe durumu küçük hatalar olarak görünmelerine rağmen, delillerin tahribiyle sonuçlanabilir. DNA delili, dikkatsiz işlenilme ve kötü koşullar nedeniyle bozulma olmasa bile, eğer "deliller zinciri" O.J. Simpson davası örneğinde gördüğümüz gibi kuşkulu olursa, ihmal edilebilir. Deliller zinciri, delillerin toplanmasını, düzenli olarak kaydedilmesini ve delillere ulaşımın kontrol edilebilmesini gerektirir. Olay yeri örnek toplaması morg gibi kontrollü bir ortamda yapılsa bile problemlidir. Morg masa ve aletlerinin incelenmesi, genellikle en azından üç bireyin DNA'larının bulunduğunu göstermiştir. Bu DNA, kesinlikle, o çevrede toplanan örneklerde gerçekleşen herhangi bir analizin sonuçlarını karıştırır.

DNA delili aynı zamanda analizler sırasında da hasara karşı hassastır (örneğin, teknisyen vücudundan veya başka kaynaklardan DNA yanlışlıkla örneğe karışabilir). Bununla birlikte, laboratuvar pratik ve işlemlerinin tanımlanan standartları bu hatalara karşı korunmaya yardımcı olabilir. DNA delilinin yeni bir fikir olduğu dönemde laboratuvarlar kontrollü yürütülmüyordu ve çok sayıda hatalar yapılıyordu. Bir kadın ve onun iki yaşındaki çocuğunun ölümünün söz konusu olduğu *New York v. Castro* olayını düşünelim. Savunma olay yerinden toplanan DNA ve şüphelinin DNA'sından Southern blot yöntemiyle üretilen otoradyogramları (RFLP'ler) sunarak ikisinin birbirine benzer olduklarını savundu. Bununla birlikte, savunmanın bir uzman tanığı bantların çoğunun kesinlikle eşleşmediğini işaret etti. Bu durumda, teknisyenler otoradyogramların analizi ve değerlendirilmesi sırasında yanlış yapmıştı. Neyse ki, delillerin kabul edilebilirlik standartları yüksek olduğu ve savunma DNA uzmanına ulaşabildiğinden bu hatalar mahkemenin yanlış bir karar vermesine yol açmadı. Bu delile dayanarak şüpheli olayla ilişkilendirilmedi.

DNA'nın güvenilirliğini garanti eden bir diğer kriter de, örnekleri çalışan laboratuvarın yüksek standartlarda olmasıdır. American Society of Crime Laboratories Directors (ASCLD), National Forensic Science Techonology Center (NSFTC) ve College of American Pathologists (CAP) kurumları adli laboratuvarlara akreditasyon sağlarlar. Bu sınavlar, teknisyenin işlenilen örneğin yetkili kurum tarafından gönderilen bir test örneği olup olmadığını anlamaması için "bilinmeyen" örnekler de içerir. Buna ilaveten, FBI suç durumlarındaki delilin DNA örneklenmesi hazırlık aşamaları için standart bir çalışma yöntemi geliştir-



ŞEKİL 8.9 Babalık İnkarı Bir erkek, çocuğun babası olmadığını iddia etmekte, fakat DNA allellik karşılaştırması çocuğun her bir ebeveynden bir allel aldığını göstermektedir. Çocuğun DNA parmakizinde görünen her ebeveynin iki allelinden (bantlardan) birini nasıl aktardığını görmek için ebeveylerinden çocuğa doğru çıkan okları takip ediniz.

miştir. Açık izlenilecek talimatlar ve delilleri toplayıp muhafaza eden ilgili kişilerin eğitilmeleriyle, mahkemeye sunulan DNA delillerinin geçerliliği artmaktadır.

DNA ve Jüri Heyeti

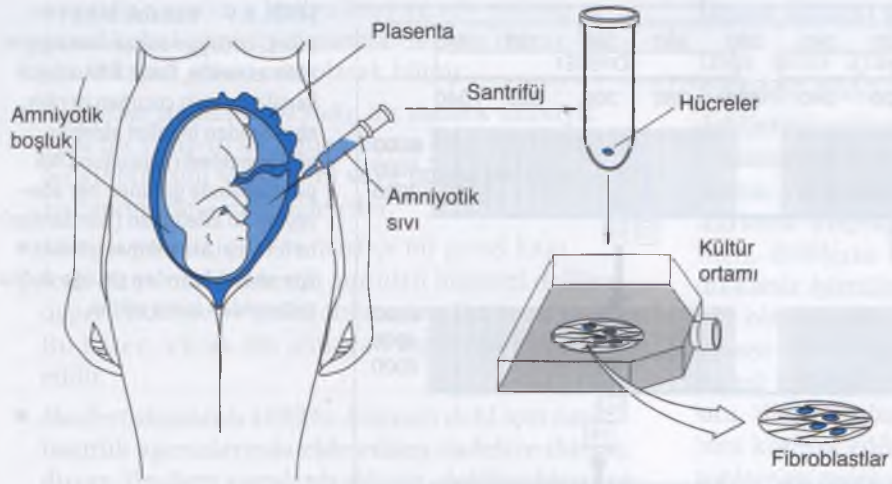
DNA delilinin kullanılması aynı zamanda bir başka avantaj sunar. Faydalı olmak için, bilim, olayı değerlendiren jüri için mantıklı olmak zorundadır. DNA delili normalde istatistiki olduğundan, özellikle çok sayıda insan rol aldığı zaman sonuçlar yeterli eğitime sahip olmayan bir kişiye karışık gelebilir. Bir jüri heyeti üyeleri özellikle "50 milyarda bir" olasılıklı rastgele eşleşmenin olduğunu duydukları zaman, muhtemelen o bir ihtimale ve o inanılmazın gerçekleşmesine inanmaya odaklanabilirler. Çalışmaların geleneksel parmak izinin istatistik olarak çok daha *az* geçerli olduğunu göstermesine rağmen, aynı jüri heyetinin onu geçerli bir delil olarak kabul edebilmesi oldukça ilginçtir. DNA delilini jüri heyetine açık ve anlaşılabilir yapmak kolay bir şey değildir. Ve eğer delil açıkça anlaşılmazsa, göz ardı edilebilir.

8.5 Ailesel Yakınlıklar ve DNA Profilleri

DNA parmakizinin tek adli uygulaması suçun aydınlatılması değildir. Aile bireyleri çok az miktarda ortak DNA'ya sahip olduklarından, yakınlıklar iki birey arasında örnekleri karşılaştırarak nihai bir şekilde belirlenebilir. Bunun bariz bir kullanılışı babalık testidir (Şekil 8.9). Her yıl Amerika, Kanada ve İngiltere'de yaklaşık 400 000 babalık davası kaydedilir. Çocuk ve yetişkinlerin verdikleri örnekler, çocuğun babasını belirleyerek, çocuğun destek veya yasal himayesini nispeten kolaylaştırır. Bununla birlikte, üretim teknolojisi (in vitro fertilizasyon, suni döllenme, başka çiftin çocuklarını taşıma=surrogacy) himaye ve babalığa bir kaç ilginçlik getirmiştir. DNA testi, döllenme kliniklerindeki sperm karışıklıklarından kaynaklanan mahkemelik durumları çözmeye de yardımcı olmuştur. Şekil 8.10'da gösterildiği gibi, amniyosentez sayesinde bir çocuğun babasını doğumdan önce bile belirleyebilmek mümkün olmaktadır.

Mitokondriyal DNA Analizi

Mitokondriyal DNA analizi RFLP veya STR ile analiz edilemeyen örneklerdeki DNA'yı incelemek için kullanılabilir. RFLP, PCR ve STR'de kullanılmak için örneklerden nüklear DNA elde etmek gerekirken, mtDNA analizi *mitokondri* adında bir hücresel organelden elde edilen DNA'yı kullanır. Saç, kemik ve diş gibi nükleus içermeyen yaşlı biyolojik örnekler STR ve RFLP ile analiz edilemezler, ancak mtDNA ile analiz edilebilirler. Embriyoların mitokondrileri annenin yumurta hücresinden geldiğinden, bütün kızlar anneleri ile aynı mitokondriyal DNA'ya sahiptirler. Babanın spermi sadece nüklear DNA sağlarken, mitokondri sağlamaz. Tanımlanmamış bir kalıntının mtDNA profilinin anne tarafından bir akrabanın profili ile karşılaştırılması, aynı mtDNA profilini paylaşıp paylaşmadıklarını ve birbirleriyle ilişkili olup olmadıklarını belirleyebilir.



ŞEKİL 8.10 Babalık Testi İçin DNA Babalık sorgulaması yapan çiftler için, fetusu saran sıvıdan (amniyotik sıvı), büyüyen fetusa zarar vermeksizin fetusa ait birkaç hücre almak mümkündür. Kültür edildikleri zaman bu hücreler DNA elde etmek ve parmakizi için bir kaynak olabilirler. Şüpheli babanın DNA'sı ile karşılaştırıldığı zaman, bireyin dahil edilmesi veya dışarıda tutulması belirlenebilir.

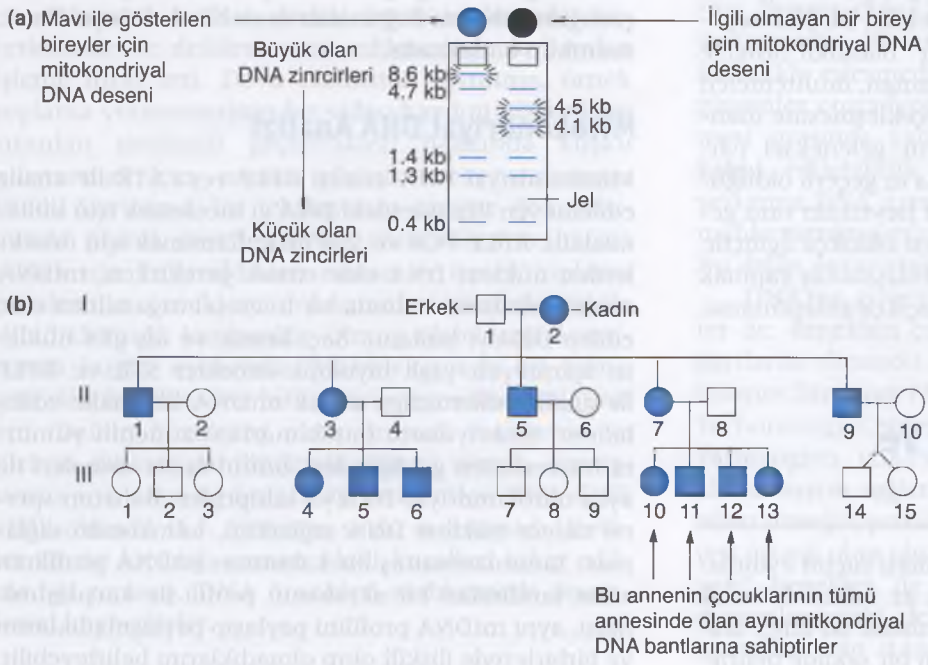
mtDNA nesilden nesile nispeten aynı kalırken, değişiklik sadece rastgele mutasyon sonucunda her milyon yılda yaklaşık % 2 ile % 4 arasında olur. Sonuç olarak akrabalık **Şekil 8.11**'de gösterildiği gibi kesik olmayan maternal yol boyunca takip edilebilir.

mtDNA delili, 1980'lerin başlarında, Falklands savaşı sırasında Arjantin'de parçalanmış aileleri bir araya getirme sırasında önemli oldu. Bu baskı rejimi sırasında, askeri hükümet yıkıcı faaliyetlerin sorumlusu olarak her şüpheliyi yakaladı ve sorguladı. Yakalananlar arasında çok sayıda genç hamile kadın vardı. Yakalanan ve sorgulananların yaklaşık 15 000'i ortadan kayboldular. Hükümetin 1983'te yıkılmasından sonra, "kaybolan" kadınların anne ve babaanneleri korkunç olayın halen devam ettiğini fark ettiler; kızlarının hapiste doğurduğu çocuklar alınıp yetiştirilmeleri için başkalarına, genellikle anne ve babalarını öldüren ailelere verilmişlerdi.

Anneler American Association for the Advancement of Science (AAAS)'den yardım isteyerek, genetik testlerin alınan çocukların kimliklerini ispatlamak için kullanılıp kullanılamayacağını sordular. Bu kadınların çabaları ve yardımcı olmaya gönüllü olan bilim insanları sayesinde, AAAS, 51 çocuğun yasal olmadan sahiplenildiğini ispatladı. DNA delili mahkemede çocukların yaşayan akrabalarına iade edilmeleri için kullanıldı.

Y-Kromozomu Analizi

Y kromozomu direkt olarak babadan oğula geçtiğinden, Y kromozomu üzerindeki genetik işaretlerin ana-



ŞEKİL 8.11 Kalıtımın Anne DNA Deseni Mitokondri görevi (hücre solunumu) için kilit genler insan mitokondrilerindeki küçük bir DNA halkasında bulunur. Mitokondriler döllenme öncesi yumurta (sadece) tarafından sağlandığından, DNA mitokondriyal DNA'nın parmakizi ile maternal olarak takip edilebilir. Mitokondrilerdeki bazı genler mutasyonlardan dolayı farklılıklar gösterirken (8.6,4.7 ile 4.5,4.1 kilobazlardaki jelin üst kısmına bakınız) diğerleri göstermez.

liz edilmesi, olayla ilişkili erkeklerin yakınlığının veya çok sayıda erkeğin rol oynadığı biyolojik delillerin analizinde faydalıdır. Y kromozomu, nüklear DNA yöntemleriyle (genellikle PCR ile) analiz edilebilir.

8.6 İnsana Ait Olmayan DNA Analizi

Adli olayların tümü sadece insan kimliklerini belirlemeye yönelik değildir. Çoğu yasal sorular, bilimsel endişeler ile birlikte bitki ve hayvanların DNA parmakizlerini inceleyerek cevaplanmıştır. Pahalı bitkiler, hayvanlar ve bunların biyolojik ürünleri DNA profilleri kullanılarak korunabilirler.

Bitkilerin DNA ile Kimliklendirilmeleri

Ginseng kıymetli bir bitkisel ürün olup, ticari piyasasının sadece Amerika Birleşik Devletlerinde 3 milyon dolar olduğu tahmin edilmekte ve diğer ülkelerde de yüksek olduğu bilinmektedir. Günümüzde, iki bitkisel ürün ginseng olarak ifade edilmektedir. Biri Kuzey Amerika'ya diğeri ise Asya'ya özgüdür. İşin tuhafı Asya ginsengi, genellikle Amerikan aktarlarında satılmakta olan tiptir. İki ginseng tipi de tamamıyla benzer görünürken farklı öneme sahiptirler. Asya ginsenginin enerji artırıcı olduğu iddia edilirken, Amerikan ginsenginin sinirleri yatıştırma özelliğinde olduğu bilinir. Üreticiler iki varyete arasındaki farklılığı ortaya koymak için günümüzde DNA dizi analizini kullanmaktadırlar. Ürünün kaynağının belirlenmesi kalite kontrolünü garanti ederken, Amerika ginseng ürünleri için piyasayı kontrol etmektedir.

Benzer tür analizler başka bitkiler için de kullanılmaktadırlar. Kabak tohumlarının kalite kontrolünde kullanılan DNA profili **Şekil 8.12**'de gösterilmektedir. Bu kalite kontrol işlemi tohum üreticilerine genetik hibritliğin özel bir derecesini garanti eder, böylece



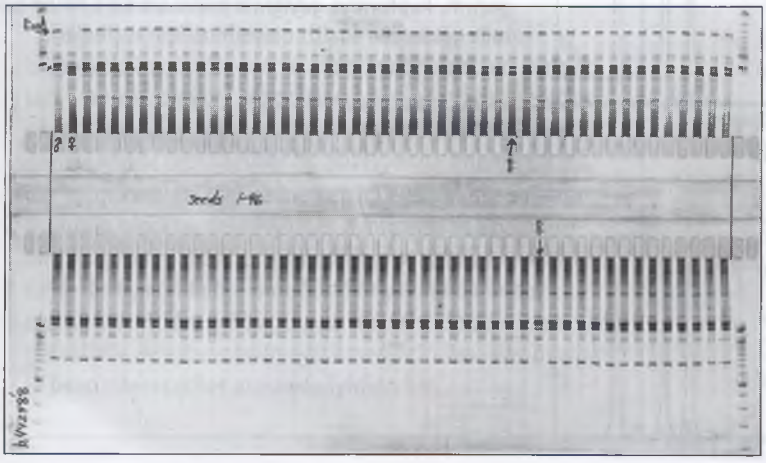
TİCARET ARAÇLARI

DNA Profilleri Biyolojik Araştırmaları Geliştiriyor

Yasal adli kovuşturmalarda kullanılmalarına ilaveten, hayvanların DNA profilleri direkt biyolojik araştırmalarda da kullanılmaktadır. 2002'de nesli tükenmekte olan bizon sürülerinin DNA analizleri, çoğu bizonların bazı ev hayvanlarıyla atasal olarak yakın olduğunu göstermiştir. Bu hayvanların "hibrit" özelliklerinin herhangi bir dış işareti olmamasına rağmen yakınlıkları DNA'larında açıkça görünmektedir. Bu araştırmanın sonucu olarak, var olan "saf" sürülerin korunmasına yönelik tedbirler alınabilir.

Bilim insanları yuvadaki yavruların gerçekte farklı babalara sahip olup olmadıklarını belirlemek için ebeveyn kuşların ve yavrularının DNA'larını incelediklerinde baştankaralar, kırlangıçlar, çivit çinteleri ve diğer türlerin tek soylu olmadıklarını gördüler.

Buna ilaveten, mitokondriyal DNA (mtDNA) analizlerinin evrimsel biyoloji hakkında yeni bilgilerin zengin bir kaynağı olabileceği gösterilmiştir. Mitokondrilerin her milyon yılda % 2 ile % 4 oranında mutasyona uğraması bilim insanlarına zaman içerisinde gen değişmelerindeki sıklığı izleme olanağı verir. mtDNA'sındaki değişme sıklıklarını kullanarak, bilim insanları benzer hayvanlar arasındaki farklılıkları ayırt edebilmekte ve evrim boyunca baz değişimlerinin etkisini inceleyebilmektedir. Direkt dizi tanımlamaları için sadece bir nanogram mtDNA'ya ihtiyaç vardır. Günümüzde dünyada yaşayan insanların mtDNA delillerinin kullanıldığı "Eve (Havva) hipotezi"ne göre, insanların atalarının Afrika'dan orijinlenen tek bir dişi olduğu ileri sürülmektedir. Bu çalışmanın sonuçları günümüzde Y kromozomundaki dizi farklılıklarını takip eden benzer insan orijini çalışmasıyla karşılaştırılmaktadır.



ŞEKİL 8.12 Bir Kalite Kontrol Analizi Olarak Kabak Hibritlerinin DNA Profillerinin Kullanılması Anod bu jelin merkezinde olurken katotlar üst ve alttadır. 96 tohuma ait DNA jelin merkezine yüklendiği zaman, elektroforez sırasında katotlara hareket edecektir. Test edilen hibrit döl bitkilerin aşağıdaki iki bandı dişi bitkiden gelirken yukarıdaki DNA bantları erkek bitkiden gelir. Hibrit bitkilerin hepsi her iki banda sahiptirler (test edilen 96 tohumdan biri hariç diğerleri % 98.9 saf olduğunu gösteriyor). Hibritliğin bu seviyesi (kalite kontrol) büyüme özellikleri için yüksek bir seviyede hibritliğe bağlı olarak yetiştiriciler için tohumun değerini artıracaktır.

yüksek değerli ürünler satmaya çalışan üreticiler için tohumların değerini artırır.

Bitki dünyasının bir başka ilginç "ebeveyn" olayı ise şarap üreticileri için oldukça önemli olan cabernet sauvignon üzümlerinin atasını bulma olmuştur. Hibrit üzümler bazı şarap üreticileri tarafından arzu edilmeyen bir durum olup, Fransa'da yasal olarak büyük itibar gören "*appellation d'origine contrôlee*" dışında tutulur. Bilim insanları cabernet sauvignon bitkilerinin DNA'sını inceledikleri zaman, başka iki varyete olan cabernet franc ve sauvignon blanc üzümlerinin cabernet sauvignonun ataları olduklarını gördüler. Bu bulgular, eskiden beri inanılan, melezlemeyle geliştirilen çeşitlerin şaraplık üzüm olarak daha az kıymetli olduğu fikrine karşı gelmektedir.

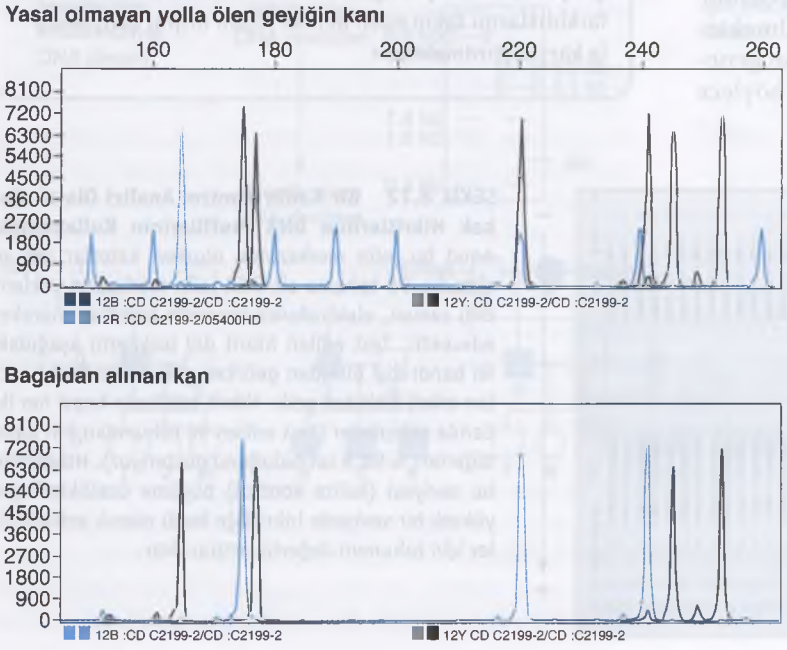
Hayvan DNA'sı Analizi

DNA delili aynı zamanda hayvanların genetik profillerini oluşturmak için de kullanılmaktadır. Örneğin, Pennsylvania'da DNA parmakizi bir avcının yasal olmayan bir şekilde bir ayıyı öldürmüş olduğunu ispatlamak için kullanıldı. Bu eyalette ayı öldürme sezonu gebe olanları korumaya yönelik düzenlenmiştir. Yoğun oldukları dönemlerde ayıların yasal olmayan şekillerde öldürülmelerini engelleyen bir kanun, çiftleşen dişi popülasyonunun önemli bir sayısını sezon süresince kaybetmeden korumuş olacaktır. Bu olayda, bir şahit, bir avcının tüfeğini bir ayının sığınağına doğru ateşlediğini gördüğünü belirtti. Avcı öldürdüğü hayvanı uygun kontrol istasyonunda kaydetti (öldürme şeklini bildirmeden). Burada eyalet avlanma yönetmeliğinde belirtildiği gibi öldürülmüş ayının küçük azı dişi ölüm yaşı ve cinsiyetini belirlemek için alındı. Bu görsel şahitlik raporu araştırmanın bir parçası olarak değerlendirildi ve uzmanlar sığınaktan aldıkları kan örneklerini kontrol istasyonundaki sığınaktan aldıkları DNA ile karşılaştırdılar. Avcı, karşı bir tavırla, ayıyı sığınaktan 5 mil ötede öldürdüğünü iddia etmesine rağmen, testler DNA örneklerinin aynı hayvandan alındıklarını ortaya koydu. DNA delili ile avcı suçlu bulundu.

DNA profilleme böylesi durumlarda düzenli olarak yaban hayatı idari yetkilileri tarafından yürütülmektedir. Örneğin **Şekil 8.13**, tek bir geyiği öldürmesine müsaade edilen bir avcının, öldürdüğü dört geyiğe ait DNA profillerini göstermektedir. DNA parmakizi araçlarıyla donatılan yaban hayatı yetkilileri yasalar tarafından oluşturulan sınırların ötesinde gerçekleşen oyunları kanıtlayabilme becerilerini artırmışlardır.

Dolandırıcılığın DNA ile İzlenmesi

Ürün kalpazanlığına ve korsanlığa karşı önemli derecede etkili bir engel muhtemelen çok çeşitli ürünlerde DNA'yı gizli bir doğrulama işareti olarak kullanmaktır. Güzel sanatlardan spor hatıralarına kadar nerdeyse her değerli şeye DNA yerleştirilebilir. DNA işaretleri daha sonra orijinalliğini ispatlamak için PCR ve hibridizasyon teknikleri kullanılarak belirlenebilir. Örneğin, 2011 Amerika Süper Kupası'ndaki toplar orijinalliğini korumak için Ulusal Futbol Ligi'nin resmi ürünü olarak DNA ile işaretlendiler. 2010 Sydney Yaz Olim-



ŞEKİL 8.13 Yasak Geyik Avlamada Mikrosatellit Delilin Doğrulanması Yol kenarında iki geyik (yasal olmayan yolla öldürülen) bulundu. Şüphelinin arabasının bagajında bir kan lekesi (geyik) vardı. Bagajda bulunan kana ait DNA geyiğinkiyle eşleşti ve şüpheli mahkum edildi, 2 000 dolar cezaya çarptırıldı ve bir yılı hapiste geçirdi. Kaliforniya geyiğinin mikrosatellit STR'leri burada gösterilen analizi oluşturmak için keşfedildi.

piyatları sırasında Halifax, Nova Scotia DNA Teknolojileri 34 milyon etiketi özel DNA zinciriyle işaretledi ve daha sonra etiketler olimpik lisanslı ürünlere tutturuldular. Sydney'deki ürünlerinin satıcılarının rastgele denetimi, resmi olarak lisanslı satılan ürünlerin yaklaşık % 15'inin gerçekte taklit olduklarını, yaklaşık 1 milyon dolar satış kaybına sebep olduklarını belirledi.

Şu ana kadar, DNA'nın neden iyi bir adli işaret olduğunu öğrendiniz. Aynı sebepler DNA'yı taklit edilmesi zor olan iyi bir fiziksel işaret yapmaktadır. Tipik olarak, DNA işaretleri 20'den binlerce nükleotid uzunluğunda rastgele tek zincirli diziler içerir. Bu diziler daha sonra mürekkep, elbise, iplik veya ürünlerde kullanılan diğer materyalleri takip etmek için kullanılırlar. Bir ürünün orijinal bir ürün olup olmadığını belirlemek için DNA işareti içeren bir parça alınır ve PCR analizi yapılır veya proplar ürüne ilave edilerek eğer üründeki tek zincirli etiketler ile hibritleşirse floresan işaret vermesi sağlanır. DNA işaretleme kalpazanlıkla mücadele etmek için yaygın olarak kullanılmaya başlanmıştır.



KARİYER PROFİLİ

Laboratuvar Teknisyeni

Laboratuvar teknisyenleri, olay yerlerinden toplanan delillerdeki testleri gerçekleştirmek için genellikle DNA parmakizi laboratuvarlarında çalışırlar. Bu teknisyenler, talimatları büyük bir titizlikle takip etmek zorundadırlar. Çalışma alanını kontaminasyondan korumak amacıyla temiz tutmaya büyük özen gösterirler. Gerçekte, adli tıp laboratuvarında çalışan teknisyenlerin tümü çalışabilmenin bir koşulu olarak bir kantitatif analiz kursunu geçmek zorundadırlar. Teknisyenler sıklıkla özel "temiz bir oda" ortamında güvenlik elbisesi giyerek çalışmak zorundadırlar. Maaş sınırları başlangıç çalışanları için yıllık 21 000-35 000, deneyimli teknisyenler için ise 25 000-60 000 dolardır.

Çoğu işverenler biyoloji, biyokimya veya moleküler biyolojide lisans dereceli kişileri tercih ederler. Bazıları biyoteknoloji ve laboratuvar deneyimli özel eğitim derecesine sahip olanları tercih ederler. Laboratuvar deneyiminde tecrübeliler bu pozisyonda önemli olup, deneyim kurslar, staj ve meslek içi eğitimlerle sağlanır. Bununla birlikte, teknisyenler aynı zamanda iyi matematik ve iletişim becerisine sahip olmalılar. Laboratuvar defterleri yasal belge olduğundan yazma da öncelikli olarak önemlidir. İyi bilgisayar becerisi de aynı zamanda gereklidir. Araştırıcıların eğitilmesi için fırsatlar özellikle lisans dereceliler arasında iyidir.

BİR FARK YARATMAK

İnsan genom dizi analizi maliyeti kolaylaştıkça, çoklu insan genomlarının karşılaştırılmasından elde edilen bilgiler çok daha kıymetli olmaktadır. Çok sayıda kişiden elde edilen DNA dizilerinin bir karışımı olan insan referans genomu ilk olarak 2001'de oluşturuldu ve o tarihten beri genomik araştırmalarda karşılaştırma için kullanılmaktadır. 2010'da, University of Washington'daki Dr. Evan Eichler öncülüğündeki araştırıcılar başlangıç insan referans dizilerinde bulunmayan 2 363 DNA dizisi keşfettiler. İnsan referans dizisinin her bir parçası bir kişiden olduğundan, yeni keşfedilen dizileri temsil etmezler. Başlangıç referans genomun yaklaşık % 80'inin sekiz kişiden geldiği düşünüldüğünde bu çok sürpriz değildir. Araştırıcılar bu yeni keşfedilen dizilerin farklı popülasyonlarda bazılarının yaygın veya nadir olduğunu ve bazılarının farklı memeli türlerinde (şempanze, Bornea orangutanı, Rhesus maymunu, ev faresi, Norveç sıçanı, köpek ve at) farklı olduğunu buldular. 1000 Genom Projesi (1000 ismi bilinmeyen bireyin tam genom dizisine yönelik uluslararası işbirliği) ve diğer genom çalışmaları orijinal referans genoma (tam olmayan) haritalanacaktır. İnsan DNA'sı üzerinde yeterli miktarda veri oluşturulmaktadır. DNA dizileme işlemi genellikle teknik ve DNA teknolojisi için önemli bilgiler sağlayacak "en son referans insan genomu" na katkı sağlayacak önemli fırsatlar sunacaktır.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Polimorfik DNA lokusunun ne anlama geldiğini açıklayınız.
2. Polimorfik DNA dizileri (örn. VNTR'ler) bir kişiyi nasıl etkiler?
3. Bir çocuğun DNA'smda bulunan STR bantlarının kaçı çocuğun babasının? Kaç tanesi annesinin DNA parmakizinde bulunabilir?
4. PCR-esaslı DNA parmakizleri adli olaylarda neden RFLP'den daha yaygın olarak kullanılır?
5. Bir teknisyenden kaynaklanan kontaminantlar bir DNA parmakizini nasıl etkileyebilir?
6. Bir görgü şahitliği niçin DNA parmakizinden daha az güvenilirdir? (Bir örnek veriniz.)
7. Cabernet sauvignon'un cabernet franc ve sauvignon blanc arasındaki bir melez olduğunu ispatlamak nasıl mümkün olur?
8. Kantitatif bir DNA testini (slotblot) eğer iki kat DNA ile gerçekleştirirseniz ne tür bir sonuç beklersiniz? Niçin bunu yaparsınız?

9. Bir *Olay Yeri Araştırması* kısa filmi izlediğinizde kaç tane hata sayabilirsiniz?
10. mtDNA delilin nasıl kullanıldığına bir örnek veriniz.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM 9

Biyoremediyasyon

Çevirenler: Abdullah Tahir BAYRAÇ, Ahmet YILDIRIM

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Biyoremediyasyonun ne olduğunu tanımlayabilmeli ve niçin önemli olduğunu açıklayabilmelisiniz.
- Biyoremediyasyon stratejilerinin diğer temizleme yaklaşımlarına göre avantajlarını tanımlayabilmelisiniz.
- Farklı çevre ortamlarında temizlenmesi gereken yaygın kimyasal kirleticileri isimlendirebilmelisiniz.
- Aerobik ve anaerobik biyoayrıştırmayı ayırabilmeli ve biyoremediyasyona yardımcı olan mikroplara örnekler verebilmelisiniz.
- Biyoremediyasyonla ilgili organizmaların genomlarının incelenmesinin neden aktif bir araştırma alanı olduğunu açıklayabilmelisiniz.
- Fitoremediyasyonu tanımlayabilmeli ve çevre temizliğinde nasıl kullanılabileceğini anlamalısınız.
- Toprak ve suyun biyoremediyasyonunda in situ ve ex situ yaklaşımın nasıl kullanılabileceğini tartışabilmelisiniz.
- Atık su temizleme tesislerinde biyoremediyasyonun rolünü tartışabilmelisiniz.
- Genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO) biyoremediyasyonda nasıl kullanıldığına örnekler verebilmelisiniz.



Dünyadaki atık alanları her gün üretilen çöplerle dolup taşmaktadır. Biyoremediyasyon çevredeki kimyasalların temizlenmesi, atık alanlarındaki çöp miktarının azaltılması hatta toplumun ürettiği çöplerden enerji üretilmesi gibi birçok alanda büyük potansiyele sahiptir.

Çevremiz alarm veren sıklıkta tehdit ediliyor. Soluduğumuz hava, içtiğimiz su ve beslenmek amacıyla bitkileri yetiştirmek için güvendiğimiz toprak insan aktivitelerinin doğrudan bir sonucu olarak kirlenmektedir. Ortalama bir Amerikalı günlük olarak yaklaşık 2.5 kg çöp üretmekte, bu kişi başına yılda 850 kg'dan fazlaya denk düşmekte ve sonuç olarak her yıl toplam yaklaşık 250 milyon ton atık maddeye neden olmaktadır. Bu atıkların sadece yaklaşık 1/3'ü (yaklaşık 83 milyon ton) geri dönüştürülür veya kompoze edilir; geri kalanı çöp toplama alanlarına gider. Ancak ev atıkları sorunun kısmen küçük bir bölümüdür. Kimyasal döküntülerden olduğu kadar, endüstriyel üretim atıklarından oluşan kirlilik, ev ürünleri ve pestisitler çevre kirliliğine neden olurlar. Artan sayıdaki toksik kimyasallar dünya genelinde çevre sağlığına ve içinde yaşayan organizmalara ciddi tehlikeler oluşturmaktadır.

Biyoteknoloji insan sağlık sorunlarının tanımlanması ve çözülmesi için bir anahtar olarak kabul edildiği gibi, aynı zamanda kirlenmiş çevrelerin zayıf sağlığının çalışılması ve düzeltilmesi için de güçlü bir araçtır. Bu bölümde biyoteknolojinin kirlilik sorunlarımızın bazısının çözümüne nasıl yardım edebileceğini ve biyoremediyasyon yoluyla insanlar ve yaban hayatı için daha temiz çevreleri nasıl oluşturabileceğini gözden geçireceğiz.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Biyoremediyasyon için birçok heyecan verici potansiyel gelecek istikameti vardır. Önemli gelişmelerin en olası alanları arasında; daha önceden keşfedilmemiş metabolize edici mikropları bulmak için küresel çabalar, kirlilik-önleyici bitki ve bakterilerin tasarımı için bu mikrop genomiklerinin çalışılması olacaktır. Örneğin, bu bölümde bilim insanlarının Meksika Körfezindeki *Deepwater Horizon* petrol bulaşık bölgesindeki petrol ayrıştıran mikropları nasıl keşfettiklerini tartışacağız. Ağır metaller ve radyoaktif bileşikler gibi toksik ve zararlı kirleticileri ayrıştırmak için genetik olarak değiştirilmiş mikrop ve bitkileri oluşturmak biyoremediyasyonun bir hedefi olmaya devam edecektir. Aynı zamanda, yapay biyoloji uygulamaları, belli kirleticileri ayrıştırmak için özelleştirilmiş genleri içeren yapay genomlu metabolik mikropların tasarlanması da göz önünde bulundurulacaktır.

9.1 Biyoremediyasyon Nedir?

Biyoremediyasyon çevredeki kimyasal bileşikleri indirgemek veya ayrıştırmak için bakteri, mantar ve bitkiler gibi yaşayan organizmaların kullanılmasıdır. Bu işlem doğal kimyasal reaksiyonların avantajını kullanır ve organizmaların besin sağlamak ve enerji elde etmek için bileşikleri parçalamaları yoluyla çalışır. Örneğin, bakteriler adenozin trifosfat (ATP) üretmek için şekerleri metabolize ederler. Ancak enerji elde etmek için doğal bileşikleri ayrıştırmalarına ek olarak, birçok mikrop insan yapımı kimyasalları ayrıştırmak için kullanılabilecek eşsiz metabolik reaksiyonlar geliştirmişlerdir. Biyoremediyasyon, zararlı materyalleri daha az toksik bileşikler haline ayrıştırmak için, yaşayan organizmaları kullanarak kirleticilerle bulaşmış çevreleri temizler.

Biyoremediyasyon yeni bir uygulama değildir. İnsanlar binlerce yıldır atık materyalleri azaltmak için biyolojik işlemlere güvendiler. En basit şekliyle foseptik çukurları – insan atıklarını ayrıştırmak için topraktaki doğal mikroplara güvenen – biyoremediyasyonun bir örneğidir. Benzer şekilde lağım temizleme tesisleri uzun yıllardır insan atıklarını ayrıştırmak için mikropları kullanmaktadır. Ancak bu bölümde öğreneceğiniz gibi, biyoremediyasyondaki modern uygulamalar birçok farklı çevredeki toksik kimyasalların geniş bir aralığını temizlemek için geliştirilen yeni ve yaratıcı stratejileri içermektedir.

Birçok mikrobun halen yaptığı şeyin avantajını kullanmak, biyoremediyasyonun sadece bir yönüdür. Onun temel hedeflerinin biri, temizleme süreçlerini hızlandırmak için doğal mekanizmaları geliştirmek ve biyoremediyasyon oranlarını artırmaktır. Bu bölümde bilim insanlarının birçok farklı durumlarda farklı atıkları ayrıştırmak için mikroplar ve diğer organizmaları teşvik edebilecekleri yöntemlerin bir kısmını inceleyeceğiz. Biyoremediyasyonun diğer bir önemli yönü bitkiler ve genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanımını da içerebilen, çevredeki atık materyallerin biyoayrıştırması için yeni yaklaşımların geliştirilmesidir.

Biyoremediyasyon Niçin Önemlidir?

Yaşam kalitemiz çevrenin temizliği ve sağlığı ile doğrudan bağlantılıdır. Çevresel kimyasalların genetiğimizi etkileyebileceğini ve bazı kimyasalların insan hastalıklarına neden olan mutajenler olarak rol oynayabileceğini biliyoruz. Açıkçası, hem kısa hem de uzun süreli kimyasala maruz kalma ve insanlar ile diğer organizmalar üzerine çevresel kimyasalların etkileri hakkında endişeli olmak için nedenlerimiz var.

Bazı hesaplamalara göre, ABD'de her yıl 200 milyon tondan fazla zararlı materyal üretilmektedir. Kazaen kimyasal bulaşma olabilir ve olmaktadır, ancak bu olaylar tipik olarak çevre üzerindeki etkilerini en aza indirmek için hızlı bir şekilde temizlenmektedir. Bununla birlikte, daha problemli olanı, yasal olmayan çöp boşaltma işlemleri ve depolanmış

kimyasalların çevreye sızdığı terk edilmiş depolar gibi umursamazlık yoluyla olan bölgesel kirlenmedir. 1980 yılında, ABD Kongresi **ABD Çevre Koruma Dairesi**nin (EPA) girişimiyle, dikkatsiz ve hatta umursamaz kimyasal boşaltım ve depolama uygulamalarını önlemek ve bu kirleticilerin insan sağlığı ve çevreyi nasıl etkileyebileceği üzerine olan endişeyi belirtmek için **Superfund Programı**nı başlattı. Superfund Programının birincil amacı, ABD vatandaşlarını bulaşık alanlardan korumak için zararlı atık bölgelerini saptamak ve temizlemektir.

Beş Amerikalı'dan biri EPA tarafından iyileştirilmiş kirli bir bölgenin 3-4 mil yakınındaki bir alanda yaşamaktadır. Superfund Programının başlangıcından bu yana geçen 25 yıldan fazla sürede, EPA ABD'de 700'den fazla alanı temizledi. Buna rağmen, 1000'den fazla alan temizlenmeyi bekliyor ve Enerji Bakanlığı her yıl birçok yeni bölgenin tanımlanmasıyla 220 000 kadar bölgenin temizlenmeye ihtiyaç duyduğunu hesaplamaktadır. ABD'de halen tanımlanmış kirlenmiş alanların temizlenmesi için 1.5 trilyon dolardan daha fazla kaynağa ihtiyaç duyulduğu hesaplanmaktadır. Açıkçası çevresel kirlilik ABD'de oldukça fazla ilgi çeken önemli bir sorundur. Diğer birçok ülkede çevre kirliliği daha büyük sorundur.

Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün bir bölümü olan Ulusal Çevre Sağlığı Bilimleri Enstitüsü kanalıyla ABD **Çevresel Genom Projesi**ni başlattı. Bu projenin birincil amacı çevresel kimyasalların insan sağlığı üzerindeki etkilerini çalışmak ve anlamaktır. Proje çevresel ajanlara duyarlı olan genlerin incelenmesini, detoksifikasyon genleri hakkında daha fazla bilgi edinilmesini ve insan sağlığı üzerinde çevresel etkilerin belirteci olabilecek tek nükleotid polimorfizmlerinin (SNP) tanımlanmasını içermektedir. Sonuçta bu proje bilim insanlarına sadece çevrenin hastalık riskine nasıl katkıda bulunduğunu göstermekle kalmayacak; aynı zamanda belli hastalıkların çevresel kimyasallara maruz kalınmayla nasıl etkilendiğini daha iyi anlamalarına yardımcı olacak epidemiyolojik çalışmalarını gerçekleştirmek için genom verileri üretecektir.

Bizler çevrenin insan sağlığını etkileyebilen bir sorun olduğunu biliyoruz. Bununla birlikte, kirleticileri temizlemek için birçok yol varken, neden biyoremediyasyon kullanılır? Toprak veya kimyasal olarak bulaşık alanlardaki bulaşmış materyali fiziksel olarak uzaklaştırabiliriz, ancak bu işlemler çok pahalı olabilir ve kimyasal uygulamaların kendisi de temizlemeyi gerektiren kirlilik oluşturabilirler. Biyoremediyasyonun ana avantajı; zararlı kirleticileri göreceli olarak karbondioksit, klor, su ve basit organik moleküller gibi zararsız materyallere dönüştürecek bir yaklaşım olmasıdır. Temizleme sürecinde yaşayan organizmalar kullanıldığından, biyoremediyasyon diğer tip temizleme yaklaşımlarından genelde daha temizdir.

Biyoremediyasyonun diğer bir avantajı, birçok temizleme yaklaşımının kirlilik bölgesinde (in situ) uygulanabilmesidir. Bulaşık materyallerin başka bir bölgeye taşınması zorunluluğu olmadığı için, çevreye zarar vermeksizin daha bütüncül bir temizleme çoğunlukla mümkündür. Bir sonraki kısımda, genel kimyasal kirleticiler ve kirlettikleri çevreler anlamında biyoremediyasyonun temel prensiplerinin bazılarını inceleyeceğiz. Aynı zamanda biyoremediyasyon için önemli olan bazı mikroplar ve reaksiyonları tartışacağız.

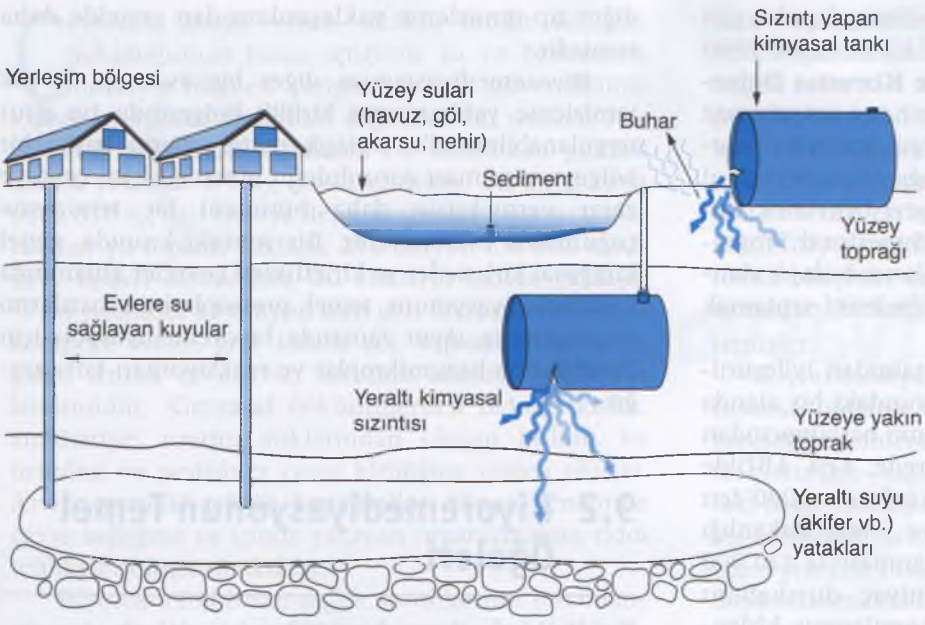
9.2 Biyoremediyasyonun Temel Öğeleri

Doğal olarak oluşan bataklıklar ve sulak alanlar yüzlerce yıldır biyoremediyasyonda ön planda olmuştur. Bu alanlardaki bitki yaşamı ve mikroplar geniş bir yelpazedeki kimyasal çeşidini absorbe edebilir ve kirleticileri zararsız ürünler haline dönüştürebilir. Canlı organizmaların kirleticileri nasıl ayrıştırdıklarını tartışmadan önce, ilk olarak temizlenmeye ihtiyaç duyan çevreleri göz önüne alacağız ve çevreyi kirleten yaygın kimyasalların bazılarını inceleyeceğiz.

Temizlenmesi Gereken Şey Nedir?

Ne yazık ki bu sorunun cevabı hemen her şeyin temizlenmeye ihtiyaç duymasıdır. Toprak, su ve sudaki çöküntüler biyoremediyasyonla temizlenmeye ihtiyaç duyan en yaygın uygulama çevreleridir. Bununla beraber hava kirliliğini belirleyen ve temizleyen yeni biyoremediyasyon yaklaşımları geliştirilmektedir. Kullanılan biyoremediyasyon yaklaşımı bölge şartlarına bağlı olduğu için, her bir bölge temizlenme açısından kendi karmaşıklığını sunar. Örneğin, toprağı temizlemek için kullanılan yaklaşımın suyu temizlemek için kullanılandan çok farklı olması sizi şaşırtmamalıdır. Benzer şekilde, yüzey suyu yeraltı suyundan farklı bir uygulamaya ihtiyaç duyar.

Kirleticiler çevreye farklı yollardan girer ve farklı çevre komponentlerini etkiler. Bazı durumlarda kirleticiler çevreye bir tanker sızıntısı, bir kamyon kazası veya bir endüstri bölgesinde çatlamış bir kimyasal tank yoluyla girerler. Tabii ki kaza alanına salınan kimyasalların miktarına ve serpintinin süresine (saatlere karşın haftalar veya yıllar) bağlı olarak, çevrenin farklı kısım veya bölgeleri etkilenebilir. **Şekil 9.1** bir fabrikada sızıntı yapan bir kimyasal tank örneğini göstermektedir. Bu olay başlangıçta sadece



ŞEKİL 9.1 Arıtma Alanları ve Kirlilik Bölgeleri Kimyasal sızıntılar biyoremediyasyon için hedef olabilecek birçok arıtma gerektiren alan ve kirlilik bölgeleri oluşturabilirler. Yerüstünde bulunan bir kimyasal tankında oluşacak sızıntı yüzeyde ve yüzeyin hemen altında bulunan topraklara, yüzey sularına ve yeraltı sularına madde salınımına sebep olabilir. Bu örnekte akiferin kirlenmesi, akiferi içme suyu kaynağı olarak evlerde kullanan insanlar için sağlık tehdidi oluşturmaktadır.

toprak yüzeyini ve yüzey altındaki toprağı etkileyebilir. Bununla beraber, eğer fazla miktarda kimyasal salınır ve çatlak tank farkına varılmadan uzun süre sızarsa, kimyasallar toprağın daha derinine inebilir. Ağır bir yağmur sonrası bu kimyasallar yüzey akışları oluşturabilir ve su birikintileri, göller, dereler ve nehirler gibi komşu yüzey su kaynaklarını kirletebilirler. Kimyasallar ayrıca yeraltına sızarak **sızıntı suyu** oluşturabilirler. Sızıntı suları akiferler – içme sularının yaygın kaynaklarını oluşturan yeraltı su havzaları – dâhil yeraltı su kaynaklarının kirlenmesine neden olabilirler.

Kimyasallar kirleticilerin havaya salınması yoluyla da çevreye girebilirler. Bunlar bulutlarda tutulabilir ve yağmur yağdığında önce yüzey suyu sonra da yeraltı suyunu kirletebilirler. Bu durum asit yağmurlarının oluşumuna bir örnektir. Endüstriyel üretim, çöp alanları, illegal çöplükler, tarımda kullanılan pestisitler ve maden işlemlerinden kaynaklanan kirleticiler de çevre kirliliğine katkıda bulunurlar. Kirliliği temizlemek için kullanılan biyoremediyasyon yaklaşımı uygulama çevresine bağlı olduğu için, toprağın temizlenmesi suyun temizlenmesinden çok farklıdır. Biyoremediyasyonun nasıl kullanıldığı aynı zamanda temizlenmesi gereken kimyasalların tipine de bağlıdır.

Çevredeki Kimyasallar

Bir kanalizasyon temizleme tesisindeki insan atıklarını temizlemek için kullanılan biyoremediyasyon teknikleri, çevrede bulunan birçok kimyasalları temizlemek için kullanılanlardan oldukça farklıdır. Günlük ev temizleme ajanları, deterjanlar, parfümler, kafein, böcek kovucular, pestisitler, gübreler ve ilaçlar atık sularımızda karşımıza çıkarlar. Araştırıcılar ABD su kanallarının artan oranda ağrı kesiciler, antidepresanlar, antibiyotikler ve kanser ilaçları gibi reçete ile verilen ve serbest satılan ilaçlar içerdiğini gözlemekteler. Çevreye karışan diğer kimyasallar, endüstriyel üretim süreçlerinin veya daha önce tartışıldığı gibi kazaların bir sonucu olarak oluşan ürünlerdir.

Farklı kaynaklardan gelen çok sayıda kimyasal çevredeki yaygın kirleticilerdir. Tablo 9.1 temizlenmeye ihtiyaç duyulan en yaygın kimyasal kategorilerinin bazılarını listelemektedir. Bu kimyasalların birçoğu potansiyel mutajenler ve kansere neden olan bileşikler olan **kanserojenler** olarak bilinirler. Her ne kadar biz kimyasal kirleticilerin sağlık etkilerini detaylı olarak tartışmasak da, bu kimyasalların çoğunun deri tahrişinden doğum kusurlarına ve farklı kanser tiplerine kadar değişen hastalıklara neden oldukları bilinir ve bunlar hayvan ve bitki yaşamını zehirleyebilirler. Oldukça basit bir şekilde, bir çevredeki kirleticilerin varlığı çevrenin genel sağlığı yanında içinde yaşayan organizmaların sağlığını da olumsuz etkilemektedir.

Temizlenen çevre ve bulaşmanın tipine ek olarak, kirletici kimyasalın çeşidi de temizleyici organizmaların çeşidi ve biyoremediyasyon için kullanılan yaklaşımları etkilemektedir. Bu bölüm boyunca Tablo 9.1'de listelenen kirleticilerin çoğunun temizlenme stratejilerini gözden geçireceğiz.

TABLO 9.1 ÇEVREDEKİ EN YAYGIN YİRMİ KİMYASAL KİRLETİCİ

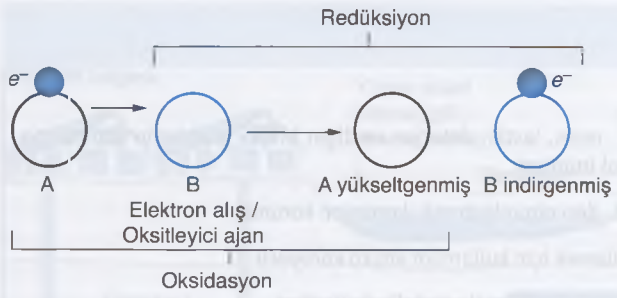
Kimyasal Kirletici	Kaynağı
Benzen	Plastik, naylon, rezin, lastik, deterjan ve diğer birçok maddenin yapımı için kullanılan petrol ürünleri
Krom	Elektrokaplama, deri olgunlaştırma, korozyon koruması
Kreozot	Çürümeyi engellemek için kullanılan ahşap koruyucu
Siyanid	Maden işlemleri ve plastikler ile metallerin üretimi
Dioksin	Kağıt beyazlatma, atık yakımı ve kimyasal üretim işlemleri
Metil t-bütil eter (MBE)	Yakıt katkısı, otomobil eksozu, tekne motorları, sızan yakıt tankları
Naftalin	Ham petrol ve petrol ürünleri
Nitriller	Kauçuk malzemeler, plastikler ve yağlar
Perkloretilen / tetrakloretilen (PCE), trikloretilen (TCE) ve trikloretan (TCA)	Kuru temizleme kimyasalları ve yağ çözücü ajanlar (TCE) ABD su kaynaklarının % 34'ü ve Superfund bölgelerinin % 60'ında bulunmaktadır.
Pestisitler (atrazin, karbamatlar, klordan, DDT) ve herbisitler	Böcek ve yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasallar
Fenol ve ilişkili bileşikler (kolorofenoller)	Ahşap koruyucular, boyalar, tutkallar, kumaşlar
Poliklorlanmış bifeniller (PCBs)	Elektrik transistörleri, soğutma ve yalıtım sistemleri
Polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve poliklorlanmış hidrokarbonlar	Atıkların yakılması, otomobil eksozu, petrol rafinerileri ve araçlardan sızan yağlar
Polivinilklor	Plastik üretimi
Radyoaktif bileşikler	Araştırma ve tıbbi enstitülerle, nükleer enerji santralleri
Yüzey temizleyiciler (deterjanlar)	Boya, tekstil, çimento ve kağıt üretimi
Sentetik östrojenler (etinil estradiol)	Çeşitli endüstriyel üretim işlemleri yoluyla elde edilen dişilik hormonu (östrojen)-ilişkili bileşikler
Toluen	Yapıştırıcılar, mürekkepler, boyalar, temizleyiciler ve tutkallarda bulunan petrol türevleri
İz metaller (arsenik, kadmiyum, krom, bakır, kurşun, cıva, gümüş)	Araç aküleri ve metal üretim işlemleri
Trinitrotoluen	İnşaat ve yapı endüstrisinde kullanılan patlayıcılar

Temizleme Reaksiyonlarının Temel Prensipleri

Mikroplar birçok kimyasalı ya **aerobik metabolizma** (oksijen [O_2] gerektiren reaksiyonlar) veya **anaerobik metabolizma** (oksijen [O_2] gerektirmeyen reaksiyonlar) yoluyla zararsız bileşiklere dönüştürebilirler. Her iki reaksiyon tipi oksidasyon (yükseltgenme) ve redüksiyon (indirgenme) reaksiyonlarını içermektedir. Biyoremediyasyonu anlamak istiyorsanız oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarına aşina olmak zorundasınız.

Oksidasyon ve Redüksiyon Reaksiyonları

Oksidasyon bir molekülden molekülün kimyasal yapı ve özelliklerini değiştirecek şekilde bir veya daha fazla elektronun uzaklaştırılmasını içermektedir. Bir kimyasal kirletici söz konusu olduğunda, oksidasyon kimyasalın özelliklerini değiştirmek suretiyle onu zararsız bir madde haline getirebilir. Oksidasyon reaksiyonları genellikle **redüksiyon reaksiyonları** ile birlikte oluşur. Redüksiyon süresince, bir atom veya molekül bir veya daha fazla elektron kazanır. Oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonları sıklıkla birlikte oluştuğu



ŞEKİL 9.2 Oksidasyon ve Redüksiyon (Redoks) Reaksiyonları Redoks reaksiyonları birçok kimyasalın biyoremediyasyonu için önemlidir. Bu yükseltgenme (oksidasyon) reaksiyonunda elektron A molekülünden B molekülüne taşınmaktadır. B elektron alıcı veya yükseltgeyici ajan olarak görev yapmaktadır. Bu redoks reaksiyonunda, A molekülü yükseltgenmiş ve elektron alan B molekülü indirgenmiştir.

için, bu elektron transfer reaksiyonlarına çoğunlukla **redoks reaksiyonları** adı verilir (bakınız **Şekil 9.2**).

Redoks reaksiyonları süresince, **oksitleyici ajanlar** – kuvvetli elektron çekim güçleri nedeniyle elektron alıcılar olarak da bilinirler – olarak isimlendirilen moleküller transfer işlemiyle elektronları uzaklaştırırlar. Oksitleyici ajanlar elektronları yakaladıkları zaman indirgenmiş hale gelirler. Oksijen (O_2), demir (Fe^{+3}), sülfat (SO_4^{2-}) ve nitrat (NO_3^-) çoğunlukla biyoremediyasyonun redoks reaksiyonlarına dâhil olurlar. Redoks reaksiyonları birçok hücresel fonksiyon için önemlidir. Örneğin, insan hücreleri ve birçok diğer hücre tipleri şekerleri indirgemek ve enerji üretmek için oksidasyon ve redüksiyon reaksiyonlarını kullanırlar.

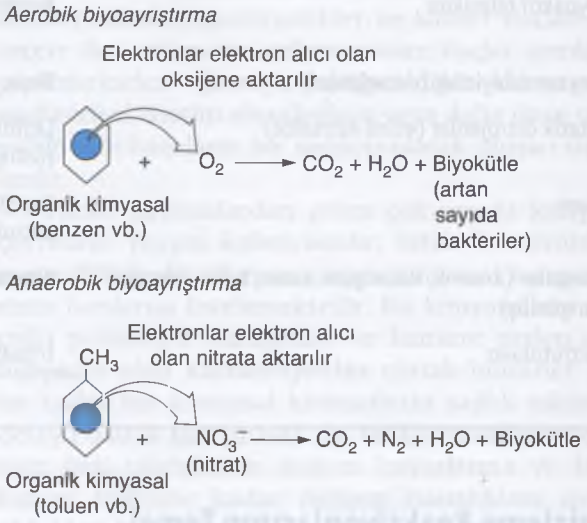
Aerobik ve anaerobik biyoayrıştırma

Oksijenin kolaylıkla bulunduğu yüzey suyu ve toprak gibi ortamlarda aerobik bakteriler kimyasal bileşikleri oksidize ederek kirleticileri ayrıştırırlar. Aerobik biyoayrıştırma reaksiyonlarında, O_2 petrol ürünleri gibi **organik molekülleri** (karbon atomu içeren moleküller) içeren çeşitli kimyasalları oksidize edebilir (**Şekil 9.3**). Süreçte, O_2 su üretmek için indirgenir. Mikroplar oksidize olan organik bileşikleri karbondioksit (CO_2) ve metan gazı gibi nispeten daha basit ve zararsız moleküller haline dönüştürmek için daha ileri derecede ayrıştırırlar. Bakteriler daha fazla hücre yapmak için kullanılan bu işlemden enerji elde ederler. Bilim insanları hücre sayısındaki bu artışı **biyokütle** artışı olarak belirtirler. Bazı aeroblar metaller ve amonyum gibi **inorganik bileşikleri** (karbon içermeyen moleküller) de oksidize ederler.

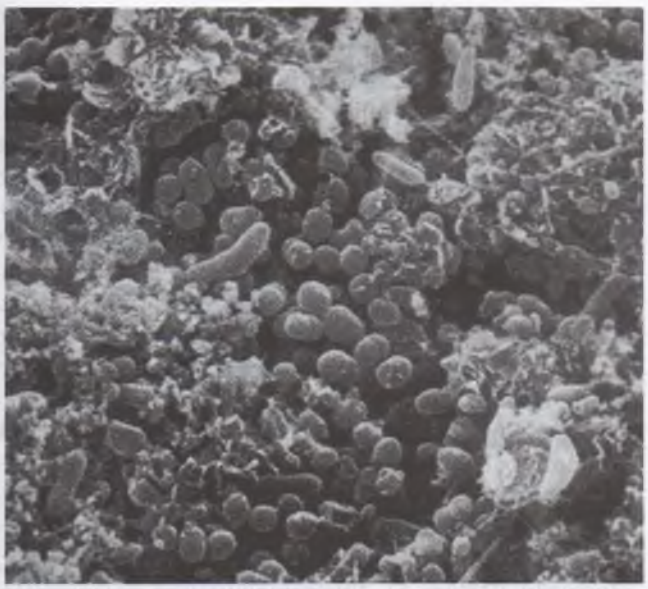
Ağır şekilde kirletilmiş alanlar ve akifer gibi derin çevrelerde oksijen konsantrasyonu oldukça düşük olabilir. Yüzey altındaki topraklarda, oksijen yerin içine zayıf şekilde difüze olur ve bu bölgedeki oksijen aeroblar tarafından hızla tüketilir. Her ne kadar düşük oksijenli çevrelerde aerobik biyoayrıştırmayı teşvik etmek için uygulama alanlarına oksijen enjekte etmek mümkün olsa da, biyoayrıştırma anaerobik metabolizma yoluyla da doğal olarak gerçekleşebilir. Anaerobik metabolizma aynı zamanda oksidasyon ve redüksiyonu gerektirir; ancak anaerobik bakteriler (anaeroblar) elektron alıcı olarak oksijenden başka moleküllere ihtiyaç duyarlar (**Şekil 9.4**). Demir (Fe^{+3}), sülfat (SO_4^{-2}) ve nitrat (NO_3^-) anaeroblarda redoks reaksiyonları için yaygın elektron alıcılardır (Şekil 9.3 ve 9.4). Ayrıca, bazı mikroplar hem aerobik hem de anaerobik metabolizmayı gerçekleştirirler. Çevredeki oksijen azaldığı zaman, bunlar biyoayrıştırmaya devam etmek için anaerobik metabolizmaya yönelirler. Bir sonraki kısımda öğreneceğiniz gibi, aeroblar ve anaerobların her ikisi de biyoremediyasyon için önemlidir.

Aktörler: Metabolize Edici Mikroplar

Bilim insanları çevreyi temizlemek için araç olarak mikropları – özellikle bakterileri – kullanırlar. Bakterilerin farklı kimyasalları etkin bir şekilde ayrıştırmaları birçok koşula bağlıdır. Kimyasalın çeşidi, sıcaklık, bu-



ŞEKİL 9.3 Aerobik ve Anaerobik Biyoayrıştırma Aerobik bakteriler (aeroblar) oksijeni (O_2) elektron alıcı molekül olarak kullanarak benzen gibi kimyasal kirleticileri oksidasyon yolu ile yükseltgerler. Bu işlem boyunca oksijen indirgenerek suyu (H_2O) oluşturur ve benzenin yükseltgenmesinden karbondioksit (CO_2) ortaya çıkarılır. Kirleticinin ayrıştırılmasından elde edilen enerji bakteriyel gelişimde (biyokütle) kullanılır. Benzer reaksiyonlar anaerobik ayrıştırmada da görülür, yalnız bu sefer anaerobik bakteriler (anaeroblar) demir (Fe^{3+}), sülfat (SO_4^{2-}) nitrat (NO_3^-) ve diğer molekülleri elektron alıcı olarak kullanır ve kirleticiyi yükseltgerler.



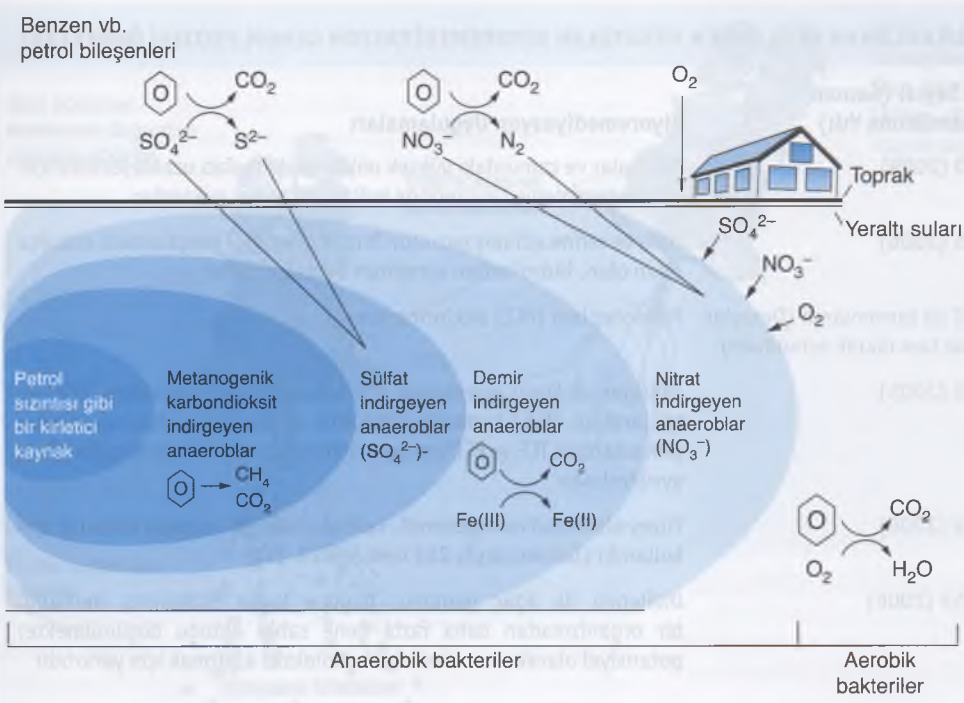
ŞEKİL 9.4 Anaerobik Bakteriler Birçok Kirleticiyi Etkili Bir Şekilde Parçalarlar Bir kuru temizleme kimyasalı olan perkloretilen (PCE) yeraltı suları için yaygın kirleticilerden biridir. Buna rağmen, anaerobik bakteriler PCE'yi besin olarak kullanabilir. Anaerobik bakterileri elektron alıcı olarak görev yapan küçük demir sülfit parçacıkları üstünde büyütmek, uygun yaşam ortamı ve hızlı bir şekilde büyüyerek PCE'yi tüketmelerini sağlar.

laşık alan (suya karşılık toprak, yüzeye karşılık yeraltı suyu kirliliği vb.), besin elementleri ve diğer birçok faktör biyoayrıştırmanın etkinliği ve oranını etkiler.

Birçok alanda, biyoremediyasyon bulaşık alanı tamamen temizlemek için hem aerobik hem de anaerobik bakterilerin ortak çalışmalarını içerir. Anaerobler genellikle kirlilik kaynağına en yakın ve oksijenin çok az bulunduğu, ancak anaerobların elektron yakalama amacıyla kullandıkları sülfatlar, nitratlar, demir ve metanın var olduğu bölgelerde biyoremediyasyon reaksiyonlarını domine ederler. Kirlilik kaynağından uzaklaştıkça oksijen daha bol olma eğiliminde olduğundan, tipik olarak aerobik bakteriler biyoayrıştırmaya katılırlar (**Şekil 9.5**).

Biyoremediyasyon için kullanışlı mikropların araştırılması çoğunlukla en iyi kirli alanların kendisinde gerçekleştirilir. Kirli alanlarda yaşayan organizmalar kirletici kimyasallara karşı bir şekilde dayanıklılık kazanmışlardır ve biyoremediyasyon için kullanışlı olabilirler. Kirli bir alanda bulunan **özgün mikroplar** – o alanda doğal olarak bulunan – genellikle bir laboratuvarda izole edilir, çoğaltılır ve yeniden o çevreye çok fazla miktarlarda bırakılır. Bu tip mikroplar biyoremediyasyon için tipik olarak en yaygın ve etkin "metabolize edici" mikroplardır. Örneğin, çoğu toprakta bulunan *Pseudomonas* adlı bakteri cinsinin yüzlerce farklı kimyasalı temizlediği bilinmektedir. *Escherichia coli*'nin bazı suşları da birçok kirleticiyi temizlemekte oldukça etkindir.

Çok sayıdaki daha az tanınan bakteri biyoremediyasyondaki potansiyel rolleri açısından incelenmekte ve kullanılmaktadır. Örneğin, Kısım 9.6'da radyasyonun zararlı etkilerini tolere etmede harikulade bir yetenek gösteren bir mikrop olan *Deinococcus radiodurans*'ın muhtemel uygulamalarını tartışacağız. Benzer şekilde, Dublin Üniversitesi'ndeki araştırıcılar birçok plastiğin zehirli bir bileşeni olan stireni biyoçö-



ŞEKİL 9.5 Anaerobik ve Aerobik Bakteriler Kirlenmiş Yeraltı Sularının Biyoayrıştırmasına Katkıda Bulunurlar

zünür plastik haline çevirebilen bir bakteri türü olan *Pseudomonas putida*'yı keşfettiler.

Bilim insanları biyoremediyasyonda en etkili olacak birçok mikrobun henüz tanımlanmadığına inanıyorlar. Metabolize edici yeni mikropların aranması biyoremediyasyon araştırmalarının aktif bir alanıdır. 2010 yılında, ABD Jeolojik Taramalarında görev alan bilim insanları, Kaliforniya'da yüksek arsenik konsantrasyonuna sahip Mono Gölü'nde arseniği metabolize eden ve hatta onu DNA gibi biyomoleküllere dâhil eden bir bakteri tanımladıklarını rapor ettiler. Ancak bu keşfin doğruluğu bilim dünyasında önemli bir tartışma konusudur.

Bilim insanları aynı zamanda biyoayrıştırma yapabilen algler ve mantar ırklarını da araştırıyorlar. *Phanerochaete chrysosporium* ve *P. sordida* gibi atık ayrıştıran mantarlar, kreozot pentaklorofenol ve bakterilerin güçlükle ayrıştırabildiği veya hiç ayrıştıramadığı diğer kirletici zehirli kimyasalları ayrıştırabilirler. Asbest ve ağır metal ayrıştıran mantarlar arasında *Fusarium oxysporum* ve *Mortierella hyaline* sayılabilir. Mantarlar aynı zamanda poliklorlanmış bifeniller (PCBs), atık su arıtma tesisleri, katı-atık çamurları, kanalizasyon ve önceleri ayrıştırmaya oldukça dayanıklı olduğu düşünülen diğer bileşikleri kompostlama ve temizlemede de oldukça değerlidir.

Biyoremediyasyon Genomik Programları

Birçok bilim insanının biyoremediyasyon için gelecekte kullanılabilecek veya şu anda kullanılan organizmaların genomlarını çalışılıyor olması sizi şaşırtmamalıdır. Genomik yoluyla yeni genlerin ve biyoremediyasyon organizmalarının kimyasalları zararsız kılmakta kullandıkları metabolik süreçlerin tanımlanması mümkün olacaktır. Bu durum bilim insanlarının genetik mühendisliği yoluyla biyoremediyasyon organizmalarının elde edilmesini de içeren, daha etkin temizleme stratejileri geliştirmelerine yardım edecektir (bakınız Kısım 9.4). Aynı zamanda, farklı mikropların detoksifikasyon genlerini değişik rekombinant bakterilerde bir araya getirerek – PCBs ve cıva örneklerinde olduğu gibi – birden fazla kirleticiyi aynı zamanda ayrıştırmak mümkün olabilir.

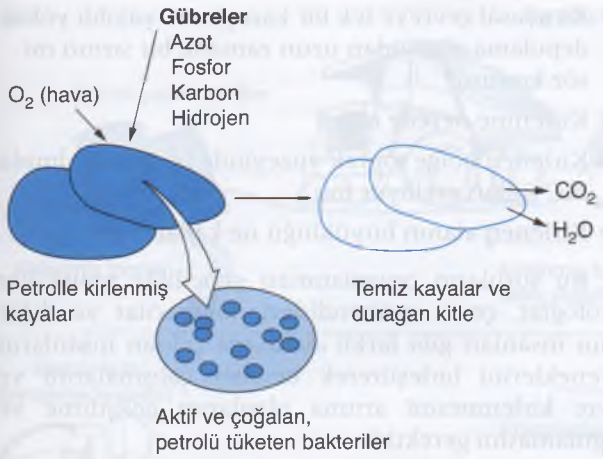
Biyoremediyasyonla ilgili genler ve proteinleri belirlemek için, bulaşık alanlardaki mikropların genomlarını analiz etmede kullanılabilecek çeşitli genomik yöntemler ve moleküler teknikler vardır. Enerji Bakanlığı, biyoremediyasyonda kullanılabilecek birçok mikrobu da içeren, 200'den fazla mikrobiyal genomun dizilendiği bir Mikrobiyal Genom Programı (MGP) oluşturdu (Bölüm 5). Biyoremediyasyon organizmalarını da içeren ve son zamanlarda tamamlanan genomik projelerinin birkaç örneği için Tablo 9.2'ye bakınız.

Biyoremediyasyonun teşviki

Daha önce tartışıldığı gibi, biyoremediyasyonda bilim insanları tipik olarak kirleticileri ayrıştırmak için alana özgün mikropların avantajını kullanırlar. Kirleticiye bağlı olarak, birçok özgün bakteri biyoayrıştırmada oldukça etkindir. Bilim insanları aynı zamanda kullanılan mikroorganizmalara, temizlenen çevre alanına ve temizlenmesi gereken kimyasal kirleticilerin çeşidi ve miktarına bağlı olarak mikroorganizmaları daha etkin hale getirmek için çok sayıda stratejiden yararlanırlar.

TABLO 9.2 SON ZAMANLARDA TAMAMLANAN VEYA HALEN YÜRÜTÜLEN BİYOREMEDİYASYON GENOM PROJESİ ÖRNEKLERİ

Mikroorganizma	Gen Sayısı (Genom Tamamlanma Yılı)	Biyoremediyasyon Uygulamaları
Accumulibacter phosphatis	4790 (2009)	Atık sular ve çamurdaki yüksek miktarlarda fosfatı uzaklaştırmak için atık su temizleme tesislerinde kullanılan temel mikroplar
Alcanivorax borkumensis	2755 (2006)	Ham ve rafine edilmiş petrolün birçok bileşiğini parçalamada oldukça etkin olan, hidrokarbon ayrıştıran deniz bakterisi
Dehalobacter restrictus	2010'da tamamlandı (Detaylar henüz tam olarak sunulmadı)	Perkloretileni (PCE) deklorine eder
Dehalococcoides ethenogenes	1591 (2005)	Hidrojen ve klorü ayrıştırmak için kullanılır – perkloretilen (PCE) ve trikloreteni (TCE) tamamen deklorine ettiği bilinen tek organizma; atık sulardaki TCE ve PCE'nin temizlenmesi; poliklorinlenmiş dioksinin ayrıştırılması
Geobacter metallireducens	3676 (2006)	Yüzey altı metal indirgenmesi, karbon döngüsü ve enerji üretmek için kullanılır (bakınız sayfa 222'deki Şekil 9.13)
Populus trichocarpa (kavak ağacı)	45555 (2006)	Dizilenen ilk ağaç genomu; bugüne kadar dizilenmiş herhangi bir organizmadan daha fazla gene sahip olduğu düşünülmekte; potansiyel olarak atmosferik karbondioksiti azaltmak için yararlıdır



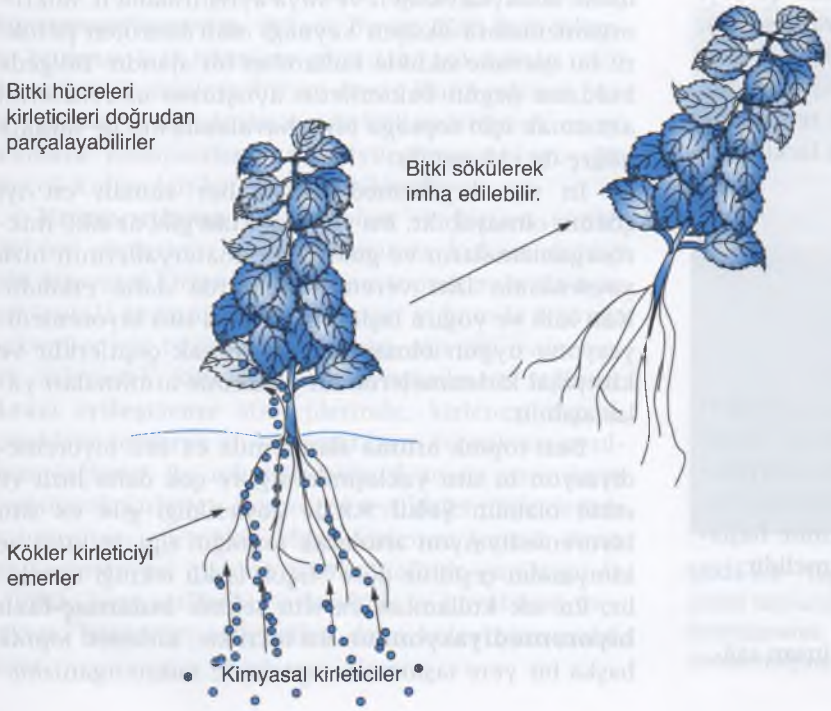
ŞEKİL 9.6 Gübreler Bölgeye Özgün Bakterilerin Biyoayrıştırmasını Hızlandırabilir Petrolde bulunan maddeler gibi kimyasalların biyoremediyasyonu gübreleme ile hızlandırılabilir. Gübreleme alana özgün bakterilerin büyüme ve bölünme hızını arttırarak, petrolü karbondioksit (CO_2) ve su (H_2O) gibi zararsız maddelere parçalamalarını sağlar.

Gübreleme olarak da adlandırılan **besin zenginleştirme**, kirleticileri ayrıştırabilen özgün mikroorganizmaların büyümesini teşvik etmek için gübrelerin uygulandığı bir biyoremediyasyon yaklaşımıdır (**Şekil 9.6**). Canlı organizmaların makromoleküller oluşturmak için karbon, hidrojen, azot, oksijen ve fosfor gibi temel elementlere bolca ihtiyaç duymaları nedeniyle, gübre uygulaması biyoremediyasyon mikroplarına üreme ve büyümeleri için bu elementleri sağlar. Bazı durumlarda mikroplara karbon kaynağı temin etmek için çiftlik gübresi, ağaç yongaları ve saman da gübrelere eklenebilir. Gübreler kirlenmiş alanlara genellikle ya yeraltı suyuna pompalanarak veya toprağa karıştırılarak uygulanır. Gübrelemenin arkasındaki yaklaşım basittir. Daha fazla besin maddesi eklendiğinde mikroorganizmalar çoğalır, sayıca artar ve hızla büyürler, böylece biyoayrıştırma oranı yükselir.

Biyoçoğaltım veya **tohumlama**, biyoayrıştırma süreci ile ilgili özgün mikroplara yardımcı olmak için bulaşık alanlara bakterilerin eklenmesini içeren diğer bir yaklaşımdır. Bazı durumlarda, tohumlama eşsiz biyoayrıştırma özelliklerine sahip genetik mühendisliğiyle oluşturulan mikroorganizmaların uygulanmasını içerir. Biyoçoğaltım her zaman etkili bir çözüm değildir. Bunun bir nedeni, mikropların laboratuvar suşlarının nadiren özgün bakteriler kadar iyi büyümeleri ve biyoayrıştırma yapmalarıdır. Ayrıca, bilim insanları ekilen bakterilerin kirlilik temizlendikten sonra yaşamaya devam etmeleri durumunda çevrenin ekolojisini değiştirmeyeceğinden emin olmak zorundadırlar.

Fitoremediyasyon

Toprak, su ve havadaki kimyasalları temizlemek için bitkilerin kullanıldığı, **fitoremediyasyon** adı verilen yaklaşımın uygulamaları gittikçe artmaktadır. Yaklaşık 350 bitki türü doğal olarak toksik materyalleri almaktadırlar. Kavak ve ardıç ağaçları da, bazı otlar ve yoncada olduğu gibi, fitoremediyasyonda başarılı bir şekilde kullanılmaktadırlar. Fitoremediyasyonda, kimyasal kirleticiler bitkilerin kökleri yoluyla topraktan kirlenmiş suyun absorbe edilmesi sırasında alınırlar (**Şekil 9.7**). Örneğin; ayçiçeği bitkileri Ukrayna'daki Çernobil nükleer enerji



ŞEKİL 9.7 Fitoremediyasyon Biyoremediyasyon stratejilerine bitkilerin eklenmesi çok etkilidir. Bazı bitkiler kirletici kimyasalları doğrudan parçalarken, diğerleri ortamdan toplayarak uzaklaştırılmasını sağlayabilir.

tesisi havuzlarındaki radyoaktif sezyum ve stronyumu etkin bir şekilde uzaklaştırdılar. Su sümbülleri Hindistan ve Bangladeş'te su kaynaklarından arseniği uzaklaştırmak için kullanılmaktadır. Arsenik konsantrasyonlarının Bangladeş'te yeraltı sularının % 60'ında sağlık standartlarını aştığı düşünüldüğünde, bu önemli bir teknolojidir.

Toksik kimyasallar bitkiye girdikten sonra, bitki hücreleri kimyasalları ayrıştırmak için enzimleri kullanabilirler. Diğer durumlarda, kimyasallar bitki hücrelerinde yoğunlaşır ve dolayısıyla tüm bitki kirletici maddeyi silip süpürmek için bir çeşit "bitki süngeri" görevi görür. Bulaşık bitkiler atık olarak düşünülürler ve yakılabilir veya diğer yollarla bertaraf edilirler. Kirleticilerin yoğun konsantrasyonları çoğu bitkiyi öldürdüğü için, fitoremediyasyon konsantrasyon düşük olduğunda – yüzey toprağı veya yeraltı sularında – en iyi çalışır.

Bilim insanları aynı zamanda bitkilerin havadaki kirleticileri temizlemek için de kullanılabileceği durumları araştırıyorlar. Birçok bitki bunu doğal olarak yapmaktadır. Fosil yakıtların yakılmasından salınan ve küresel ısınmaya katkıda bulunan temel sera gazı olan aşırı karbondioksidin (CO_2) uzaklaştırılması bir örnektir. Son zamanlarda ilk ağaç genomu olarak siyah pamuk ağacının (bir çeşit kavak) genomu dizilendi. Kavaklar fitoremediyasyon için yaygın olarak kullanılırlar ve genetik mühendisliği ile elde edilmiş kavak yüksek düzeydeki CO_2'i tutmak için umut vermektedir.

Fitoremediyasyon etkin, düşük maliyetli ve masrafsız bir biyoremediyasyon yaklaşımı olabilir. Belirtilen faydaları yanında, fitoremediyasyon aynı zamanda daha az belirgin ancak daha göz alıcı olabilir. Örneğin, ağaçlar ve çalıların dikilmesi kirlenmiş bir arazinin görünümünü güzelleştirir ve aynı zamanda çevreyi temizler. Fitoremediyasyonun iki temel kısıtı; sadece yüzey toprağında (yaklaşık 50 cm derinliğe kadar) uygulama yapılabilmesi ve temizlemenin tipik olarak yıllar almasıdır. Bir sonraki kısımda belirli temizleme alanları ve biyoremediyasyon için kullanılan farklı stratejileri inceleyeceğiz.

9.3 Temizleme Alanları ve Stratejileri

Çok çeşitli biyoremediyasyon uygulama stratejileri bulunmaktadır. Hangi stratejinin uygulanacağı birçok faktöre bağlıdır. Öncelikli faktörler arasında kimyasalın tipi, iyileştirilecek çevre ve arıtılacak alanın büyüklüğü sayılabilir. Aynı zamanda, arıtma işlemine başlamadan önce aşağıdaki sorular değerlendirilmelidir:

- Kimyasallar yanıcı veya patlayıcı mı?
- Kimyasallar arıtma çalışanları da dâhil insan sağlığını tehdit ediyor mu?
- Kimyasal çevreye tek bir kazayla mı yayıldı yoksa depolama alanından uzun zamanlı bir sızıntı mı söz konusu?
- Kirlenme nerede oldu?
- Kirlenen bölge toprak yüzeyinde mi yoksa altında mı? Suları etkiliyor mu?
- Kirlenen alanın büyüklüğü ne kadar?

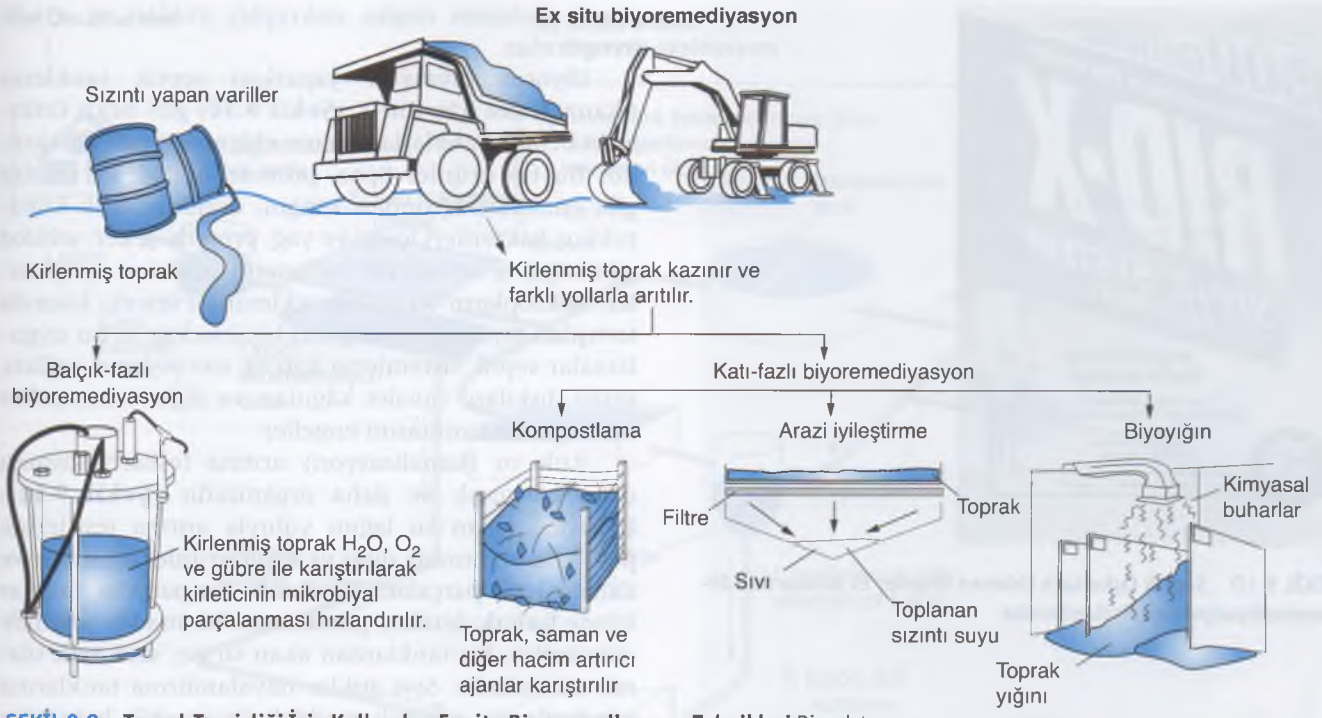
Bu soruların cevaplanması genellikle moleküler biyologlar, çevre mühendisleri, kimyacılar ve diğer bilim insanları gibi farklı alanlarda çalışan insanların yeteneklerini birleştirerek beraber çalışmalarını ve çevre kirlenmesini arıtma planlarını geliştirme ve uygulamasını gerektirir.

Toprağın Temizlenmesi

Toprak ve su için arıtma genellikle, **ex situ biyoremediyasyon** adı verilen; kimyasalın arıtma için kirlenmiş bölgeden başka bir bölgeye taşınması yoluyla veya **in situ** (Latince "yerinde") **biyoremediyasyon** olarak adlandırılan; hafriyat ve taşıma yapmadan gerçekleştirilen yöntemlerle yapılır. In situ biyoremediyasyon ex situ yaklaşımlara göre daha ucuz olduğu için genellikle daha çok tercih edilen bir yöntemdir. Ayrıca su veya toprağın taşınması veya pompalanması gerekmediği için kirlenmiş büyük alanlar bu yöntemle tek seferde arıtılabilir. In situ yaklaşımlar suda veya toprakta bulunan mikroorganizmaların uyarılarak aktive edilmesi prensibine dayanır. Aerobik ayrıştırmaya ihtiyaç duyan in situ yaklaşımlar genellikle **biyo-havalandırma** veya kirlenmiş toprağa hava veya hidrojen peroksit (H_2O_2) pompalanmasını içerir. Kolayca oksijen ve suya ayrıştırılabilen, mikroorganizmalara oksijen kaynağı olan hidrojen peroksit bu işlemde sıklıkla kullanılan bir ajandır. Bölgede bulunan özgün bakterilerin ayrıştırma aktivitelerini arttırmak için toprağa biyo-havalandırma ile birlikte gübre de eklenebilir.

In situ biyoremediyasyon her zaman en iyi çözüm olmayabilir. Bu yöntem kum gibi az sıkı, mikroorganizmaların ve gübreleme materyallerinin hızlı yayılmasına izin veren topraklarda daha etkilidir. Katı killi ve yoğun taşlı topraklar in situ biyoremediyasyona uygun olmayan tipik toprak çeşitleridir ve kimyasal kirlenmelerde bu yöntemle arıtılmaları yıllar alabilir.

Bazı toprak arıtma alanlarında ex situ biyoremediyasyon in situ yaklaşımlara göre çok daha hızlı ve etkili olabilir. **Şekil 9.8**'de gösterildiği gibi ex situ biyoremediyasyon arıtılacak toprağın tipi, miktarı ve kimyasalın çeşidine göre birçok farklı tekniği içerebilir. En sık kullanılan ex situ teknik **bulamaç-fazlı biyoremediyasyon**dur. Bu teknikte, kirlenen toprak başka bir yere taşınarak, topraktaki mikroorganizma-



ŞEKİL 9.8 Toprak Temizliği İçin Kullanılan Ex situ Biyoremediyasyon Teknikleri Birçok toprak temizleme sistemi kirlenen toprağın taşınarak farklı temizleme işlemlerine tabi tutulduğu ex situ biyoremediyasyona dayanır.

lar tarafından yapılan biyoayrıştırmanın dikkatlice izlenip kontrol edilebileceği büyük biyoreaktörlerde su ve gübre ile karıştırılır (genellikle oksijen de eklenir). Bulamaç-fazlı biyoremediyasyon az miktarda toprak olduğunda ve arıtılacak kimyasal kirlilik detaylarıyla bilindiğinde hızlı çalışan iyi bir yöntemdir (Şekil 9.8).

Diğer birçok toprak arıtma stratejisi **katı-fazlı biyoremediyasyon**a ihtiyaç duyar. Katı-fazlı işlemler bulamaç fazlı işlemlere göre daha çok zaman alıcıdır ve büyük alanlara ihtiyaç duyar. Buna rağmen bazı kimyasalların ayrıştırılmasında kullanılabilecek en iyi tekniktir. Kompostlama, arazi iyileştirme ve biyoyığın en çok kullanılan katı fazlı tekniklerdir.

Kompostlama gıda atıkları ve biçilen çimler gibi ev çöplerinin ayrıştırılmasında kullanılabildiği gibi kimyasal kirlenme bulunan topraklarda da aynı yaklaşımla kullanılabilir. Kompost yığınında toprağa bakteriler için besin olarak saman, sap gibi malzemeler eklenerek kimyasalların ayrıştırılması sağlanır. **Arazi iyileştirme** stratejilerinde, kirlenen toprak yataklara serilerek su ve sızıntıların topraktan ayrılması sağlanır. Bu tekniğin birincil amacı sızıntıların toplanarak kirlenen suyun çevreyi kirletmeye devam etmesini engellemektir. Eğer kirlenen toprak derin bir kesimdeyse, ince bir tabaka halinde yayıldığında içindeki kimyasallar buharlaşabilir ve havalanan topraktaki bakteriler kirleticileri daha kolay ayrıştırabilirler.

Toprak **biyoyığınları** genellikle kimyasallar kolay buharlaşabildiğinde ve bakterilerin kirleticiyi hızlıca ayrıştırdığı durumlarda kullanılır (**Şekil 9.9**). Bu stratejide kirlenen toprak birkaç metre yükseklik halinde yığılır. Biyoyığınların kompostlardan farkı, daha az



ŞEKİL 9.9 Toprak Biyoyığınları Kirlenen toprak temizlenecek bölgeden taşınarak yığınlarda depolanır. Burada biyoremediyasyon işlemi izlenerek, toprağın alındığı alana geri götürülebilecek düzeyde temizlendiğinden emin olunur.



ŞEKİL 9.10 Septik Çukurlara Eklenen Ürünler Ev Atıklarının Biyoremediyasyonunu Hızlandırırlar

kabartma elemanı eklenmesi ve toprağın içine ve üstüne fan ve boru sistemleriyle hava pompalanmasıdır. Yığındaki kimyasallar buharlaştıkça, vakumlu hava akımı kimyasalı yığından uzağa çekerek kimyasalın türüne göre atmosfere salar ya da atılmak üzere filtrelerle yakalar. Neredeyse bütün ex situ stratejilerinde havalandırma, besinleri yaymak için toprağı karıştırma, kirleticiyi oksijenleme ve daha kolay ayrıştırılması için mikroplarla kirlenen materyalin temasını arttırma uygulanır.

Suyun Biyoremediyasyonu

Kirlenmiş sular birçok sorun ortaya çıkarır. Kısım 9.5'de petrol sızıntısı gibi büyük sızıntıların yüzey sularından nasıl temizleneceğini inceleyeceğiz. Atık sular ve yeraltı suları da uzaklaştırılması gereken kirleticinin çeşidine bağlı olarak çok farklı yollarla arıtılabilir.

Atık suların temizlenmesi

Belki de en çok bilinen biyoremediyasyon türü atık sulardan kanalizasyon (dışkı materyali ve kâğıt atıklar), sabun, deterjan ve diğer ev kimyasallarının arıtılmasıdır. Hem septik sistemler hem de kentsel atık su sistemleri biyoremediyasyona dayanır. Tipik bir septik sistem, kanalizasyon ve atık suyu evden alarak boru sistemleri ile ev yakınlarında bulunan yeraltına gömülü bulunan bir tanka taşır. Tanktaki dışkı ve tuvalet kâğıdı gibi katı parçalar mikroplar tarafından ayrıştırılmak üzere dibe çökelir, sıvı kısım ise tankın üstünden akarak septik yatak olarak adlandırılan çakıllı ve kumlu alanlardan yeraltına yayılır. Yatak içinde bulunan özgün mikroplar atıkları su içinde ayrıştırırlar.

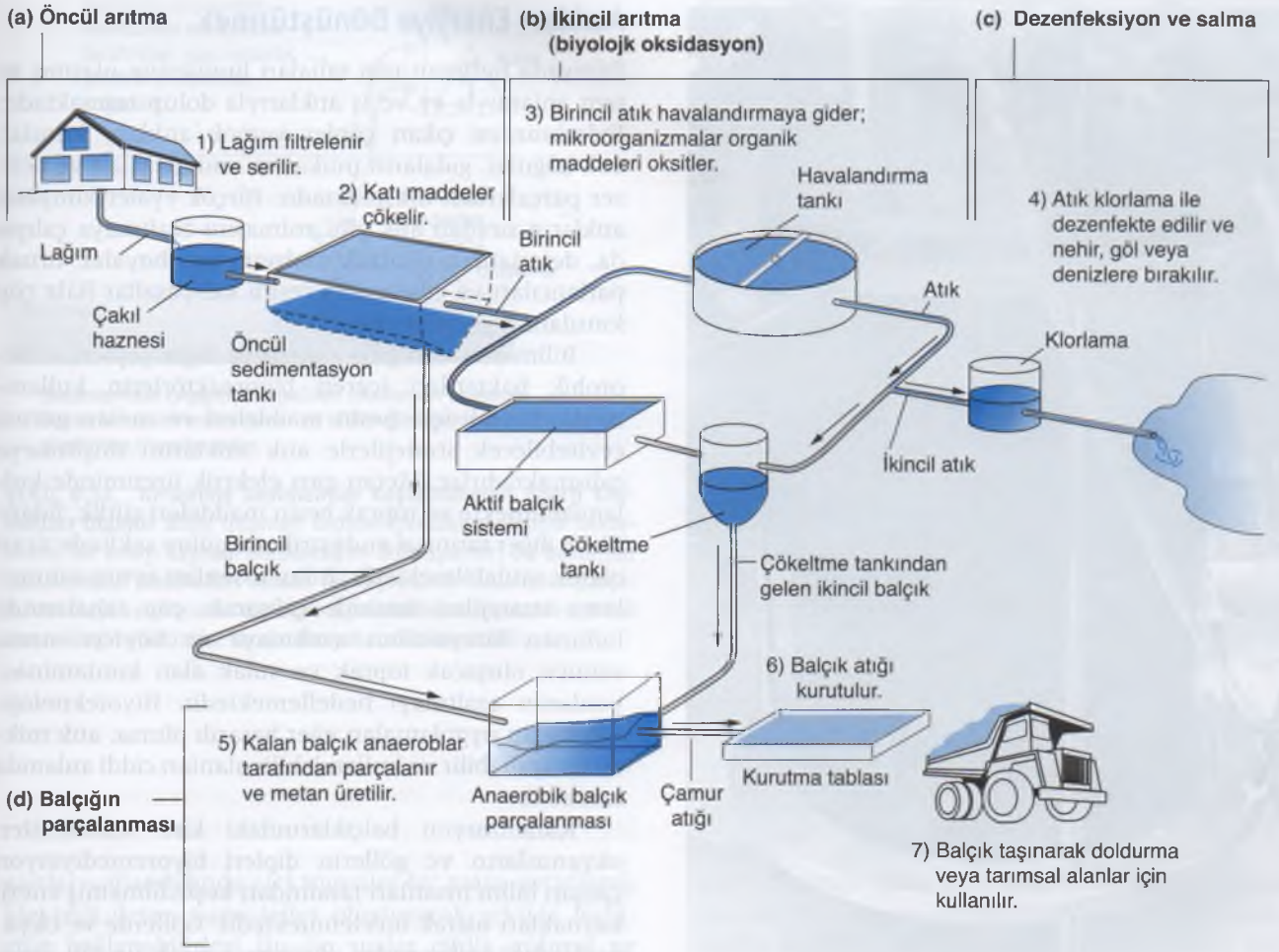
Biyoremediyasyon yaparken septik tankların tıkanmaması için Rid-X (**Şekil 9.10**) gibi ticari ürünlerin belirli aralıklarla sisteme eklenmesi gerekmektedir. Bu tip ürünler lipaz, proteaz, amilaz ve selülaz gibi enzimler açısından zengin, dondurularak kurutulmuş bakterileri içerir ve yağ, protein, şeker, selüloz gibi kâğıt ve sebzelerde bulunan maddeleri ayrıştırırlar. Mikropların bu şekilde eklenmesi önceki kısımda tartışılan biyoçoğaltıma güzel bir örnektir ve bu uygulamalar septik sistemlerin katı ve sıvı pişirme yağları, insan dışkıları, tuvalet kâğıtları ve diğer materyaller tarafından tıkanmasını engeller.

Atık su (kanalizasyon) arıtma tesisleri kısmen daha karmaşık ve daha organizedir (**Şekil 9.11**). Evlerden çıkan su lağım yoluyla arıtma tesislerine pompalanır, burada dışkı ve kâğıt ürünler öğütülür ve daha küçük parçalara filtrelenir. Bu parçalar tanklar içinde **balçık** denilen çamurumsu bir madde şeklinde çöktürülür. Bu tanklardan akan su ise, **sıvı atık** olarak adlandırılır. Sıvı atıklar havalandırma tanklarına gönderilerek, organik maddelerin aerobik bakteriler tarafından oksitlenmesi sağlanır. Bu tanklardaki sıvı atık sudaki organik materyali ayrıştıracak aktif mikroplarla biyofilmlenmiş kayaların veya plastiklerin üstüne püskürtülerek ayrıştırıcı bakterilerin organik materyali parçalaması sağlanır.

Alternatif olarak, sıvı atık aktif balçık sistemlerinden – ayrıştırma yapan mikropların çok miktarda ve kontrollü bir şekilde yetiştirildiği tanklar – geçirilir. Genellikle bu mikroplar serbestçe suda yüzerler ama bazı durumlarda kirlenen suyun geçtiği filtrelerde de yetiştirilebilirler. Sonuçta sıvı atık klor kullanılarak dezenfekte edilir ve nehir veya okyanuslara geri salınır.

Kalan balçık ise anaerobik bakteriler tarafından daha fazla ayrıştırılması için anaerobik tanklara pompalanır. Metan ve karbondioksit üreten bakteriler bu tanklarda kullanılan genel suşlardır. Metan gazı genellikle toplanarak arıtma tesisindeki aletler için enerji kaynağı olarak kullanılır. Balçıkta bulunan küçük solucanlar da onun küçük parçalara ayrılmasında yardımcı olurlar. Balçık hiçbir zaman tamamen ayrıştırılmaz ama toksik materyaller ayrıldıktan sonra kurutularak arazi doldurma ve gübreleme için kullanılabilir.

Bilim insanlarının keşfettikleri "*Candidatus Brocadia anammoxidans*" adında bir bakteri eşsiz bir yeteneğe sahiptir ve bunlar idrardaki temel atık madde olan amonyumu ayrıştırabilmektedir (**Şekil 9.12**). Amonyumu çevreye bırakılmadan önce atık sulardan ayırmak çok önemlidir, çünkü yüksek miktarlarda amonyum sulak alanlarda alglerin aşırı çoğalması ve dolayısıyla oksijen eksilmesine sebep olarak



ŞEKİL 9.11 Kanalizasyon Arıtımı Kanalizasyon suları veya lağım arıtma tesisleri, balçık ve sudaki insan dışkısı ve temizlik deterjanları gibi organik materyalleri parçalamak için aerobik ve anaerobik bakterileri kullanan iyi planlanmış yapılardır.

çevreyi etkileyebilir. Genellikle atık su tesislerinde amonyumun oksidasyonu *Nitrosomonas europaea* gibi aerobik bakterilerin çok aşamalı reaksiyonlarıyla gerçekleştirilir. Buna rağmen "*Candidatus Brocadia anammoxidans*" anaerobik şartlarda amonyumu tek aşamada ayrıştırabilir ve bu, anamoks işlemi olarak adlandırılır. Hollanda'da bulunan atık su arıtma tesisleri günümüzde bu türü kullanmaktadır ve yakında diğer ülkelerde de kullanılmaya başlanacaktır.

Yeraltı sularının temizlenmesi

Kıyı sahilleri yakınındaki sızıntıları saymazsak, birçok büyük kimyasal sızıntı denizlerde yerleşim bölgelerinden uzakta gerçekleşir. Buna rağmen tatlısuların kirlenmesi genellikle yerleşim bölgelerine yakın yerlerde gerçekleşir ve içme sularını, yeraltı sularını ve su havzalarını kirleterek insan sağlığına karşı ciddi tehlikeler oluşturur. Yeraltı sularının kirlenmesi ABD'nde birçok alanda gerçekleşen genel bir problemdir. ABD'nin içme suyunun yaklaşık % 50'si yeraltı sularından karşılanır ve bazı tahminlere göre yeraltı su kaynaklarının büyük bir kısmı insan sağlığını etkileyebilecek derecede kirlenmiş olabilir. Kirlenmiş yeraltı sularının temizlenmesi suların kum ve kayalara tutunmuş olması ve bu akiferlerin yıkanmasının kolay bir yolu olmaması sebebi ile bazen çok zor olabilir.

Bu durumlarda ex situ ve in situ yaklaşımlar genellikle kombine kullanılır. Örneğin, yeraltı suları petrol veya benzin ile kirlendiğinde bu tip kirleticiler yüzeye yükselirler. Bu petrol veya benzinin bir kısmı doğrudan emilebilir fakat yeraltı suları ile karışan kısmı yüzeye pompalanmalı ve biyoreaktörlerden geçirilmelidir (**Şekil 9.13**). Biyoreaktörde perde veya ağlarda biyofilm şeklinde büyüyen bakteriler kirleticileri ayrıştırabilirler. Bu reaktörlere genellikle gübre ve oksijen de eklenir. Biyoreaktördeki gübre, bakteri ve oksijen içeren temizlenmiş su in situ biyoremediyasyon için akifere geri pompalanır (Şekil 9.13).



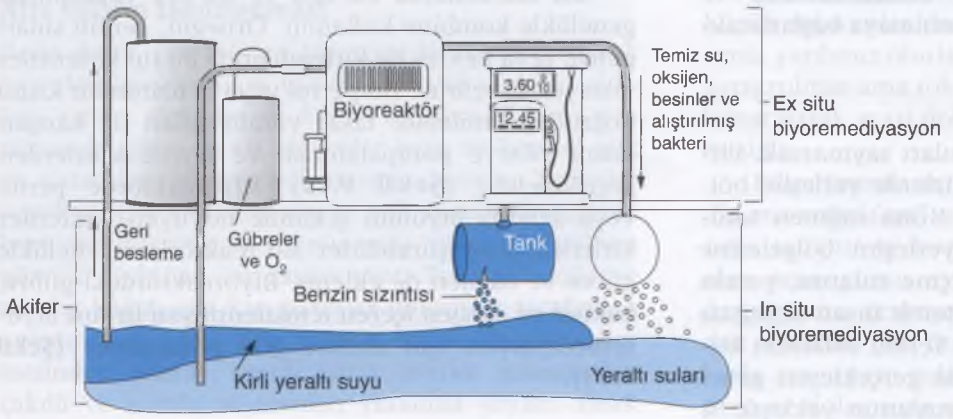
ŞEKİL 9.12 Amonyumu Parçalayabilen Anaerobik Bir Bakteri, *Candidatus Brocadia anammoxidans*, İçeren Biyoreaktör Eşi benzeri olmayan metabolik özelliklere sahip bu bakteri atık sularda bulunan amonyumu tek basamakta parçalayabilmektedir.

Atıkları Enerjiye Dönüştürmek

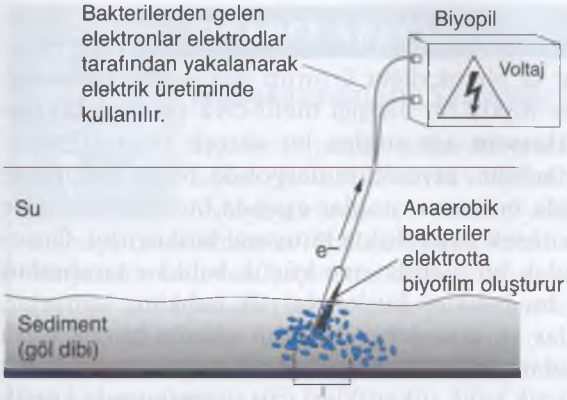
Dünyada bulunan çöp sahaları limitlerine ulaşmış ve tam anlamıyla ev ve iş atıklarıyla dolup taşmaktadır. Evlerimizden çıkan çöpler yemek atıkları, kutular, atık kâğıtlar, gıdaların mukavva muhafazaları ve benzer parçalardan oluşmaktadır. Birçok eyalet kimyasal atıkların sıradan atık gibi atılmasını azaltmaya çalışsa da, deterjanlar, temizlik malzemeleri, boyalar, tırnak parlatıcıları ve cilalar gibi çeşitli kimyasallar hala çöp kutularına gitmektedir.

Bilim insanları gıda atıkları ve diğer çöpleri, anaerobik bakterileri içeren biyoreaktörlerin kullanımıyla, toprak için besin maddeleri ve metan gazına çevirebilecek stratejilerle atık miktarını düşürmeye çalışmaktadırlar. Metan gazı elektrik üretiminde kullanılabilmekte ve toprak besin maddeleri çiftlik, fidanlık ve diğer tarımsal endüstrilerde gübre şeklinde ticari olarak satılabilmektedir. Bilim insanları ayrıca tohumlama stratejileri üstünde çalışarak, çöp sahalarında bulunan kimyasalları azaltmaya ve böylece sızma sonucu oluşacak toprak ve sulak alan kontaminasyonlarını azaltmayı hedeflemektedir. Biyoteknolojinin bu tip uygulamaları eğer başarılı olursa, atık miktarını azaltabilir ve kullanılabilir alanları ciddi anlamda artırabilir.

Kanalizasyon balçıklarındaki kirli sedimentler, okyanusların ve göllerin dipleri biyoremediyasyon çalışan bilim insanları tarafından keşfedilmemiş enerji kaynakları olarak incelenmektedir. Göllerde ve okyanuslardaki sedimentler çürüyen yaprak ve ölü organizmaların parçalanmasından dolayı organik materyalce zengindir. Bu "bataklık çamuru" yığınlarında bulunan anaeroblar sedimentlerde bulunan organik molekülleri kullanarak enerjiye çevirirler. *Elektrigenler* terimi organik maddeleri karbondioksite oksitleyerek elektrotlara elektron transfer edebilen ve bu yolla elektrik üretebilen mikroplara verilen isimdir. Gerekli

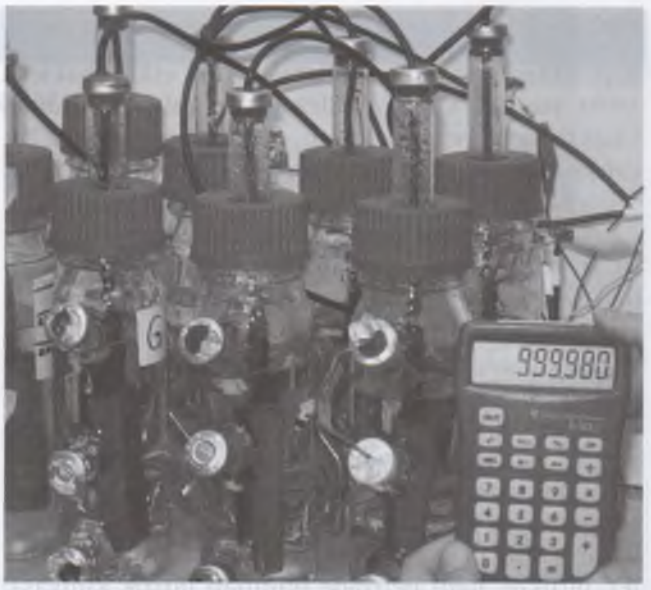


ŞEKİL 9.13 Yeraltı Sularının Ex situ ve In situ Biyoremediyasyonu Yeraltı sularına bulaşan benzin yer üstü (ex situ) ve in situ biyoremediyasyonun birlikte kullanılmasıyla temizlenebilir.



Sedimentteki organik molekülleri oksitleyen anaerob bakteriler elektronları demir ve sülfür gibi elektron alıcılarına transfer eder.

ŞEKİL 9.14 Kirlenmiş Sedimentler Keşfedilmemiş Enerji Kaynakları Olabilir Bilim insanları sedimentlerdeki anaerobik bakterilerin bir enerji kaynağı olabileceğini bulmuşlardır. Bu bakteriler sedimentteki molekülleri redoks reaksiyonlarını kullanarak parçalarken oluşan elektronlar daha sonra jeneratörlere taşınarak elektrik üretmek için elektrotlar tarafından yakalanabilmektedir.



ŞEKİL 9.15 Mikroplardan Güç Alan Yakıt Hücreleri Massachusetts Üniversitesi bilim insanları *Geobacter* yakıt hücrelerinin şekeri başarılı bir şekilde elektriğe çevirebildiğini göstermişlerdir.

şartlar sağlandığında elektrigenler bir araya getirilerek elektriği ileten nano-teller oluşturacak şekilde birbirine bağlanabilirler! Bu tip suşlar çiftlik gübresi ve evsel atıklardan elektrik üretmek için bile kullanılabilir.

Desulfuromonas acetoxidans demiri elektron alıcı olarak kullanarak sedimentlerdeki organik molekülleri oksitleyebilen anaerobik bir deniz bakterisidir. Araştırıcılar *D. acetoxidans* ve *Geobacter metallireducens*, *Rhodoferax ferrireducens* gibi diğer bakterilerden elektrik kaynağı olarak kullanılabilecek, *mikrobial yakıt hücreleri* olarak da adlandırılan, enerjiyi saklayabilen *bakteriyel biyopiller* yapmak için elektron hasat etmenin yollarını araştırmaktadırlar (**Şekil 9.14**). Massachusetts Üniversitesi'ndeki araştırıcılar elektrigenik mikrop suşlarının yüksek verimlilikte elektrik üretebildiğini göstermişlerdir. Öncül çalışmalar tekniğin gelecek vaat ettiğini gösterse de, konu üstünde daha çok araştırma yapılmalıdır (**Şekil 9.15**).

Biyoremediyasyon stratejileri birçok çevre kirliliğini etkin olarak temizlese bile, bütün kirlenmiş alanlar için çözüm değildir. Örneğin, kirliliğin ağır metal, radyoaktif madde, yüksek klorlu organik moleküller gibi toksik maddeleri yüksek miktarda içerdiği durumlarda, bu maddelerin mikropları öldürmesi nedeniyle, biyoremediyasyon yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden böyle alanlarda yeni stratejiler bulunup zorlu kirleticilerle mücadele edilmelidir. Bu tip yeni biyoremediyasyon stratejilerden biri de bir sonraki konunun başlığı olan genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalardır.

9.4 Genetik Olarak Değiştirilmiş Organizmalarla Çevre Temizliği

Biyoremediyasyon geleneksel olarak doğada bulunan mikroorganizmaların aktivasyonuna dayanmasına rağmen, birçok özgün mikrop özellikle çok toksik olan kimyasalları ayrıştıramaz. Örneğin, plastik üretiminde ortaya çıkan bazı organik kimyasallar ve resinler biyoayrıştırmaya karşı dirençlidir ve doğada yüzlerce yıl kalabilirler. Bunun yanında birçok radyoaktif madde mikropları öldürerek biyoayrıştırmayı engeller. Özetlemek gerekirse, bu tip inatçı ve özellikle toksik kirleticilerin bazıları için genetiği değiştirilmiş bakteri ve bitkilere ihtiyaç duyabiliriz. Bilim insanları rekombinant DNA teknolojilerinin gelişmesi ile genetiği değiştirilmiş (GD) organizmalar yapabilmeye başladılar ve bu da biyoremediyasyon işlemini geliştirmek için büyük bir potansiyel oldu.

Petrol-Yiyen Bakteriler

Biyoremediyasyonda kullanılan ilk etkili bakteri, 1970 yılında, General Elektrik'de çalışan Ananda Chakrabarty ve arkadaşları tarafından üretildi. Bu çalışma henüz DNA klonlama ve rekombinant DNA teknolojileri yaygınlaşmamışken yapılmıştı. Peki, Chakrabarty bunu nasıl başardı? Chakrabarty pestisit ve ham petrol de dâhil çeşit kimyasallar tarafından kirletilmiş topraklardan *Pseudomonas* suşları izole etti. Sonra bu suşlardan naftalin, oktan ve ksilen gibi organik maddeleri ayrıştırabilen suşları belirledi. Bu suşlarm birçoğu kimyasalların bulunduğu ortamlarda yaşayabiliyordu, çünkü bu maddelerin yıkımı için gerekli genleri kodlayan plazmidlere sahiptiler.

Chakrabarty bu farklı suşları çaprazlayarak sonuçta birçok farklı plazmide sahip bir suş üretmeyi başardı. Bu plazmidler tarafından üretilen proteinler, birlikte, ham petrolde bulunan birçok kimyasal içeriği arıtabiliyordu. Chakrabarty bu çalışmasıyla GD canlı bakteriler için ilk ABD patentini alarak ödüllendirildi. Buna rağmen, bu patent kararı çok tartışıldı ve mahkemelerde yaklaşık 10 sene geciktirildi. Tartışılan en önemli konu yaşam formlarının patentlenip patentlenemeyeceği ve Charabaty'nin rekombinant bakterisinin doğanın bir ürünü mü, yoksa bir buluş mu olduğuydu. Sonuç olarak ABD Yüksek Mahkemesi rekombinant *Pseudomonas*'ın bir buluş değeri taşıdığına ve patentlenebileceğine karar verdi.

Chakrabarty'nin yaklaşımı aslında göründüğü kadar etkili değildi. Ham petrol içinde binlerce madde içeriyor ve onun GD bakterisi bu maddelerin sadece birkaçını ayrıştırabiliyordu. Ham petrolde bulunan kimyasalların büyük bir kısmı bu rekombinant bakteriler tarafından etkilenmeden kalabiliyordu. Bu nedenle değişik ayrıştırıcı özellikler içeren GD bakterilerin geliştirilmesi araştırmalarda önemli bir yer tutmaktadır. Gelecekte ham petrolün temizlenmesi için kullanılabilecek faydalı bir yaklaşım, her biri petroldeki farklı bir maddeyi parçalayabilen, birçok bakteri türünün beraber kullanımı olabilir. Günümüzde biyoremediyasyonda GD bakterilerin kullanımı öncelikle toplumsal endişeler ve yasal engellerden dolayı oldukça kısıtlıdır. Ayrıca, GD mikroorganizmalar kullanıldıkları bölgeye özgün mikroplar tarafından saf dışı bırakılmaları nedeniyle de genellikle çok etkili olamamaktadırlar.

Ağır Metal Temizliği İçin *E. coli* Tasarlamak

Bakır, kurşun, kadmiyum, krom ve cıva gibi ağır metaller insan sağlığına ve doğal yaşama ciddi zararlar verebilir. Cıva çevreyi kirletebilen son derece toksik bir metaldir. Cıva pil, elektrik anahtarları, tıbbi ekipmanlar ve birçok diğer ürünün imalatında kullanılır. Cıva ve ilişkili bir bileşiği metil-cıva (MeHg) **biyoakümülasyon** adı verilen bir süreçle organizmalarda birikebilir. Biyoakümülasyonda besin zincirinde yukarıda bulunan canlılar aşağıda bulunanlara göre daha yüksek yoğunlukta kimyasal biriktirirler. Örneğin, sulak bir alanda cıva küçük balıklar tarafından alınır, bu balıklar kuşlar, büyük balıklar, samurlar, rakunlar ve insanların da dâhil olduğu birçok canlı tarafından tüketilir. Büyük balıklar ve kuşlar daha çok küçük balık tükettikleri için sistemlerinde küçük balık ve kuşlara göre daha çok cıva birikir. Benzer bir şekilde bir insan birincil besin kaynağı olarak büyük balıkları tüketiyorsa, zamanla vücudunda yüksek miktarda cıva birikimi olacaktır. Cıva veya metil-cıvayla kirlenmiş balık veya kabuklu su canlılarının düzenli tüketiminin insan sağlığına doğum kusurları ve beyin zararı gibi ciddi tehlikeleri olmaktadır. Bu yüzden ABD'nin birçok bölgesinde sağlık ofisleri tarafından hamile kadınların ve küçük çocukların sadece kılıçbalığı ve taze tuna gibi belirli tür balıkları tüketmesi ve bu öğünlerin haftada biri geçmemesi tavsiye edilir.

Günümüzde kullanılan cıva temizleme yöntemlerinin birçoğu cıvayı sulak alanlardan yeterli seviyede ve kabul edilebilir standartlarda temizleyemez, çünkü cıvanın çok düşük dozları bile toksiktir. Bilim insanları araştırmaları sonucu cıva ve diğer ağır metalleri temizlemede yararlı olabilecek GD *E.coli* suşları geliştirmişlerdir. Ayrıca, bitkilerde ve diğer canlılarda bulunan ve metallere bağlanan birçok protein belirlenmiştir. Metallotiyoneinler ve fitoşelatinler, yüksek miktarda metal bağlanma kapasitesi olan ve en iyi karakterize edilmiş iki protein tipidir. Ne yazık ki bu proteinlerin çalışabilmesi için metallerin hücreye girmesi gerekmektedir. Bunun için bilim insanları cıvayı metal-bağlanma proteinlerinin bulunduğu hücre sitoplazmasma hızlı bir şekilde alması için *E.coli*'yi gerekli taşıma proteinlerine sahip olacak şekilde değiştirmiştir.

Genetiği değiştirilmiş bakterilerin bazıları cıvayı doğrudan özümseyebilirken, diğerleri etki mekanizması sünger gibi olan ve sudan cıvayı çekebilen biyofilmler şeklinde büyütülebilir. Bu teknikte cıva içeren bakterilerin uzaklaştırılması için biyofilmler periyodik olarak değiştirilmelidir. Benzer bir şekilde GD metallotiyonein içeren tek hücreli algler ve siyanobakteriler de çok tehlikeli diğer bir metal olan ve insanlarda ciddi sağlık problemleri oluşturan kadmiyumun özümsenmesinde gelecek vaat etmektedirler.



TİCARET ARAÇLARI

Mikrokozmozların Sağladığı Önemli Yararlar

Biyoremediyasyon çalışan bilim insanları sayısız çevresel şartlarda kimyasalların biyoayrıştırılması için yenilikçi yollar bulmaya çalışmaktadırlar. Endüstri devamlı olarak yeni kimyasallar bulurken, kaçınılmaz olarak bu kimyasallar çevreye doğru yollarını bularak doğaya karışıyorlar. Çevre kirleticilerden her zaman bir adım önde olmak için, araştırıcıların yeni temizleme teknikleri geliştirmeye devam etmeleri gerekir.

Çevrede daha önce görülmeyen yeni bir kimyasalın biyoremediyasyonu araştırıcılar tarafından nasıl çalışılıyor? Nasıl temizleyeceklerine dair teorilerini test etmek için büyük bir alanı kirletemeyecekleri gibi *Exxon Valdez* sızıntısında olduğu gibi büyük çaplı bir çevre felaketi olmasını da bekleyemezler. Yeni biyoremediyasyon stratejilerini öğrenmek için yapılabilecek en pratik yaklaşımlardan biri; gerçek yaşamdaki çevre olaylarını taklit eden, yapay test ortamları olan **mikrokozmozlar** oluşturmaktır. Bazı mikrokozmozlar – toprak, su, kirleticiler ve biyoremediyasyon yetenekleri test edilecek mikropları içeren – 5 galon büyüklüğünde küçük biyoreaktörlerden oluşur. Mikrokozmozlar bir test tüpü veya şişedeki birkaç gram toprak kadar küçük olabileceği gibi genellikle geniş alanları daha iyi yansıtmaları için büyük ölçeklerdedir. Örneğin, kapalı veya açık alanlardaki geniş havuzlar veya kirleticinin test tesisinden sızmasını engelleyebilecek arsalar mikrokozmoz olarak kullanılabilir. Mikrokozmoz dikkatlice tasarlanırsa biyoremediyasyon araştırıcıları temizlenecek alanı taklit edebilirler.

Biyoremediyasyon potansiyeline sahip özgün veya GD organizmalar belirlendiğinde, biyoreaktörlerdeki veya küçük izole toprak veya su alanlarındaki çalışmalar bu organizmaların daha geniş uygulamalarda etkili bir şekilde temizleme yeteneklerini belirlemede önemlidir. Bilim insanları mikrokozmozdaki nem, sıcaklık, besin miktarı, oksijen, pH, farklı toprak çeşitleri gibi çevre şartlarını dikkatlice yöneterek organizmaların farklı şartlarda farklı kirleticileri parçalama yeteneklerini test edebilirler.

Hatta mikrokozmoz testleriyle, kirli yeraltı suları veya toprak mikrokozmoz içine yerleştirilen deneysel mikropların yıkım hızı izlenebilir ve temizleme süresi hesaplanabilir. Ayrıca, bilim insanları farklı kirleticilerin karışımlarının biyoremediyasyonunu aynı zamanda test edebilirler.

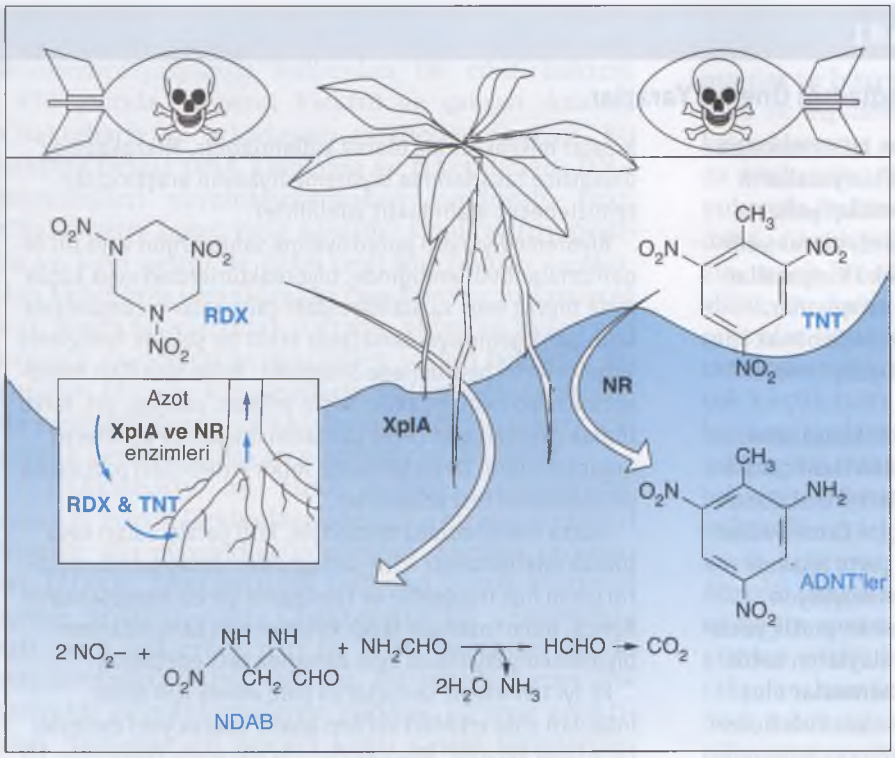
En iyi temizleme sonuçlarını elde etmek için bilim insanları elde ettikleri verileri analiz ederek yeni deneyler tasarlayacaklardır. Mikrokozmozda başarıyla uygulanan bir temizleme stratejisinin alanda da başarılı olması garanti değildir; ancak yine de biyoremediyasyon çalışmalarını mikrokozmozda test ederek bir temizleme stratejisinin alandaki kirlenen çevreyi başarılı bir şekilde temizleme şansının olup olmadığının kararını vererek hem zaman hem de paradan tasarruf edilebilir.

Biyosensörler

Araştırıcılar *Pseudomonas fluorescens*'in karbon ve hidrojenin karmaşık yapılarından biri olan polisiklik aromatik hidrokarbonlar (PAH) ve diğer toksik kimyasalları ayrıştırabilen GD suşlarını geliştirmişlerdir. Bilim insanları rekombinant DNA teknolojisini kullanarak, kirleticileri metabolize edebilen enzimleri kodlayan özel genleri, biyolüminesans deniz bakterilerinden alınan *lux* genleri gibi raportör genlere eklemişlerdir. Hatırlarsak *lux* genleri ışık saçan lusiferaz enzimini kodladıkları için genellikle raportör gen olarak kullanılıyordu (Bölüm 5). PAH'lar parçalandıkça bakteriler ışık saçmakta ve bu da biyoayrışmanın hızını izlemekte kullanılmaktadır. Buna benzer teknikler kullanılarak *lux* genlerine sahip rekombinant bakterilerden **biyosensörler** geliştirilmiştir. Bu tip biyosensörler ağır metaller gibi çevre kirliliklerinin değerlendirilmesinde kendini ispatlamıştır. Gelecekte GD mikropların biyosensör olarak daha önemli roller oynaması beklenmektedir. Sonraki kısımda, üzerinde en çok çalışılan ve kamuoyunca bilinen biyoremediyasyon örneklerinden ikisini inceleyeceğiz.

Genetiği Değiştirilmiş Bitkiler ve Biyoremediyasyon

Son yıllarda bilim insanları biyoremediyasyon kapasitesitelerini arttırmak için genetiği değiştirilmiş bitkiler üstünde çalışmaktalar. Halen, metilcıva (MeHg) kirliliğini fitoremediyasyon ile temizlemek aktif araştırma alanlarından birisidir. Birçok balık türünde oluşan cıva kirliliğinin nedeni MeHg birikimidir; bu yüzden cıva kirliliği içeren balıkların tüketilmesine dünya çapında birçok kısıtlama getirilmekte ve sağlık uyarıları yapılmaktadır. Bakterilerin cıva detoksifikasyon genlerine sahip GD bitkilerin MeHg akümülasyonu için potansiyel olabileceği gösterilmiştir; bu bitkiler sonuçta fitoremediyasyon için kullanılabilirler.



ŞEKİL 9.16 Toksik Patlayıcıların Transgenik Bitkiler Kullanılarak Fitoremediyasyonu *XplA* ve *NR* genleri aktarılan transgenik bitkiler kökleri ile aldıkları RDX ve TNT'yi parçalayarak daha az toksik olan ADTN veya NDAB'ye veya toksik olmayan (NH_3, CO_2) maddelere ayrıştırırlar. *XplA* geni eklenen bitkiler RDX'ten ayrıştırdıkları bu maddeleri kendi büyümelerini arttırmak için kullanırlar.

Bu araştırmaların umut vaadeden diğer bir alanı ise askeri patlamalardan ve silah ateşlemelerinden dolayı toprak ve yeraltı sularında oluşan kimyasalları temizleyebilen bitkilerin geliştirilmesidir. Hekzahidro-1,3,4-trinitro-1,3,5-triazine (RDX veya kraliyet imha patlayıcısı olarak da bilinir) ve 2,4,6-trinitrotoluen (TNT) patlayıcı üretimi, kullanımı ve yayılması kaynaklı en sık rastlanan iki kimyasal kirlenmedir. Bu kimyasallar kolayca toprak ve yeraltı sularında yayılarak kirlenmeye sebep olabilir. Hem RDX hem de TNT birçok canlı için çok toksiktir ve doğal yaşamla insan sağlığı üzerinde ciddi tehlikeler oluşturmaktadırlar.

TNT'nin Tablo 9.1'de listelenen kimyasallar içinde ilk 20'de yer aldığına ve EPA'nın TNT ve RDX'i çevreden öncelikli olarak temizlenmesi gereken kimyasallar listesinde değerlendirdiğine dikkat edelim. Bu kirleticiler dünya genelindeki önemli kirlilik problemlerinin başlıcalarındandır. İnanılmaz bir şekilde bu kimyasalların yüzlerce tonu dünyadaki farklı alanlarda yayılmış durumdadır ve on binlerce dekarlık alan bunlar nedeniyle güvenli değildir.

Az sayıda bakteri ve bitkinin TNT'yi çok az etkinlikle parçaladığı gösterilmiştir. RDX için ise kimyasal yapısından dolayı durum çok daha yetersizdir. Buna rağmen, son yıllarda bilim insanları genetik mühendisliğini kullanarak TNT ve RDX'in fitoremediyasyonu için çok etkili olabilecek transgenik bitkiler üretmişlerdir. *Enterobacter cloacae*'ye ait nitroredüktaz genine sahip transgenik tütün etkin olarak TNT'yi daha az toksik kimyasallara ayrıştırabilmektedir (**Şekil 9.16**). Son zamanlarda da bilim insanları *Rhodococcus rhodochrous* bakterisinden *xplA* genini *Arabidopsis thaliana* bitkisine aktarmışlardır. *xplA* geni sitokrom P450 adında bir enzim üretmektedir ve bu enzim RDX bitki tarafından absorbe edildiğinde onu ayrıştırabilmektedir (Şekil 9.16). Görüldüğü gibi günümüzde hem TNT hem de RDX'i ayrıştırabilen bitkiler üretmek mümkündür. Hatta kavak genomu dizilemesi bitirildiği için, fitoremediyasyon çalışan bilim insanları kavak ve bu tip hızlı gelişen, derin köklü transgenik ağaçlarla TNT ve RDX'i derin topraklardan temizleme konusunda oldukça heveslidirler. Bir sonraki kısımda halen uygulamada olan bazı biyoremediyasyon örneklerinden üzerinde en çok çalışılan ve en çok duyurulanları ele alacağız.

9.5 Çevresel Felaketler: Biyoremediyasyonda Örnek Olaylar

Çoğu biyoremediyasyon yaklaşımı nispeten küçük, belki birkaç yüz dönüm büyüklüğündeki bulaşık bir alanın temizlenmesini içerir. Bununla birlikte, farklı biyoremediyasyon stratejilerinin etkinliği hakkında en fazla bilgi biyoremediyasyon ile iyileştirilmiş geniş kapsamlı çevre felaketlerindeki çalışmalar sayesinde öğrenilmiştir.

Exxon Valdez Petrol Sızıntısı

Dünya ham petrole ve petrolden elde edilebilen yan ürünlere oldukça bağımlıdır. Petrol ürünleri sadece otomobilleri çalıştırmak için benzin ve dizel yakıt olarak kullanılmaz, ayrıca plastik, boyalar, kozmetik ve deterjanlar gibi yüzlerce günlük ürünün temelinde de kullanılır. Sadece ABD her yıl, 350 milyar litresinden fazlası ithal edilen, 950 milyar litreyi (250 milyar galon) aşkın petrol kullanır. Ham petrol taşınırken hemen hemen her zaman bir miktar sızıntıyla kayıp oluşur. Tanker kazalarında her yıl yaklaşık 400 milyon litre ham petrol etrafa yayılır ve bundan daha fazla miktarda petrol doğal olarak oluşan sızıntı ve kaçaklarla denizlere karışır.

Petrol sızıntılarının çevre, özellikle de doğal yaşamdaki birçok canlı üzerinde, ciddi etkisi vardır (**Şekil 9.17a**). Genellikle büyük sızıntıların insan yaşamı üzerinde doğrudan büyük bir etkisi yoktur. Çünkü en büyük sızıntılar açık okyanuslarda veya plajlardan ve su kaynaklarından uzak koylarda olur. İnsanlar daha çok yerel küçük sızıntılardan etkilenir. Örneğin, bir benzin istasyonunun sızan yeraltı deposu yerel içme suyunu tehdit edebilir.

1989 yılında, *Exxon Valdez* petrol tankeri Alaska açıklarındaki Prince William Sound'da karaya oturmuş ve yaklaşık 42 milyon litre (11 milyon galon veya yaklaşık 260 000 varil) ham petrol oraya salınarak Alaska kıyı şeridinin 1000 mil'den büyük kısmını kirletmiştir. Bu sızıntıyı temizlemek için birçok biyoremediyasyon deneysel yaklaşımı uygulanmıştır. Prince William Sound, biyoremediyasyon temizleme stratejilerini denemek için bir alan laboratuvarı haline gelmiştir.

Birçok büyük petrol sızıntısında olduğu gibi, ilk fiziksel temizleme tedbiri petrolü kontrol altına alarak ortadan kaldırmaya çalışmak olmuştur. Bu önlemler, sınırlama boruları veya deniz süpürücüleri – yüzey ağları, perdeler veya şişirilebilir şamandıra benzeri ekipmanlar – gibi sabit veya bir tekne tarafından çekilen donanımlarla petrolün toplanıp kontrol altına alınmasını içermekteydi. Daha sonra, petrolü yüzeyden atık tanklarına pompalamak için vakum makineleri kullanıldı. Plajlar ve kayalar petrolü dağıtmak için yüksek basınçlı suyla temizlendi. Denizdeki petrolün seyreltilmesi ve çözülmesiyle petrol giderek kayboldu. Bir biyoteknolojik temizleme uygulaması olarak da, ham petrolü engellemek ve emici tabakalarda biriktirmek için turunçgiller menşeli ürünler kullandı. Fakat petrolün bir kısmını kaldırmak için yapılan tüm bu fiziksel yaklaşımlar kullanıldıktan sonra bile milyonlarca galon petrol hala kıyı yüzeyinde kuma, kayalara, yüzeydeki ve yüzeyin altındaki çakıllara tutulu kalmış şekilde duruyordu. İşte o zaman biyoremediyasyon çalışması başladı.

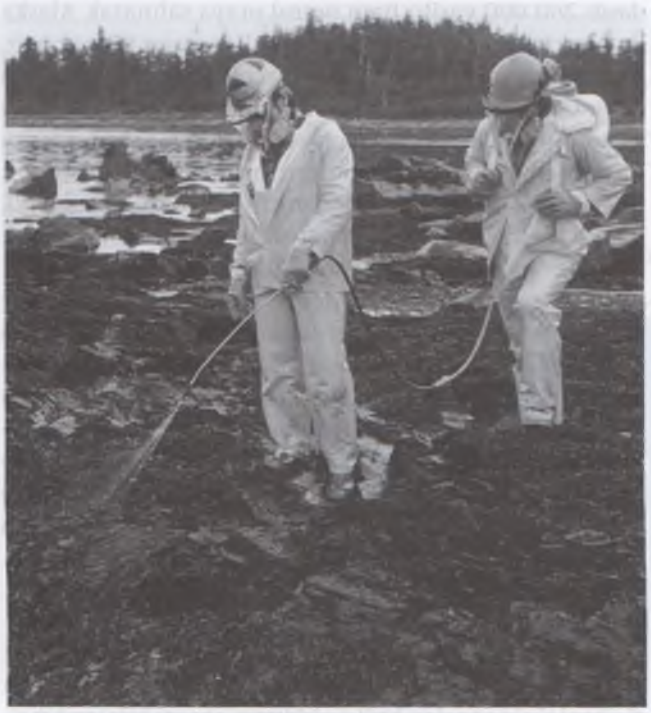


(a)



(b)

ŞEKİL 9.17 Petrol Sızıntıları Çevreye Ciddi Tehdit Oluştururlar (a) Petrol sızıntıları en çok doğal yaşama zarar verirler. (b) Öncelikli olarak sınırlama boruları kullanılarak petrolün çevreye yayılması kontrol edilir ve kirlilik en aza indirgenir.



ŞEKİL 9.18 Petrol-Parçalayan Bakterilerin Gelişimi için Gübrelenmesi Temizlik işçileri Alaska *Exxon Valdez* petrol sızıntısından sonra azotça zengin gübreleri petrole bulanmış toprağa spreyliyor. Gübreler petrolü parçalayacak bölgeye özgün bakterilerin gelişimini önemli oranda hızlandırabiliyor.

Biyoremediyasyon sürecinde ilk adım olarak, kumda ve kayalarda yaşayan ve petrol-ayrıştıran bakterileri (çoğunlukla *Pseudomonas* suşları) uyarmak için kıyılara azot ve fosfor gübresi uygulandı (**Şekil 9.18**). Bu özgün bakteriler petrolü ayrıştırdıklarının işaretini hemen gösterdiler. Mikroplar petrolü ayrıştırdıklarında, PAH'lar oluşur ve zamanla bunlar oksitlenerek karbon zincirleri oluştururlar, bunlar da karbondioksit ve suya dönüşürler. Zaman içerisinde, kıyıdaki topraktan alınan petrol testleri, kimyasalların doğal bozunumlarını gösteren, bileşimdeki önemli değişimleri ve bakterilerin çalıştığını ortaya çıkardı. Bununla birlikte, petrol sedimentlere ve kıyıdaki kayaların düşük oksijenli (biyoremediyasyonun nispeten yavaş olduğu) katmanlarına sızdı. *Exxon Valdez*'in petrol sızıntısının tamamen temizlenmesi yüzlerce yıl alabilir ve Alaska'daki bazı alanlar asla sızıntıdan önceki haline dönmeyebilir.

Kuveyt Petrol Yatakları

Kuveyt çölleri biyoremediyasyon çalışmaları için tam anlamıyla yaşayan bir laboratuvardır. Körfez Savaşı'ndan 10 yıl sonra Kuveyt çöllerinde geniş alanlar petrol içinde kaldı. 1990'dan 1991'e kadar süren Irak'ın Kuveyt'i işgali sırasındaki sayısız petrol alanlarının yakılıp tahrip edilmesi sonucu, yaklaşık 950 milyon litre petrol – *Exxon Valdez* kazasındaki sızıntının yaklaşık 20 katı kadar miktarda – çöllere salındı. Kuveytli bilim insanları yaptıkları çalışmalarda dökülen petrolün bitkileri ve hayvanları ciddi bir şekilde etkilediğini gördüler. Bazı bitki türleri tamamen ortadan kalktı ve bunun uzun süreli biyolojik etkisi de yıllarca bilinmeyecek.

Exxon Valdez'deki sızıntının aksine, çöl topraklarındaki biyoremediyasyonda bir takım farklı problemlerle karşılaşıldı. Çölde Alaska'daki gibi petrolü dağıtacak ve çözecek yardımcı dalgalar yoktur. Ayrıca, çöl toprağının kuruluğu daha az çözücü bakteri barındırmasına ve petrolün kuma ve kayalara yapışması doğal bozunma süreçlerinin yavaşlamasına yol açar. Ön çalışmalar petrol-ayrıştıran yeni bakteri suşlarının kum yüzeyinin altındaki petrolü yavaş bir süreçle parçaladığını göstermektedir.

Kuveyt hükümeti, dünyanın en büyük biyoremediyasyon projesi olabilecek, 1 milyar dolarlık bir program oluşturmuştur. Daha önceden kurak çölde temizlemeye örnek verilebilecek bu büyüklükte bir çalışma olmamıştı. Böylelikle dünyanın dört bir yanından bilim insanları Kuveyt çöllerinde petrolden sırılsıklam olmuş kumu temizlemek için stratejiler geliştirmek umuduyla çalışmalar yapmaktalar. Bilim insanlarının bu çalışmalardan öğrendikleri, diğer kumsal alanlardaki petrol sızıntılarının temizlenmesi için kesinlikle değer taşıyacaktır.

Deepwater Horizon Petrol Sızıntısı

20 Nisan 2010'da British Petrol (BP) petrol çıkarma kulesi *Deepwater Horizon* patladı ve milyonlarca galon ham petrol Lousiana kıyılarına yaklaşık 65 km uzaklıkta Meksika Körfezine boşaldı (**Şekil 9.19a**). Petrol akıntısı tahminleri çok farklılık göstermesine rağmen, kırılan borunun Temmuz ortalarında kapatılmasına kadar Meksika körfezine 600 milyon litreden fazla petrolün yayıldığı ve bunun tarihteki en büyük petrol sızıntısına sebep olarak, dünyadaki en büyük çevre felaketini oluşturduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, sahile ulaşan miktar, bahsi geçen sızıntının büyüklüğüne göre tahmin edilenden çok daha azdır. Temizleme ekiplerince toplanamayan petrol, dalgalarla ve kimyasal dağıtıcılar kullanılarak dağıtıldı. Kontrollü yanmalar ve petrol yüzeyinde PAH gibi uçucu materyallerin buharlaşmasının da temizleme işlemine katkısı oldu; fakat hesaplamalara göre petrolün yaklaşık yüzde 50'sini ayrıştıran biyoremediyasyon en büyük rolü oynadı.



ŞEKİL 9.19 Meksika Körfezi'nde Oluşan *Deepwater Horizon* Petrol Sızıntısının Biyoremediyasyonunda Mikroplar Önemli Rol Oynadı (a) *Deepwater Horizon* petrol sızıntısında yüzeyde ve yüzey altı petrol bacalarında bolca bulunan özgün bakteriler biyoremediyasyon için oldukça önemliydi. Resimde yüzeydeki petrol akıntısında yüzen bir balina görülüyor. (b) 100 defa büyütülmüş bir petrol damlası ve onu metabolize eden mikroplar (çember içinde).

Massachusetts Woods Hole Oşinografi Enstitüsü'ndeki denizbilimcilerin çalışmalarına göre; sızıntının ilk 5 günü boyunca mikroplar petrolü önemli ölçüde azaltamadı. Zaman içerisinde, petrolden oluşan en az 22 mil uzunluğundaki bir sualtı sütunu gelişti. Haftalar içerisinde mikropların hızlıca çoğalarak bu sütunun içerisinde toplandığı ve buradaki bakteri yoğunluğunun sütunun dışına göre iki kat olduğu gözlendi (Şekil 9.19b). Petrol sütunu içerisindeki özgün mikroplar üzerinde yapılan çalışmalar, 1500'den fazla genin hidrokarbonları indirgemek üzere tasarlanmış protein kodladıklarını ortaya çıkardı. Açıkçası, hidrokarbon indirgeyen bakteriler gaz sütunu içerisinde yüksek miktarda bulunuyordu ve bu mikroplar aktif olarak petrolü ayrıştırıyordu. Ayrıca, mikropların sızıntı sırasında Meksika Körfezine sızan yaklaşık 200 000 ton metanı da indirgediği görüldü. Etan ve propan da kirlenme esnasında yayılan ve mikroplar tarafından indirgenebilen temel hidrokarbonlar arasındaydı.

Sıcak körfez akımı ve gaz sütunundaki bileşenler – propan ve etan içeren doğal gazlar gibi – ortama özgün bakterileri aktive ederek biyoayrıştırmayı hızlandırdı. Demir, azot ve fosfor gibi gübreler de biyoayrıştırmayı arttırmak için ilgili bölgelere eklendiler. Petrol sütununda bulunan oksijen gradyanı sütun boyunca ayrıştırma hızının farklı olmasına sebep oldu. Hesaplamalar bu tür mikropların gaz sütunundaki petrol miktarını yaklaşık olarak her 3 günde bir yarıya indirgediğini göstermektedir.

Peki bu bakteriler nereden gelmişti? Petrolü indirgeyen bakteriler çok uzun zamandır burada bulunuyordu ve deniz tabanından doğal yollarla sızan petrolde gelişiyorlardı. Meksika Körfezinin zeminine doğal yollarla her yıl yaklaşık 79 milyon litre petrol sızıntısı oluyordu. *Deepwater Horizon* gaz sütunu kapsamında araştırıcılar bakterilerin yeni keşfedilen türleri de dâhil olmak üzere 900'den fazla alttürünü tespit etmişlerdir. Diğer bir olasılık ise, kırılan kuyudan kaynayan petrolün seyreltilmesi için kullanılan dağıtıcı kimyasalların mikroskobik parçacıklar oluşturarak petrol ile su arasındaki yüzey alanını arttırması ve petrolü parçalayan bakteriler için geniş bir temas yüzeyinin oluşmasıdır. Louisiana'nın

sulak alanlarına sızan petrolün ve Körfez bölgesinde yayılan petrolün ve kimyasal dağıtıcıların deniz ekosistemlerindeki uzun süreli etkisi gelecek yıllarda ortaya çıkacaktır.

Sonraki kısım, bazı zorluklar içeren temizleme problemlerinin çözümü için biyoremediasyonun olası uygulamalarına bir bakış açısı kazandıracaktır.

9.6 Zorlu Biyoremediyasyonlar

Biyoteknoloji kazalar, endüstriyel üretim ve ekosistemlerin kötü yönetimi sonucunda kirlenen alanların rehabilitasyonunda kullanılan önemli bir araçtır. Biyoremediyasyon hızla gelişen bir bilim dalıdır. Dünya genelindeki bilim insanları biyoayrışım süreçlerinde rol alan mikroorganizmaların anlaşılmasına, bu ayrışma süreçlerindeki yeni genlerin ve proteinlerin belirlenmesine yardımcı olacak araştırmalar yapmaktalar. Araştırıcılar yeni kimyasal çeşitlerini parçalayabilen GD mikroplar oluşturmak için mikrobiyal genetik çalışmaları yapmakta ve kirlenmeyi belirleyip izleyebilmek için yeni biyosensörler geliştirmeye çalışmaktalar.

Değerli Metallerin Geri Kazanılması

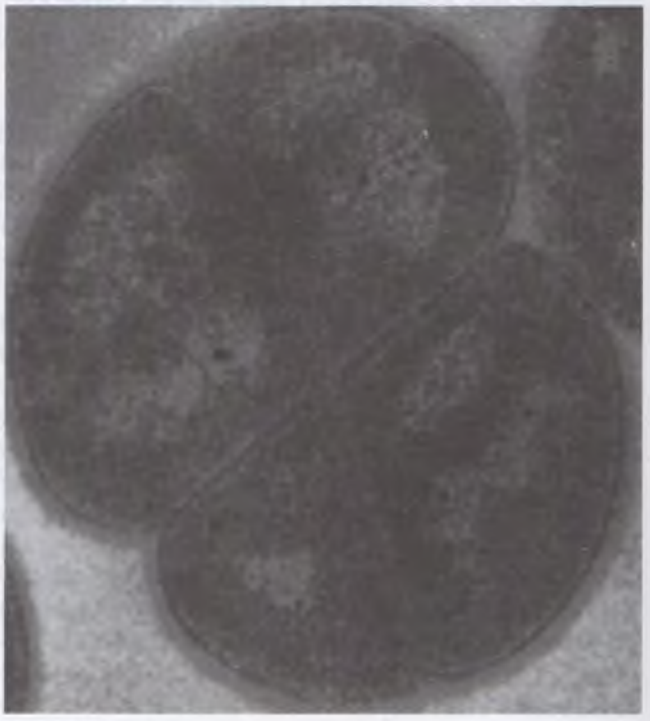
Bakır, nikel, bor ve altın gibi değerli metallerin geri kazanımı biyoremediyasyonun tam potansiyeline ulaşmamış diğer bir alanıdır. Birçok mikrop, oksidasyon reaksiyonları ile metal ürünleri, bakteri hücrelerinde birikecek veya bakteri hücre duvarına tutunacak şekilde, metal oksitler ve cevher adı verilen çözünmez maddelere çevirebilirler. Bunun yanında derin hidrotermal bacalarda yaşayan bazı deniz bakterileri değerli metalleri çökeltme potansiyeline de sahiptir. Üretim esnasında ortaya çıkan zararlı metallerin bakteriler kullanılarak ortadan kaldırılması potansiyel bir uygulamadır; ayrıca, bilim insanları bu bakterilerin değerli metallerin geri kazanımında kullanılması için de yollar aramaktadır. Örneğin, altın ve gümüş kaplama tekniklerinin kullanıldığı birçok üretim süreci asılı durumda kalan altın ve gümüş parçacıklarından oluşan bir atık üretir. Bu metallerin bir kısmının atık solüsyondan geri kazanımı için mikroplar kullanılabilir. Benzer bir şekilde yeraltı su kaynakları ve mağara sularında bulunan altın madenlerinden altının çıkarılması için aynı mikroplar kullanılabilir. Böyle çevrelerde yaşayan bakteri türleri bu nedenlerle aktif olarak araştırılmaktadır. Bitkiler de metallerin çevreden toplanmasında bir yol sağlayabilirler. Avusturya Alplerine özgü yabani hardal (*Thlaspi goesingense*) metalleri depo vakküllerinde toplaması ile bilinmektedir.

Radyoaktif Atıkların Biyoremediyasyonu

Aktif araştırmaların diğer bir alanı ise, radyoaktif materyalleri çevreden uzaklaştırmak için biyoremediyasyon yaklaşımları geliştirmektir. Doğal uranyumun işlendiği madenlerdeki sularda uranyum, plutonyum ve benzeri radyoaktif maddeler bulunabilir. Nükleer reaktörlerdeki radyoaktif atıklar da dünya çapında bir arıtma problemi oluşturmaktadır. ABD Enerji Bakanlığı (DOE) 30 eyalette silah üretimi ve nükleer reaktör sebebiyle oluşmuş 100'den fazla bölge belirlemiştir. Radyoaktif atık bölgeleri genellikle plutonyum, sezyum, uranyum gibi radyoaktif elementler ve toluen gibi organik kirleticilerin karışımını içeren kompleks alanlardır.

Radyoaktif maddelerin çoğu bakterilerin çoğunluğunu öldürmesine rağmen, bazı bakteri suşları radyoaktif kimyasalları parçalama potansiyeline sahiptir. Örneğin, Massachusetts Üniversitesindeki araştırıcılar yeraltı sularında bulunan çözünmüş uranyumu başarılı bir şekilde sabitleyerek çözünmemiş uranyuma indirgeyebilen bazı *Geobakter* türleri keşfetmişlerdir. Buna rağmen henüz radyoaktif elementleri tamamen zararsız ürünlere metabolize edebilen herhangi bir bakteri keşfedilmemiştir.

Deinococcus radiodurans (Şekil 9.20) adındaki bir bakteri suşu bu konuda büyüleyici özelliktedir. Bu suşun isminin anlamı "radyasyona dayanabilen



ŞEKİL 9.20 ***Deinococcus radiodurans*** Bu bakteriler radyasyon hasarına karşı oldukça dayanıklıdırlar.



KARARI SİZ VERİN

Hudson Nehri PCB Açmazı

New York'un taşra kısımlarını sarmalayan Hudson nehri, ülkenin kuzey doğusunun en güzel bölgelerinden biridir. Buna rağmen Hudson nehrinin parlayan sularının altında ciddi problemler pusu kurmuştur. General Elektrik firması, Fort Edward Hudson Şelalesinde bulunan tesislerinden 1947 yılından 1977'ye kadar, 500 tondan fazla poliklorlubifenil (PCB) isimli toksik kimyasalı bu nehre salmıştır. PCB transformatör kutuları, kapasitörler ve 1977 yılından önce üretilmiş elektrik ekipmanlarında bulunan soğutma ve insülasyon sıvılarında yoğunlukla kullanılmıştır. ABD'de artık üretim esnasında PCB kullanılmamaktadır ve dünyanın birçok yerinde de yasaklanmıştır.

PCB yağda çözünebilir bir madde olup, yağ dokusunda birikebilmesinden dolayı insan ve doğal yaşam için oldukça toksiktir. Hudson nehrinde bulunan balıklar güvenlik limitlerinin üstünde bir düzeyde PCB ile kirlenmişlerdir. Bu yüzden Hudson civarındaki birçok bölgede balık tüketimi yasaklanmış ya da sınırlandırılmıştır. Buna rağmen suyun çok temiz görünmesi ve balıkların kirlilik emaresi göstermemesi sebebiyle bazı insanlar bu kuralları görmezden gelmektedir. Uzun süre PCB'ye maruz kalmak kanser, üreme problemleri, bağışıklık sistemi ve tiroit bezlerini etkileyen diğer tıbbi durumlar gibi ciddi sağlık tehlikelerini içermektedir. Özellikle çocuklar PCB'nin sağlık etkilerine karşı daha korumasızdırlar.

Bu kimyasal yüksek derişimlerde hala Hudson nehri ve diğer bölgelerde pusuya yatmaktadır. PCB en çok Hudson nehrinin dibindeki sedimentlerde bulunmaktadır. Bu inatçı kimyasaldan kurtulmak için EPA nehrin dibini 280 km boyunca kazıyarak, 675 000 ton sedimenti taşımayı önermektedir; bu şartlarda nehirden 45 000 kg PCB temizlenmiş olacaktır. Bu plana karşı en büyük eleştiriler, bu operasyonun sedimenti karıştırarak suya daha fazla PCB salınımına sebep olacağı şeklindedir. Birçok insan kazımak yerine sedimenti yerinde bırakarak doğal akımlar ile dağılmasının ve aynı anda bakterileri kullanarak biyoremediyasyon yapmanın uzun dönemde PCB'yi düşürecek en iyi çözüm olduğunu düşünmektedir.

Hudson nehri sedimentlerinde PCB-parçalayan anaerob bakteriler keşfedilmiştir. Bazı anaerob bakteriler PCB'nin yıkımının ilk basamaklarında görev alarak klor ve hidrojen gruplarını koparabilmektedir. Daha sonra sudaki aerobik bakteriler PCB'yi modifiye eder ve diğerleri de klor, su ve karbondioksite çevirerek işlemi bitirebilir. Bazı tahminler kazıma yapıldığında bile balıklardaki PCB düzeyinin yenebilecek miktara gelmesi için 2070 yılına kadar beklenmesi gerektiğini göstermektedir. Kazıma planı iyi bir plan olsa bile, kazınan sedimentin nereye götürüleceği büyük bir problemdir. Bu kimyasallar nasıl temizlenecektir? Bazı kişiler PCB yüklü kapalı dolum bölgelerinin anaerobik şartlardan dolayı yıkım sürecini uzatacağına inanmaktadır. Bu kimyasallar nehir çamurunda doğal biyoremediyasyon ile yavaşça yıkılıp gitmeleri için bırakılmalı mıdır, yoksa insanoğlu doğanın temizleme çabalarına müdahale ederek hızlandırmaya mı çalışmalıdır? Harekete geçmenin veya hiçbir şey yapmamanın getiri ve götürüleri nelerdir?

Kararı siz verin.

garip dut"tur. Adını 50 yıl önce radyasyonla sterilize edilmesine rağmen bozulmuş bir et konservesinde ilk defa keşfedilmesiyle almıştır ve *Guinness Dünya Rekorları Kitabı*'na dünyanın en dayanıklı bakterisi olarak girmiştir. Daha sonra bilim insanları *D. radiodurans*'ın diğer organizmaların dayanabildiği radyasyon dozunun 3000 katına dayanabildiğini keşfetmişlerdir. Yüksek dozda radyasyon çift iplikçikli DNA'yı kırarak mutasyonlara sebep olabilir, buna rağmen *D. radiodurans* radyasyona inanılmaz bir dayanıklılık göstermektedir. Dayanıklılık mekanizmaları tamamen bilinmese de, bu mikroorganizmanın özenle tasarlanmış bir sistemle radyasyondan minimum zarar görecek şekilde genomunu katladığı ve alışılmışın dışında bir DNA tamir mekanizması ile genomunun zarar gören kısımlarını değiştirdiği gözlemlenmiştir.

DOE *D. radiodurans* ve başka bir bakteri olan *Desulfovibrio desulfuricans*'ın radyoaktif bölgelerde biyoremediyasyon için kullanılmasıyla yakından ilgilenmiştir. Kısa süre önce DOE ve Minnesota Üniversitesinden araştırıcılar *D. radiodurans*'ın promotör gen dizisiyle toluen metabolizmasında rol alan toluen dioksigenaz enzimini kodlayan genini birleştirerek bu mikrobun rekombinant bir suşunu elde etmişlerdir. Bu suş yüksek radyasyonlu ortamlarda tolueni parçalama yeteneğine sahiptir. Bilim insanları radyoaktif elementleri sabitlemede sürdürülen çalışmalarda aynı stratejiyi

kullanarak *D. radiodurans*'ı metal bağlayan genlerle donatmayı umut etmektedirler.

Son olarak, biyoayrıştırmayla ilgilenen bilim insanları yeni çıkan kimyasalların çevreyi nasıl kirletebileceği ve bu kirliliklerin nasıl temizleneceği ile ilgili sürekli bir arayış ve hazırlık içindedirler. Biyoremediyasyon bütün kirliliklerden kurtulmamızı sağlayamasa da, iyi planlanmış biyoremediyasyon yaklaşımları temizleme çalışmalarının önemli bir öğesidir.



KARİYER PROFİLİ

Doğrulama Teknisyeni

Biyoremediyasyon biyoteknolojinin nispeten yeni bir disiplinidir ve birçok küçük şirket alanın farklı kısımlarında hizmet vermektedir. Biyoremediyasyon mikrobiyolog, kimyacı, toprak bilimci, çevre bilimci, hidrolog ve mühendis gibi farklı bilim insanlarına ihtiyaç duyulan çok disiplinli bir endüstridir. Mikrobiyologlar ve moleküler biyologlar mikroorganizmaların kimyasalları yıkımlarını anlamak için el ele çalışıp beraber tasarımlar yapmalıdır. Biyologlar mühendislerle beraber çalışarak kirleticilerin arıtmasının en iyi yapılabileceği tesisleri tasarlamalı ve işletmelidir.

Biyoremediyasyonda giriş düzeyindeki pozisyonlardan biri doğrulama teknisyenliğidir. Doğrulama teknisyenleri EPA raporlarını doğrular. Bu pozisyon için EPA düzenlemeleri hakkında bilgi sahibi olmak, arazi sensörlerinden kirlenme verisi toplayabilmek (birçoğu uydular tarafından izlenebilir) ve bu verileri nasıl düzenleyebileceğine dair bilgi sahibi olmak gerekmektedir.

Veri tabanı ve uydu coğrafi bilgi sistemleri programlarına aşina olmak gibi bilgisayar yetenekleri bu meslek için gereklidir. Canlıları tanımak ve doğal yaşamla ilgili bilgi sahibi olmak da önemlidir. Giriş düzeyi pozisyondan başlayan bir doğrulama teknisyeni uygun eğitim ile danışmanlık pozisyonlarına kadar yükselebilir. Biyoremediyasyon mekanizmalarını tasarlayan genetik mühendisleri genellikle doktorasını bitirmiş araştırıcı bilim insanlarıdır, fakat doğrulama teknisyenleri tarafından toplanan verilere bağımlıdırlar.

BİR FARK YARATMAK

Güney Carolina Charleston taşrasında yer alan Hanahan'da, 1975 yılında yaklaşık 80 000 galon kerosen tabanlı jet yakıtı sızıntısı meydana geldi. Birçok temizleme çabasına rağmen sızıntı kumdan sızarak suya ulaştı. 10 yıl sonra sızıntı yerleşim bölgelerine kadar ulaşmıştı. Alanın büyüklüğü yüzünden kirlenen toprağın taşınması tekniği uygulanamazdı ve kirlenen yeraltı sularının uzaklaştırılması problemi çözmeyecekti. Amerikan Jeoloji Araştırmalarında (USGS) çalışan bilim insanları topraktaki toksik maddeleri yıkan özgün bir mikrop keşfettiler, ayrıca toprağa gübre eklenmesinin biyoayrışmayı dramatik bir şekilde arttırdığını buldular. Bu bölge dünyadaki ilk biyoremediyasyon bölgelerden biridir. USGS bilim insanları aynı anda yeraltı sularına bazı besinler ekleyerek, kirlenmiş suların bir kısmını uzaklaştırdılar. 1990 yılının başlarında yeraltı sularındaki kirlenme % 75 oranında düşürülmüştü ve biyoremediyasyon etkin bir temizleme stratejisi olarak potansiyelini göstermişti.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Biyoremediyasyon uygulamalarına özel üç örnek tanımlayınız. Tanımınızda işlemlerde yer alan organizmaları belirtiniz ve her uygulamanın olası avantaj ve dezavantajlarını tartışınız.
2. Biyoremediyasyon yapılacak kirlenmiş bölgeye gübre ve oksijen eklenmesinin amacı nedir?
3. Eskiden kimyasal çöplük olarak kullanılan ve biyoremediyasyonla temizlenen bir arsanın şimdi yeni konut gelişimi için önerilen bir yer olduğunu öğrendiğinizi varsayın. Eski biyoremediyasyon bölgesinde inşa edilen bir evde yaşamak ister misiniz? Bu senaryo ile ilgili olası problemleri düşününüz.
4. Kurşun doğada kolayca parçalanmayan çok zehirli bir metaldir. Kurşun pompalar, kurşun içeren boyalar, araba aküleri ve hatta kurşun balıkçılık olta ağırlıkları doğaya salman kurşunun olası kaynaklarıdır. Kurşunun parçalanmasında rol oynayabilen bakteriyi tanımlamak için bir strateji öneriniz.

5. Şehrinizin sizin mahallenizin yakınına kimyasal atık depolama binası inşa etmekle ilgilendiğini varsayın. Atık depolama, çöplük, çevresel kirlilik ile ilgili geçmiş başarısızlıklardan "çıkarılan dersleri" ve biyoremediyasyonun başarılı uygulamalarını dikkate alarak; yetkililerin binayı inşa etmeden önce düşünmeleri gereken önceliklerin ve eğer inşa edilip kullanılırsa çıkabilecek soruların listesini çıkartınız.
6. Rehber İnternet Sitesinde listelenen bazı web adreslerine giriniz. Bu siteleri doğada en yaygın bulunan atıklar hakkında bilgi toplamak için kullanınız. Beş atığın ismini ve nerede bulunduklarını, doğaya nasıl girdiklerini, kısa ve uzun vadede sağlığa etkilerini (insan ya da diğer organizmalar için), çevreye etkilerini ve bu atıkları parçalayabilecek mikroorganizma çeşitlerini listeleyiniz.
7. Rehber İnternet Sitesinde listelenen Scorecard web sitesine gidiniz. Scorecard ABD'nin bütün eyaletleri için kirlilik veri raporlarını sağlamaktadır. Kendi posta kodunuzu girerek yaşadığınız yere en yakın alanlara ait en son veri raporlarını gözden geçiriniz.
8. EPA Superfund sitesini ziyaret edin ve bölgenize ait çevre temizliği ihlalleri hakkındaki raporları araştırınız. Bu ihlallerden kim sorumludur? Eğer varsa ne kadar para cezası alınmıştır? Bölgeleri temizlemek için ne gibi çabalar planlanmıştır?
9. Kasım 2002'de *Prestige* adlı petrol tankeri ikiye bölündü ve İspanya'nın kuzey batı kıyıları açıklarında battı. En az 30 000 ton akaryakıt döküldü. Bu bölgede gerçekleştirilen biyoremediyasyon hakkında herhangi bir bilgi bulabilmek için internet araştırması yapınız.
10. Meksika Körfezi'ndeki *Deepwater Horizon* petrol sızıntısındaki biyoremediyasyonu gözlemleyen bilim insanları yakıtın mikrobiyal parçalanmasının büyük balık ölümlerine sebep olabilecek hipoksiya bölgelerine neden olabileceğinden endişe ettiler. Bu neden bir endişe olabilir? Görünüşe göre bu büyük bir problem olmadı. Bu tahminlerin neden yanlış olabileceği hakkında sebepler sununuz.
11. Biyoremediyasyon biyoteknolojinin hızla değişen diğer alanlarından birisidir. Google Scholar (http://scholar.google.com/) sayfasını ziyaret edin ve güncel yayınlar bulmak için *biyoremediyasyon* kelimesini kullanarak araştırma yapınız (ya da biyoremediyasyonda *fitoremediyasyon* gibi özel bir konu araştırınız).
12. 2010 yılı sonlarında *Science* dergisinde arseniği metabolize eden ve arseniği kendi DNA'sma ekleyen bir mikroorganizmayı anlatan bir makale yayınlandı. Çoğu bilim insanı bu çalışmaya şüpheci ve eleştirici yaklaştı. Bu çalışmaya ait en son görüşleri içeren makaleleri araştırınız.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

10

Akuatik Biyoteknoloji

Çevirenler: Deniz EKİNCİ, Mehmet YAZICIOĞLU

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Su kültürü ve aynı zamanda yaygın olarak kullanılan balık yetiştiriciliği uygulamalarının önemli amaçlarını ve faydalarını tartışabilmeli ve balık yetiştiriciliğinin dünya çapındaki etkisini algılayabilmelisiniz.
- Su ürünleri yetiştiriciliğiyle ilgili anlaşmazlıkları tartışabilmeli ve sınırlamaları tanımlayabilmelisiniz.
- Akuatik türlerden elde edilen yeni genlerin biyoteknoloji endüstrisi için nasıl yararlı olabileceğini anlayabilmelisiniz.
- Transgenik balıklara ve kullanımlarına örnekler verebilmelisiniz.
- Triploid türlerin nasıl oluşturulduğunu tartışabilmelisiniz.
- Bilim insanlarının dünya çapında neden aktif bir biçimde akuatik organizmaları araştırdığını açıklayabilmelisiniz.
- Akuatik biyoteknolojinin tıbbi ve tıbbi olmayan ürün ve uygulamalarına örnekler verebilmelisiniz.
- Biyofilmlemeyi tanımlayabilmeli ve bilim insanlarının, biyofilmlemeyi asgariye indirmenin doğal bir yolu olarak, deniz canlılarına nasıl baktığını açıklayabilmelisiniz
- Deniz organizmalarının biyolojik tespitte ve çevresel atıkların iyileştirilmesinde nasıl kullanılabileceğini açıklayabilmelisiniz.



At nalı yengeci (*Limulus polyphemus*) gıdalar ve tıbbi ürünlerin zararlı maddeler içermediğini göstermede kullanılan önemli bir test için kan hücresi kaynağıdır.

Suyun dünyanın yaklaşık % 75'ini kapladığı düşünüldüğünde, sucul ortamların biyoteknolojik uygulamalar ve çeşitli sorunlara olası çözümler için zengin bir kaynak olması şaşırtıcı değildir. Suda yaşayan organizmalar soğuk kutup denizleri, derinliklerdeki olağanüstü yüksek basınçlar, yüksek tuzluluk, aşırı derecede sıcaklıklar ve düşük ışık koşulları gibi çeşitli uç koşullarda varlıklarını sürdürebilirler. Sonuç olarak, akuatik organizmalar çok sayıda metabolik yollara, üreme mekanizmalarına ve duyusal adaptasyonlara sahip olacak şekilde evrimleşmiştir. Bu canlılar eşsiz genetik bilgi ve potansiyel uygulamalar yönünden oldukça zengindir. Bu bölümde biyoteknolojik uygulamalarda hem deniz hem de tatlı su canlılarının nasıl kullanılabileceğini keşfederek, **akuatik biyoteknoloji**nin büyüleyici yönlerini ele alacağız.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Akuatik biyoteknoloji için geleceğe yönelik pek çok ilgi uyandırıcı potansiyel alan bulunmaktadır. Bu süreçteki en olası alanlar arasında, ticari değeri olabilecek keşfedilmemiş sucul türleri bulmadaki küresel biyoaraştırma çabaları olacaktır. Dünya okyanusları gibi sucul ortamlar biyolojik çeşitlilik açısından üst seviyede zengin kaynaklardır; çoğu deniz canlısı hayatta kalmak için yüksek basınç, sıcaklık, tuzluluk ve diğer çevresel koşullarla başa çıkmak durumundadır. Bu nedenle ticari değeri olan yeni proteinler ve diğer biyoaktif bileşikler bulmak için mevcut potansiyel çok yüksektir. Örneğin, buzullarda, bunların altındaki sularda ve toprakta Arktik organizmaların yeni özelliklerinden faydalanmayı umarak, yalnızca Arktik'te, 40'tan fazla şirket biyolojik araştırma yapmaktadır. Özellikle genetiği değiştirilmiş türlerle ilgili çalışan akuakültür, ülkelerin nüfusları için proteince zengin gıda kaynakları bulmaya çalıştıkça ve dünyanın balık ve kabuklu deniz hayvan türlerinin olmadığı veya aşırı avlandığı alanlarında akuatik biyoteknolojinin hızla gelişen bir alanı olmaya devam edecektir.

10.1 Akuatik Biyoteknolojiye Giriş

Okyanuslar binlerce yıldır gıda ve doğal kaynaklar için bir kaynak olmuştur. Ancak, birçok tür için baskı oluşturan ve okyanus kaynaklarını zor duruma sokmuş olan insan nüfusundaki artış, balık ve diğer deniz türlerinin aşırı avlanması ve çevre koşullarının kötüleşmesi gibi etmenler bazı yerlerde balıkçılığın bitmesine neden olmuştur. Bilim insanlarının okyanus biyolojisi hakkında çok şey öğrenmiş olmalarına rağmen çoğu deniz canlısının – özellikle de mikroorganizmaların – hala tanımlanması gerekmektedir. Dünyadaki organizmaların % 80'inden fazlasının sucul ekosistemlerde yaşadığı tahmin edilmektedir.

Artan nüfus, insani tıbbi ihtiyaçlar ve gezegenimiz hakkmdaki çevresel kaygılarla birlikte dünya yüzeyinin büyük miktarının potansiyel zenginliğinden faydalanmaya olan açık ihtiyaç, akuatik bilimi biyoteknolojik araştırmalar için ortaya çıkan öncelikli bir keşif sahası yapmaktadır. Sucul ekosistemler çeşitli küresel sorunlara yönelik çözümler içeriyor olabilir. ABD'de yıllık 50 milyon dolardan daha az bir bütçe akuatik biyoteknolojik araştırma ve geliştirme için ayrılmaktadır. Buna karşılık, bu değer Japonya'da yıllık 900 milyon ile 1 milyar dolar arasındadır. Akuatik biyoteknolojide temel bilimler üzerine araştırmalara yatırım yapan Asya ülkelerinin başarısı ve nihai ürünlerin parasal değeri diğer ülkeleri akuakültür konusunda önemli miktarda zaman ve kaynak ayırmaya teşvik etmiştir.

ABD'de aquatik canlılardan sınırsız faydalanma imkânlarını keşfetmek için çeşitli araştırma öncelikleri tespit edilmiştir. Bunlar aşağıdaki gibidir:

- Dünyadaki gıda arzını artırmak
- Deniz ekosistemlerinin restorasyon ve korunması
- İnsan sağlığı ve tıbbi tedaviler için yeni bileşiklerin tanımlanması
- Deniz ürünlerinin güvenlik ve kalitesini arttırmak
- Kimya endüstrisinde uygulamaları olan yeni ürünleri keşfetmek ve geliştirmek
- Hastalık görüntüleme ve tedavisinde yeni yaklaşımlar aramak
- Dünya okyanuslarındaki biyolojik ve jeokimyasal süreçler hakkında bilgileri artırmak

Balık yetiştiriciliğinden, deniz canlılarından, yeni medikal ürünlerin izolasyonuna kadar, akuatik biyoteknolojinin değişik yönleri bu bölümde değineceğimiz konular arasındadır. Bir sonraki altbaşlıkta akuatik biyoteknolojinin geniş ve hızlı büyüyen bir uygulaması olan akuakültürden bahsedilecektir.

10.2 Akuakültür: Dünya Gıda Arzının Biyoteknolojiyle Artırılması

İki balıkçı insanların tüketimi için ideal ölçülerde ve sağlıkta olan kedi balıklarıyla dolu bir ağı çeker. Ağdaki her balık bir koruyucudur. Pazara hazırlandığında bu kedi balıkları yüksek oranda istenen uygunluk, koku, renk ve tada sahip olacaklardır. Bu senaryo balık yetiştirme havuzu veya ticari balık avlama botunda söz konusu olmaz; bunun yerine balıkçıların balık



ŞEKİL 10.1 Pazara Hazır, Bir Ağ Dolusu Çiftlik Üretimi Kedi Balığı Akuakültür oldukça kısa bir zamanda pazar tüketimine hazır, büyük miktarlarda balık veya kabuklu canlıları yetiştirmek için etkili bir yoldur. Burada gösterilen kedi balıkları pazar ölçülerindedir, diğer kedi balıklarına kıyasla önemli ölçüde daha hızlı büyür ve ABD Tarım Bakanlığı (USDA) tarafından 103 olarak adlandırılmıştır.

yetiştirme tankından ağlarını boşaltmalarını tarif eder (**Şekil 10.1**). Balık ve kabuklu deniz hayvanları gibi sucul hayvanların ve sucul bitkilerin eğlence veya ticari amaçlarla üretilmesine **akuakültür (su kültürü)** denir. Özel olarak denizlerde yapılan su kültürüne **deniz kültürü (marikültür)** denir. Akuakültür tarımsal biyoteknolojinin bir çeşidi sayılabilmesine rağmen, tipik olarak akuatik biyoteknolojinin bir çeşidi olarak kabul edilir. Bu kısımda öncelikle hem deniz hem de tatlı su balıklarını ve kabuklu hayvan türlerini işleyeceğiz.

Akuakültür Ekonomisi

6.9 milyar olan küresel nüfusun 2050 yılına kadar 9.3 milyara yükseleceği öngörülmektedir. Yüksek yaşam standartları olan insanlar daha çok et ve balık yeme eğilimine sahiptir. Dünya genelinde akuakültür ürünlerine olan talebin gelecek 30 yılda % 70 artması bekleniyor. Aslında, yakın bir gelecekte tüm deniz ürünlerine olan talebin doğal kaynakların sağlayabildiği ortalama 50-80 milyon tonu aşacağı hesaplanmıştır. Aşırı avlanma, habitatın tükenmesi, darboğazda olan ticari avlanma endüstrileri gibi etkenler doğal deniz ürünleri hammaddelerinin üretiminin azalmasına neden olmaktadır. Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Örgütü'ne (FAO) göre; balık stoklarının ortalama yarısının tamamen kullanıldığı ve diğer % 30'unun ise aşırı istismar edildiği, tüketildiği veya iyileşme sürecinde olduğu kabul edilmektedir. Eğer talep artmaya devam ederse ve doğal avlanma sahaları azalırsa, tüketilebilir balık ve kabuklu hayvanlar açısından eksiklik yaşayacağız. Daha iyi kaynak yönetimi uygulamalarıyla birlikte, akuakültür kısmen bu problemin üstesinden gelecektir.

2000 yılında dünya genelinde akuakültür üretimi 1984'e göre iki kattan daha fazla ve yaklaşık 33 milyon ton kadardı. En son tahminlere göre dünya çapında insanların tükettiği tüm balıkların %50'sine yakını akuakültürle üretilmektedir ve ileride yetiştirilen balıklar gıda olarak üretilen sığır eti tüketimini geçecektir. Geleneksel ticari balık avcılığı teknikleriyle yakalanan balık pazarı her yıl için yaklaşık 92 milyon tondur. Avlanma ve su ürünleri yetiştiriciliğinden oluşan, tüm dünyadaki toplam balıkçılık ürünleri şimdilerde yıllık 125 milyon tondan fazladır. Bazı kaynaklara göre gıda üretim miktarı açısından akuakültür sığır çiftliklerini çoktan geçmiştir. Binlerce yıldır akuakültür çalışılan Çin'in dünyanın deniz ürünleri temininde ortalama üçte ikisini sağladığı düşünülürse, tek başına en büyük üretici konumundadır ve bunun çoğunluğu akuakültür temelli üretimdir.

ABD'de akuakültür bir yılda 1 milyar dolardan daha fazla kar ettiren bir endüstridir ve dünyanın deniz ürünleri temininde yalnızca % 5 civarında bir katkısı vardır. Bu ülkede akuakültür üretimi son 10 yılda neredeyse iki kat artmıştır ve 100'den fazla farklı sucul bitki ve hayvan üretilmektedir. Bu büyümenin devam edeceği ve benzer şekilde küresel olarak da akuakültürün gelişeceği beklenmektedir. Örneğin, son yirmi yılda balık çiftliklerinde üretilen somonlarla birlikte, yaklaşık 50 kat artışla dünyada satılan somon balıklarının yarısından fazlası akuakültürle üretilmektedir. ABD'de akuakültür, Güneydoğu eyaletlerinde 1950'lerde kedibalığı yetiştiriciliğine başlanmasıyla birlikte, temel bir

endüstri haline gelmiştir; bugün her eyalette akuakültür tesisleri bulunmaktadır. Alabama ve Mississippi Deltası'nda kedi balığı üretimi, Maine ve Washington'da somon yetiştiriciliği, Idaho ve Batı Virjinya'da alabalık üretimi ile Louisiana'da kerevit üretimi ABD akuakültür sektör potansiyelinin en başarılı örneklerinden bazılarıdır. Benzer şekilde Florida, Massachusetts ve diğer eyaletler ticari avcılığın zorluklarının üstesinden gelmek için kabuklu deniz canlıları üretimine başarıyla girmişlerdir. Örneğin, Massachusetts akuakültür endüstrisinin yaklaşık % 75'ini barındıran Cape Cod, deniz tarağı, yumuşak kabuklu midye, mavi midye ve istiridye gibi bir dizi kabuklu canlıları yetiştirmeyi başarmıştır.

Diğer pek çok ülke aktif bir şekilde akuakültür uygulamalarına girişmiştir. ABD toplam akuakültür üretiminde 13. sırada yer almaktadır. Dünyanın lider üreticisi olan Çin'i Hindistan, Vietnam, Endonezya, Tayland, Bangladeş, Norveç, Şili, Filipinler, Japonya, Mısır ve Myanmar izlemektedir. Yunanistan Avrupa'nın akuakültür üretiminin % 90'ına denk gelen yıllık 100 000 ton deniz levreği üretimiyle ilk sıradadır. Norveç somon üretiminde dünya lideridir. Kanada yıllık hasat değeri yaklaşık 450 milyon dolar olan 70 000 tondan fazla Atlantik ve Pasifik somonu üretmektedir. Şili'nin akuakültür endüstrisinin hızlı büyümesi ve başarısı diğer ülkeleri şu soruyla yüzleştirmiştir, "Eğer Şili yapabiliyorsa, biz neden yapamayalım?". Bunun sonucunda Cezayir, Arjantin, İskoçya, İzlanda, Faroe Adaları, İrlanda, Rusya, Endonezya, Yeni Zelanda, Ekvador, Kolombiya, Peru ve diğer pek çok ülkede pazarlar giderek büyümektedir.

Gelişen akuakültür endüstrileriyle en aktif şekilde ilgilenen ülkelerin bu yolu tercih etmelerinin nedeni, yerel sularda aşırı avlanmayla balık ve diğer kabuklu canlıların doğal stoklarının tükenmesiyle karşılaşmalarıdır. Akuakültür sayesinde doğal kaynakların bittiği yerlerde pazarlar kurulabilir. Akuakültür coğrafi konum olarak normalde balıkçılığa uygun olmayan yerlerde deniz ürünleri endüstrisi kurmanın yararlarını da beraberinde getirir. Örneğin, başarılı bir balık yetiştiriciliği endüstrisi Arizona çöllerinde geliştirilmiştir ve akuakültür geri dönüşüm suları ise tahıl tarlalarını sulamak için kullanılmaktadır. Balıklar sulama kanallarında bile yetiştirilebilmektedir. Avusturalya'nın çorak topraklarında da benzer çalışmalar sürdürülmektedir.

Teorik olarak, balık yetiştiriciliğindeki üretkenliğin artışı müşteriler için perakende fiyatların düşüşüyle sonuçlanmalıdır. Bazı açılardan balık çiftlikleri hayvan yetiştirmekten veya ticari balıkçılıktan daha ekonomiktir. Örneğin, 1 pound (453.59 g) sığır eti için yaklaşık 7 pound (3.18 kg) tahıl gerekir, fakat 2 pound (907.18 g) balık eti için yaklaşık 1 pound (453.59 g) herhangi bir balık gerekir. Diğer bir örnek olarak, çiftlikte büyütül-



TİCARET ARAÇLARI

Balık Genlerinin Peşinde

İstenilen gıda kaynakları niteliğinde, ticari olarak değerli pek çok farklı balık türünün genomlarını anlamaya yönelik çalışmalar sürmektedir. Ton balığından somona ve çeşitli kabuklu deniz canlılarına kadar, bilim insanları büyüme değerleri, tat, renk ve hastalıklara dayanıklılık gibi özellikleri belirleyen genleri tanımlamaya çalışmaktadır. Seleksiyon ıslahı yaklaşımları, istenen özellikte balık üretiminde oldukça gözdedir. Fakat moleküler biyoloji teknikleri, bilim insanlarının transgenik balık ve diğer kabukluları üretmede ve deniz ürünleri sevenler için zenginleştirilmiş özellikleri olan çok çekici özel türlerin geliştirilmesinde kullanacakları, belli genleri tanımlamada araç olarak kullanılmaktadır. Bilim insanları bu genleri nasıl "avlamaktadır"? Bazı durumlarda, tüm genomu dizileme çalışmaları yürütülmektedir, fakat daha yaygın bir yaklaşım olarak **farklılık gösterimli PCR** adı verilen bir teknik kullanılmaktadır.

Bu teknik iki farklı doku örneğinden veya organizmadan elde edilmiş DNA veya RNA'nın, genomdaki bir diziye rastgele bağlanan primerler kullanılarak karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Bu sayede bilim insanlarının, "farklı" ekspresyon seviyesine sahip yani bir dokuda veya organizmada üretilip diğerinde üretilmeyen gen kategorilerini tanımlaması mümkün olur. Örneğin, bilim insanlarının karideste hızlı büyümede etkili olabilecek genleri tanımlamaya çalıştığını varsayınız. Daha büyük karideslerin farklı genleri içerdiği veya büyüme oranıyla ilişkili bir veya daha fazla genin ekspresyon düzeylerinin daha fazla olduğu hipotezini kurabilmelisiniz. Bu genleri keşfetmek için küçük ve büyük karideslerden mRNA izole edilir, RNA komplementer DNA (cDNA)'ya çevrilir ve daha sonra farklılık gösterimli PCR'da çoğaltılır. Bu PCR ürünleri jel elektroforeziyle ayrılır. Eğer büyük karideslerde hızlı büyümeyle ilgili özgün genlere ait mRNA'lar ekspresyona uğramışsa, bu genler için PCR ürünleri büyük karides örneklerinde belirlenir fakat küçük karideslerde belirlenemez. Daha sonra bilim insanları hangi genleri tanımladıklarını anlamaları için bu PCR ürünlerinin DNA dizisini belirleyebilir. Bu genlerin bazıları daha sonra büyüme yetenekleri geliştirilmiş transgenik hayvanlar oluşturmada kullanılabilir.

Bu yöntem pek çok araştırma sahasında moleküler biyologlar arasında kullanılmaktadır. Örneğin, kanser araştırıcıları bu yaklaşımı normal hücrelerde ekspresyona uğrayan fakat kanser hücrelerinde uğramayan genleri belirlemede kullanır.

müş kedi balıkları doğal ortamda yetişenlerden % 20 daha hızlı büyür ve ortalama 2 yılda pazarda satış için hazır hale gelirler. Genetiği mühendisliği ürünü yemle pound başına 10 sent maliyetle beslenen balık türlerinde, yetiştirilen balıkta geri kazanım genelde pound başına 70 ila 80 sent kadardır ve oldukça iyi bir yatırım olarak görülmektedir. Fakat bu bölümde öğreneceğiniz gibi, akuakültür ekonomik olarak her zaman avantajlı değildir.

Dünya çapında akuakültürdeki artış devam etmesine rağmen, balık yetiştiriciliği yakın bir zamanda doğal kaynakların yerini tamamen alacak gibi gözükmemektedir. Bunun bir nedeni, pek çok türün balık yetiştiriciliği için uyumlu olmamasıdır. Çünkü ton balığı ve kılıç balığı gibi açık sularda gezinen türler için geniş miktarda su ve bolca besin gerektiğinden balık çiftliklerinde yetiştirilemezler. Akuakültürün önündeki diğer engelleri bu bölümde ileride tartışacağız. Bu kısımda istatistiklerin verilmesinin amacı akuakültürün mevcut değeri, önemi ve gelecekteki potansiyeliyle ilgili bir bakış açısı kazandırmaktır.

Balık Yetiştiriciliği Uygulamaları

Pek çok açıdan akuakültür on yıllardır uygulanan konvansiyonel toprak temelli tarımsal tekniklerin bir uzantısıdır. Fakat insan tüketimine yönelik canlıların kültürünün yapılması akuakültürün hedeflerinden sadece bir tanesidir. Akuatik organizmalar ticari ve eğlence amaçlı, olta yemi sağlamak gibi diğer pek çok nedenle de yetiştirilirler. Hamsi, ringa balığı, sardalya gibi küçük balıklar balık yemi olarak ve kümes hayvanları, sığır, domuz gibi hayvanların yemleri için yağ olarak kullanılır. İnci üretmek, farmasötik maddeler izole etmek için bazı türleri kültüre almak, japon balığı ve nadir tropikal balıklar gibi süs balıkları yetiştirmek ve havuzlar gibi çevre düzenlemesinde kullanmak için balık yetiştirmek akuakültürün pek çok uygulamalarından bazılarıdır.

Örneğin, New Jersey'de balıkçılıkla uğraşan biyologlar alabalıklar için "koy ve al" sistemi oluşturmak için üretme çiftliklerinde alabalık ıslah etmektedirler. Her ilkbaharda eyaletler akarsu, dere, göl ve göletlere üremeleri için 700 000'den fazla gökkuşağı alabalığı, kahverengi alabalık ve dere alabalığı salar. Pek çok akarsu ve dere yılboyunca alabalığını muhafaza edemez, çünkü buralardaki su ya yazın çok sıcak olmakta veya alabalıklar için suyun kalitesi çok kötüdür. Fakat buralara salınan ("koy") balıklar oltacılara yakaladıklarını ("al") akşam yemeği için kullanma olanağı verir. Diğer birçok eyalette de benzer şekilde tava balığı, levrek, kedi balığı, turna balığı ve hibrit çizgili levrek (tatlısu beyaz levreği ile tuzlusu çizgili levreği melezi) gibi sıcak- ve soğuk-su balıklarının üreme alanlarına salındığı programlar uygulanmaktadır. Bu tip programlar ayrıca, kırsal alanlarda balık yakalama olanağı olmayan, şehirlerde yaşayan insanlar için oltayla balık yakalama fırsatları sunmaktadır.

Tablo 10.1'de gösterildiği gibi, birçok balık ve deniz canlısı başarıyla kültüre alınmıştır. Pek çok ülkede bu liste yakında daha da uzayacaktır. Örneğin, ıstakoz ve yengeç gibi deniz türleri şimdilik kısıtlı miktarda üretilmekte, henüz geniş çapta ticari olarak erişilebilir değildir.

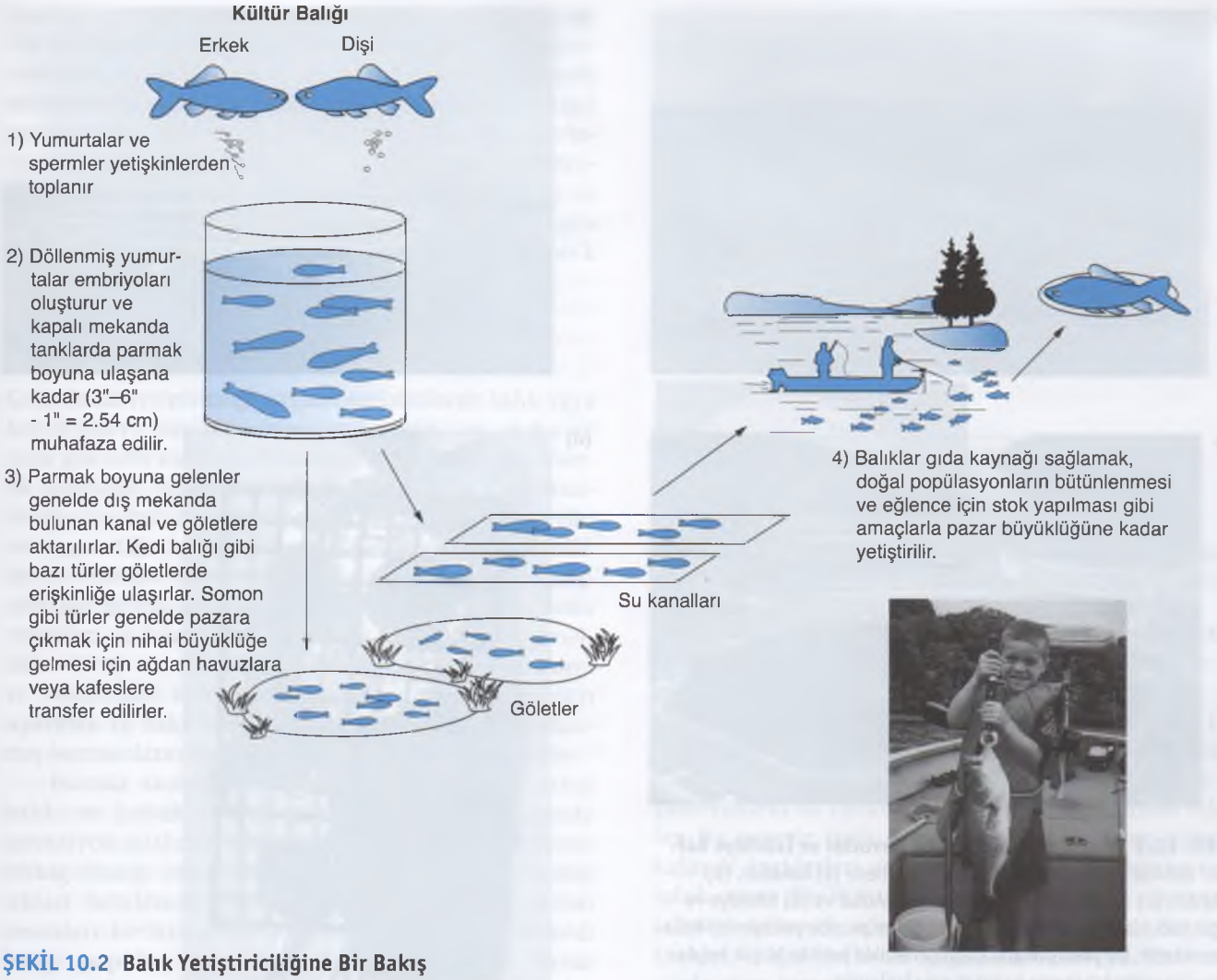
Akuakültür uygulamaları yetiştirilen türler, türlerin hayat döngüleri, büyüme için çevresel gereksinmeler ve pazara çıkmak için gerekli olgunluğa ulaşması için gerekli zaman uzunluğu gibi faktörlere bağlı olarak çeşitlilik gösterir. Somon ve alabalık gibi balıklar için yumurta ve spermler olgun balıkların üretken stoklarlarından alınarak elle işlenir. Üretilen balığın kalite ve sağlığını kontrol etmeye yönelik bir girişimde, üretici stoklar için kullanılan ebeveynler genelde istenen büyüme özellikleri ve fiziksel görünümü sağlayan balıklardan olmuştur (**Şekil 10.2**). Balık büyüme miktarı, sağlığı, kalitesi ve etin rengi ıslah edilecek balığın seçiminde dikkate alınan pek çok özellikten bazılarıdır.

Yumurtalar küçük tank veya konteynırlarda döllenirler ve çıkan embriyolar – yavru balıklar (fry) –

TABLO 10.1 ABD'DE ÖNEMLİ AKUAKÜLTÜR CANLILARI

Tatlısu Canlıları*	Deniz Canlıları*
Kedi balığı	İstiridye
Kerevit	Midye (sert ve yumuşak kabuklu)
Alabalık	Deniz karidesi
Atlantik somonu	Yassı balık (kalkan, dil balığı)
Pasifik somonu	Deniz levreği
Yem balığı (sazan yavrusu, tekir balığı, sardalya)	Karakabuk midyesi
Tilapia	Deniz kulağı
Hibrit çizgili levrek	Deniz tarağı
Mersin balığı	
Sazan (gümüş, ot)	
Sarıkuyruk	
Çipura	
Japon balığı	

*Türler yaklaşık metrik ton toplam üretim miktarlarına göre en yüksekten en düşüğe olmak üzere sıralanmıştır. Tatlısu organizmalarının üretimi tuzlusu organizmalarından yüksektir; bu nedenle türlerin aynı satırda yer alması eşit üretim miktarlarına sahip oldukları anlamına gelmez.

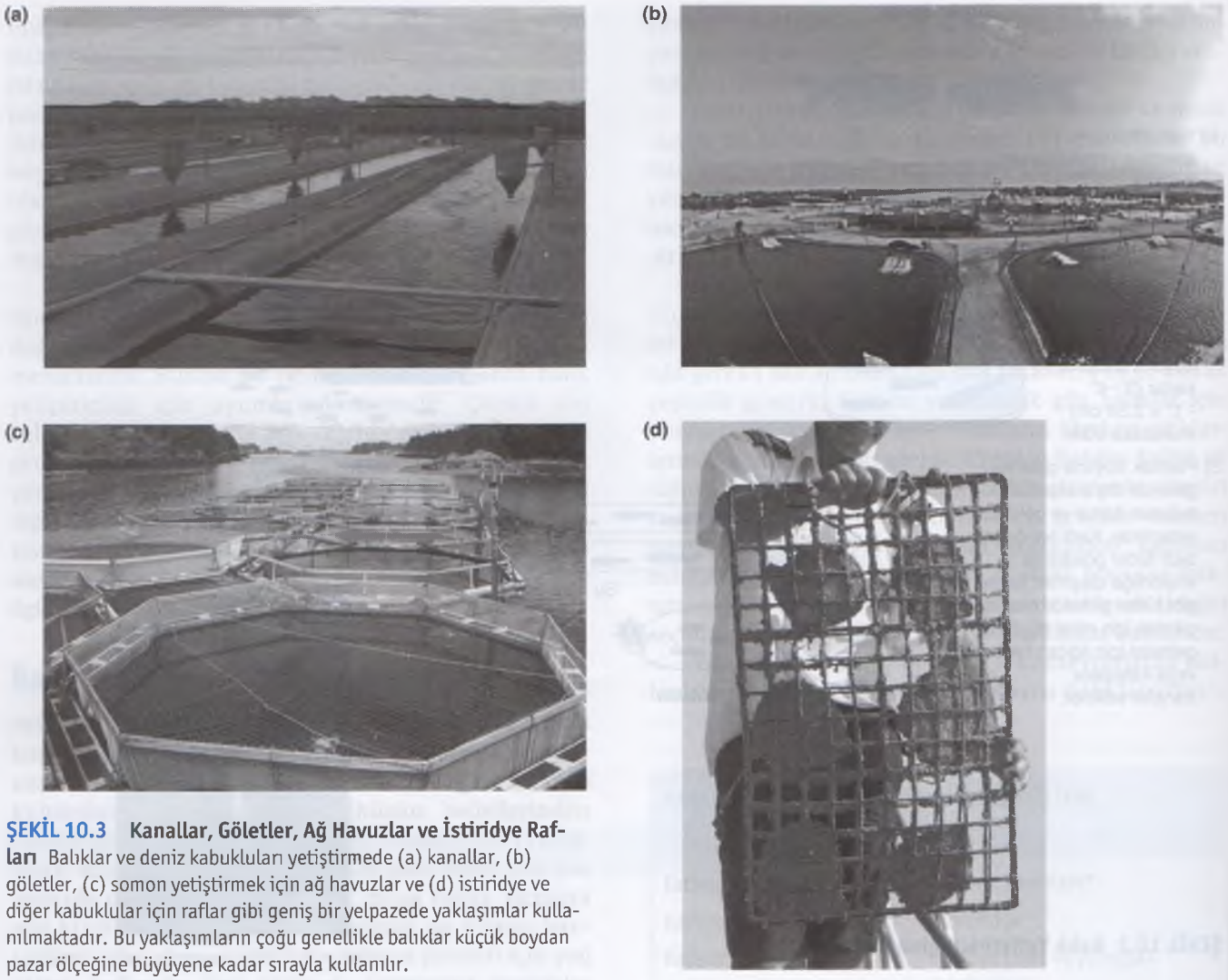


ŞEKİL 10.2 Balık Yetiştiriciliğine Bir Bakış

daha sonra akıntılı suya sahip daha geniş bir akvaryuma aktarılırlar. Bu tip kültüre alma çoğunlukla kapalı "üretme havuzlarında" başlatılır. Balıklar tipik olarak *parmakboy* (bir insan parmağı) oldukları zaman havuzdan ayrılırlar. Yavru balıklar, bazen *smolt* olarak isimlendirilir, genellikle kapalı ortamda veya açık havadaki *ark* adı verilen beton kanallara aktarılırlar (**Şekil 10.3**). Arklar genellikle birbiriyle bağlantılı bir seri tank olarak tasarlanırlar ve bu sayede suyun tanklardan sürekli akışı sağlanmış olur. Bu özellikle akıntı ve nehirlerde hayatta kalmak için su akımına karşı yüzmeye alışık somon ve alabalıklar için önemlidir. Su ürünleri yetiştiricileri çevresel koşulları uyarlayarak bu türler için kaslılık ve hayatta kalma becerilerini artırmak gibi doğal balıklara benzer fiziksel özellikler geliştirmelerini sağlamaya çalışmaktadır.

Bazı balık türleri pazar boyutuna ulaşana değin arklarda büyütülür veya toplamadan önce daha ileri bir büyüklüğe gelmesi için sığ göletlere transfer edilebilir. Somon gibi belirli türler uygun bir büyüklüğe geldikten sonra olgunluğa kadar göllerde, göletlerde veya koylarda ağ havuzlara, kafeslere ve çevrili alanlara alınabilir. Kabuklu yetiştiricileri, genelde çok sayıda minik olgunlaşmamış ve raflara yapışan midye ve istiridye gibi kabuklularla doldurulmuş raf veya kafes sistemleriyle çalışırlar. Raflar daha sonra nehir ağzına yerleştirilir ve bu sayede kabuklu canlılar doğal deniz koşullarında olgunluğa kadar büyüyebilir. Tipik olarak böyle raflar doğal habitata oranla daha fazla kabuklu deniz canlıları üretimini sağlar. Çoğu su ürünleri yetiştiricisi belirli bir bölgedeki türlerde verimi artırmak için ve masrafın kâra olan oranını enaza indirmek için sürekli kültür tekniklerini geliştirmektedir.

Somon çiftlikleri balık yetiştiriciliği uygulamalarına mükemmel bir örnektir. Hızlı büyümesi için beslenen olgun bireylerden sağlan yumurta ve sperm fertilizasyon (dölleme) için kullanılır ve oluşan embriyolar 12 ilâ 18 ayda parmakboya gelene kadar tanklarda büyütülür. Parmak boyuna gelenler genellikle denizlerde veya körfezlerde sahil şeridine yakın tel



ŞEKİL 10.3 Kanallar, Göletler, Ağ Havuzlar ve İstiridye Rafları Balıklar ve deniz kabukluları yetiştirmede (a) kanallar, (b) göletler, (c) somon yetiştirmek için ağ havuzlar ve (d) istiridye ve diğer kabuklular için raflar gibi geniş bir yelpazede yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bu yaklaşımların çoğu genellikle balıklar küçük boydan pazar ölçeğine büyüyene kadar sırayla kullanılır.

örgülü ağlara transfer edilir. Bu süreç boyunca somonların gıdası genellikle temelde ringa balığı, hamsi, balık yağı, diğer hayvan ve kümes kökenli ürünlerin (kemik, artık et ve benzeri) çökeleklerinden oluşur. Gıdalar ayrıca antibiyotikler ve somon etini pembe yapmak için ilave boyalar içerebilir ve balıklar parazitleri uzaklaştırmak için pestisit banyosuna yerleştirilebilir. Kültür işlemi boyunca, su ürünleri yetiştiricileri bitkisel temelli gıdaları balık ürünleri türevli gıdalara karşı deneyerek çiftlikte yetiştirilen türlerin tadını değiştirebilirler. En son olarak uygun boyutta kusursuz balıklar pazara çıkmak için paketlenir. Şekil 10.2 balık yetiştiriciliğine genel bir bakış sunmaktadır.

Balık yetiştiriciliğinde yenilikler

Balık yetiştirmede pek çok yenilikçi yaklaşım gelişme sürecindedir. Örneğin, Batı Virginia'da balıkçı biyologlar dağlık alanlardaki terk edilmiş kömür madenlerinin bolluğundan yararlanmaktadırlar. Dağlardaki soğuk yeraltı suları ve tatlısu derelerindeki sular madenlere sızar ve onları doldurarak gökkuşağı ve alp alabalığı gibi soğuk suyu seven türleri yetiştirmek için yüksek kaliteli ortamlar sağlanır. Bu yaklaşım hiçbir işe yaramayan terk edilmiş madenler için önemli bir kullanım alanı sağlamaktadır.

Bazı firmalar aynı kontrollü ortamda birden fazla türün yetiştirildiği ve entegre kültür olarak da isimlendirilen **polikültür (çoklu kültür)** çalışmaktadır. Farklı besin ihtiyaçları ve beslenme alışkanlıkları olan türleri yetiştirmek su kaynaklarını en iyi şekilde kullanmanın bir yoludur. Polikültür aynı kültüre alınan farklı balık türlerini içerebilir, hayvan-bitki çoklu kültürü şeklinde olabildiği gibi balık ve kabuklu canlılar da beraber yetiştirilebilir. Örneğin marul gibi bir bitkinin varlığında sazan balığı yetiştirmek etkili bir yaklaşımdır. Marul kökleri besinleri ve balık artığı maddeleri (azot gibi) sudan absorbe eder ve büyüme için gübre olarak kullanır. Yapay filtrelemenin ve atık

uzaklaştırmanın maliyetini en aza indirerek, polikültür çevreye boşaltılacak atık su miktarını sınırlandırmaktadır. Diğer bir akuakültür yaklaşımı **hidroponik sistemlerin** kullanılmasını kapsar. Bu sistemler balık tanklarından gelen kirli suyun aktığı raflarda sebzelerin (domates ve brokoli gibi) ve şifalı bitkilerin (reyhan ve fesleğen) kültüre alındığı, küçük hacimli su akışlı sistemlerdir. Kedibalığı, sazan ve tilapia gibi balıklar büyütüleceği zaman polikültür ve hidroponik sistemler sıklıkla beraber kullanılırlar (**Şekil 10.4**).

Akuakültür İçin Tür Geliştirme

Çoğu balık yetiştiriciliği girişimi yetiştirilecek balık veya kabukluların büyüme oranı, yağ içeriği, tat, doku ve renk gibi belli kalite özelliklerinin geliştirilmesine yönelik tasarlanır. Altbölüm 10.3'de göreceğimiz gibi, akuakültür için özel ırk geliştirmede kullanılan bazı stratejiler balık genetiğinde moleküler değişiklikleri içermektedir. Bilim insanları balıkların çoğalması, büyümesi ve gelişmesi için gerekli gen ekspresyon mekanizmalarını; doku örnekleri ve hücrelerin çok düşük sıcaklıklarda (genellikle –20°C ve –50°C arasında) **kriyoprezervasyonu** ve saklanması için gerekli teknikleri; yumurtalamayı uyarmak ve balık büyümesini ilerletmek için tasarlanmış hormonların iletim sistemlerini araştırmaktadırlar.

Burada akuakültür için istenen özelliklere sahip balık ve kabuklu canlı türlerinin geliştirilmesinde seleksiyon ıslahının nasıl kullanılabileceğini gösteren birkaç örneği inceleyeceğiz. İstenen özelliklere sahip ırkları belirlemek için balık yetiştiricileri ve bilim insanları birlikte çalışmaktadırlar. Örneğin, bir kedi balığı popülasyonunda bütün bireyler aynı hızda büyümezler veya kas kütlesinin vücuttaki yağ yüzdesine oranı gibi aynı vücut özelliklerine sahip olmazlar. Bilim insanları hızlı büyüme miktarı ve ağır kas kütlesine sahip balıkları tanımlamada bir takım teknikler kullanabilmektedir. Fileto verimini hesaplamada kullanılan kas kütlesini ölçmek için ultrason makinelerini kullanabilirler. En yüksek verimi gösteren balıklar, daha sonra yüksek kas kütlesine sahip yeni generasyonların üretilmesi için, ıslah edilirler.

ABD Tarım Bakanlığı Mississippi Kedi Balığı Genetik Araştırmaları Birimi'ndeki bilim insanları, göletlerde % 10-20 daha hızlı büyüyen ve oluşumundan pazara çıkana kadar 18-24 ay arası zaman gerektiren USDA 103 (devletin geliştirdiği balığa lâyık bir isim!) adı verilen bir çeşit kedi balığını seleksiyonla ıslah etmişlerdir (bakınız Şekil 10.1). Bazı USDA 103 kedi balıklarının eşeysel olgunluğa diğer türlerden tam bir yıl önce (2 yaşında) ulaştığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan, USDA 103 kedi balığının diğer çeşitlerden daha fazla besin tükettiği de bilinmektedir.

Arizona'da araştırıcılar tuzluluk oranı düşük sularda büyümeye alışmış karidesleri belirlemede



ŞEKİL 10.4 Hidroponik Bir Sistemde Marul ve Tilapia Polikültürü Tilapia içeren bir tank üzerinde raflarda marul yetiştirilen hidroponik bir sistem. Tilapia tankındaki azotlu artıkları içeren su marul rafları boyunca sirküle olur. Marul sudaki artıkları gübre olarak kullanır, böylece su kaynağı etkili bir şekilde kullanılmış olur.

selektif ıslahı kullanmışlardır. Bilim insanları tuz eklenmiş tatlısuda büyümüş larva karideslerle başlayarak, bu karidesleri aşamalı olarak düşük tuz derişimlerindeki su tanklarına alarak kültüre almaktadırlar. Bu sayede tuzlu suya ihtiyaç duymayan yüksek kalitede karidesleri yetiştirmek mümkün olur ve tuzluluk oranı düşük su daha sonra meyve ve sebze tarlalarını sulamak için tekrar kullanılabilir. Böylece karides, doğal tuzlu su kaynaklarından yüzlerce mil ötede olan Arizona çölünde bile yetiştirilebilir.

Deniz Ürünlerinin Kalite ve Güvenliğinin Artırılması

Tüketicilerin istediği renk, tat ve dokuya sahip balık ve kabuklu türleri geliştirmede akuakültür ve moleküler biyoloji teknikleri birleştirilebilir. Buna ek olarak, bilim insanları patojenler ve kimyasal kirlilikten arî, güvenli deniz ürünleri yapmak için uğraşmaktadır.

Kolombiya, Maryland'de Igene Biotech firması karideslere pembe rengini veren **astaksantin** pigmentini seri üretmek için gen klonlama tekniklerini kullanmıştır. Balık beslemede rekombinant astaksantin kullanarak bilim insanları tatlısularda gökkuşağı tonlarında somon ve alabalık geliştirebilirler. Astaksantinin ayrıca insanlar için besin takviyelerinde antioksidant olarak kullanılabilme potansiyeline sahip olduğu düşünülmektedir. Çoğu insan pembe renkli bir somon balığını sever. Aslında tüketici anketleri çoğu insanın, somonda kırmızılık ne kadar fazlaysa kalitenin de o kadar yüksek olduğuna inandığını göstermektedir. Koyu kırmızı

renkli somonlar Japonya'nın en iyi suşi barlarında yüksek fiyatla satılmaktadır.

Aktaksantin somonun tadı üzerinde bir etki yapmaz, fakat çiftçiler tüketicilerin tercihleri doğrultusunda yetiştiricilik yapmak istemektedir. Astaksantinin lider üreticisi olan İsviçreli ilaç şirketi Roche Holding AG, tüketici taleplerine uygun balık üretiminde yetiştiricilere yardımcı olmada boyama tahtasına benzeyen "salmofan"ın dağıtımını yapmaktadır. Su ürünleri yetiştiricileri açık pembeden koyu kırmızıya kadar değişen skaladan seçim yaparak, istenilen et rengine sahip balığı üretecek konsantrasyonda astaksantinli yemleri satın alırlar.

Deniz ürünlerinin kalite ve güvenliğini artırmak için halen birçok yaklaşım kullanılmakta ve çok daha fazlası da geliştirilme aşamasındadır. Su ürünleri biyoteknologları, bulaşık deniz ürünlerinin belirlenmesinden tadın zenginleştirilmesi ve ürünlerin raf ömrüne kadar, yeni teknolojileri uygulamaya çalışmaktadırlar. Agilent Teknolojileri Şirketi gıda ürünlerindeki balık türlerini saptamak için kullanılabilecek RFLP-tabanlı DNA çipi üretmektedir. Limanlardaki inspektörler, hükümet kurumları, deniz ürünleri işletmecileri, dağıtıcılar ve diğerleri bu teknolojiyi donmuş ve taze balık örneklerinde balık türlerinin belirlenmesinde kullanabilirler. Benzer teknikler yasadışı avlanan kaçakçılarla mücadele etmek için kanunsuz avlanan veya kasıtlı olarak yanlış etiketlenmiş balık türlerinin teşhis edilmesi amacıyla da kullanılır.

Deniz bilimciler deniz canlıları tarafından üretilen toksinleri kodlayan genleri belirlemek ve bunlar hakkında daha fazla bilgi elde etmek için moleküler biyoloji tekniklerini kullanmaktadırlar; böylece bu toksinlerin nasıl hastalık yaptıkları anlaşılabilir ve toksine maruz kalmanın sağlık üzerindeki negatif etkilerini en aza indirmek mümkün olabilir. Balıkları ve kabuklu deniz canlılarını enfekte eden bakteri, virüs ve parazitlerin tespit edilmeleri için pek çok moleküler prob ve PCR-tabanlı uygulamalar geliştirilmektedir. Karideslerde viral hastalıkların teşhisinde gen probları geliştirilmiş; balık ve kabuklular üzerinde çevresel streslerin etkilerinin tespiti ve değerlendirmesi için şirketler gen probları geliştirmektedir. İstiridye için *Vibrio cholera*' yı tespit etmede elde taşınabilir bir antikor test kiti geliştirilmiştir. Bu kit, akut ishal ile karakterize edilen ve ağır durumlarda su kaybına ve ölüme neden olabilen çok ciddi bir hastalık olan **kolera**ya sebep olan *V. cholerae* bakterisindeki proteinlerle etkileşen antikorları kullanır. Kolera, özellikle yetersiz kanalizasyon altyapısından kaynaklanan kirlenmiş sulara maruz kalan gelişmekte olan ülkelerde bir problemdir. Bu kit Güney Amerika'da bulaşık deniz ürünlerinin belirlenmesinde ve kolera enfeksiyonlarını en aza indirmede yaygın ve başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Hawaii'de akvaryum sektörüne satılan tropik bölgelerdeki balıkları etkileyen ciguatoxin için bir monoklonal antikor testi geliştirmede benzer yaklaşımlar kullanılmıştır.

Akuatik biyoteknologların ilgileri, akuakültürle yetiştirilen balıklara karşı ciddi tehdit gösteren çeşitli patojenlere karşı tanı kitleri ve aşılar geliştirme yönünde giderek artmaktadır. Birçok akuakültür firması, iç kanamaya sebep olan ölümcül bir durum olan, somonda iç organları mahveden ve heryıl dünya genelinde yüzbinlerce somonun telef olmasına sebep olan bulaşıcı somon anemisi için aşı geliştirmeye çalışmaktadır. Benzer bir çalışma *Caligus elongatus* gibi bitlere karşı mücadele için yürütülmektedir. Bu küçük parazit somona yapışır, kanıyla beslenir ve balığı ölümcül enfeksiyonlara elverişli hale getiren iyileşmeyen yaralara sebep olur. California, Idaho, Oregon ve Washington'da bilim insanları, yer yıl çok fazla ticari alabalık ve somonun kaybına yol açan, bulaşıcı hematopoietik nekroza (IHN) sebep olan virüse karşı alt birim aşısı geliştirdiler. Aşı, bakteride sentezlenen bir IHN proteininden geliştirildi. IHN enfeksiyonuna karşı balığı koruyan bu aşı, IHN virüsüne karşı antikorların üretimini uyarmak için bu hayvanlara enjekte edilir.

Akuakültürde Engeller ve Kısıtlamalar

Akuakültür, benzersiz bir şekilde, devasa gıda sağlama potansiyeliyle akuatik biyoteknolojinin dünya çapında bir uygulaması olarak kurulmasına karşın, bazı kaygılar ve engeller de bulunmaktadır. Bütün türler akuakültür için ideal bir şekilde uygun değildir. Bu durum özellikle oldukça pahalı deniz türleri için geçerlidir. Su kalitesiyle ilgili durumlar problem oluşturabilir. Bazı türler için besinleri olması gereken konsantrasyonda ulaştırmak ve artıkların birikmesini engellemek için suya uygun akış hızı vermek zordur. Bu durum özellikle gezmek için geniş okyanus alanlarına ihtiyaç duyan ve küçük alanlara hapsedildikleri zaman hayatta kalamayan deniz türleri için geçerlidir. Buna ek olarak, deniz canlıları pazar ölçeğinde büyüyene kadar her birinin farklı besin gereksinimleri olan, bir seri larval aşamayı da kapsayacak şekilde, genelde uzun ve karmaşık hayat döngülerine sahiptir. Bu türlerin erişkinlerini yetiştirmede parmak boyu genç bireylerin kaybı fazla olabilmekte ve dolayısıyla oldukça maliyetli olabilmektedir. Larva evreleri az olan türlerde akuakültür yapmak en kolaydır.

Su ürünleri yetiştiricileri balık sürülerinde hastalıkların etkilerini en aza indirme problemiyle sıkça karşılaşırlar. Yoğunluğa bağlı olarak kalabalık koşullarda yetişen balıklar genellikle doğal stoklara kıyasla bakteriyel, viral patojenler ve bit kaynaklı hastalıklara ve strese karşı daha duyarlı olmaktadır. Çiftlik balıklarında daha az genetik çeşitlilik ve hastalık direnci bulunduğundan, enfeksiyonlar hızlıca yayılabilir. Çiftlikte yetişen balık sürüsündeki çoğu balık hastalıklara karşı aynı dayanıklılık ve duyarlığa sahip olacaktır, dolayısıyla eğer salgın kontrol edilmezse geniş bir balık sürüsü telef olabilir.

Bazıları akuakültür endüstrisinde hamsi ve ringa balığı gibi yem olarak kullanılan yabani balıkların aşırı miktarlarda tüketildiği konusunda endişelidir. Bazı yem balıkları akuakültürle üretilmesine rağmen, dünyanın çoğu bölgesinde balık yemi olarak kullanılan balıklar halen doğal stoklardan avlanmaktadır. Somonu yetiştirmede bir pound somon için birkaç pound avlanmış hamsi, ringa balığı ve uskumru gibi tipik yabani balıklar kullanılır. 1 pound somon yetiştirmek 3 ilâ 5 pound doğal olarak tutulmuş balık gerektirebilir. Bilim insanları yetiştirilen bazı balıkları bitkisel temelli diyetlere alarak etçil beslenme alışkanlıklarını değiştirmenin yollarını aramaktadır, fakat çoğu su ürünleri yetiştiricisi bu tip balıkların kalitesi konusunda endişelidir. Bitkisel temelli diyet uygulayanlar, bazı insanların daha az balık tadı olan somonları seveceğini iddia etmektedir.

Geleneksel tarımdan kaynaklanan kirlilik ve artık akıntıları çevreye kayda değer etkisi olan sorunlardır ve çevrecilerin tepkisini çekmektedir. Benzer şekilde balık yetiştiriciliği sektörünün ürettiği kirlilikten dolayı da kaygı duyulmaktadır. Akuakültürde ortaya çıkan işlenmemiş dışkı, idrar ve yenmemiş gıdalar içeren atık yüklü sıvılar, sıklıkla doğal suyollarına boşaltılır.

Bu atıklar azot ve fosfor bakımından zengindir ve alglerin üremesine ve diğer sorunlara neden olabilir. Ölen algler balık ölümlerine sebep olabilir. Balık atıkları *Salmonella* ve *Pseudomonas* gibi insan sağlığını etkileyebilecek bakteriyel patojen suşlarına ortam hazırlayabilir; buna rağmen, balık atıklarından insanlara hastalıkların bulaşma ihtimali iyi anlaşılmamıştır. Günümüzde genellikle akuakültürden kaynaklanan atıkların su kalitesine toplamda az bir etkisi olduğu düşünülmektedir, fakat dünya çapında akuakültür çalışmaları devam ederse bu durum değişebilir.

Akuakültür tesislerinde "zararlı" türlerin yok edilmesi diğer bir meseledir. Çeşitli balık yiyen kuşlar (karabatak, pelikan, heronlar, akbalıkçıl ve martılar gibi) ve memeliler (foklar ve deniz ayıları gibi) izinli veya izinsiz avlanma ve kıyıma maruz kalabilirler. Bununla birlikte bazı işletmeler bu "zararlı" türlerle başa çıkmak için öldürücü olmayan yöntemler kullanmaktadır (ışıklar, reflektörler, korkuluklar, insan varlığı gibi görsel teknikler ve avcı sesleri, sirenler ve elektronik ses üreteçleri gibi sesli teknikler). Balık yetiştiriciliğinde avcıları bunlarla beslenmekten vazgeçirmek için perimetrik parmaklıklar ve koruyucu ağ örmenin yanında, sualtı akustik ve patlayıcı aletler de kullanılabilir

Birçok akuakültür işleminde yaygın olarak kullanılan kimyasalların çevreye atılmasından dolayı kaygılar artmıştır. Bunlar antibiyotikler, pestisitler, herbisitler (bitki öldürücüler), algisitler (alg öldürücüler) ve parazitleri kontrol etmek için kullanılan kimyasallardan oluşur. Ayrıca, diğer çürümeyi önleyici bileşiklerden kimyasal kalıntılar ve korozyon önleyici maddeler balık ve kabuklular tarafından absorbe edilebilir ve diğer deniz organizmalarına ve insanlara geçebilir. Kültürdeki somonlar üzerinde yapılan kapsamlı bir araştırma, bu balıkların yüksek miktarda poliklorlu bifeniller (PCB) ve doğal akrabalarına oranla artan kanser riskiyle ilişkili diğer bileşikler içerdiklerini ortaya çıkardı. Bu durum sektör için büyük bir kaygıdır ve balık yetiştiricileri çiftlik somonunda kirleticileri azaltma yolunda çalışmaktadır.

Akuakültür sıvılarının boşaltılmasını kapsayan Temiz Su Yönetmeliği; akuakültüre karşı bir tehdit olabilecek kuşları koruyan Göçmen Kuşlar Yönetmeliği; akuakültür alanlarında avcı olabilecek deniz memelilerinin öldürülmesini yasaklayan Deniz Memelilerini Koruma Kanunu; balıkları da kapsayacak şekilde kültürü yapılan bitkilerde kullanılacak maddeleri belirleyen Federal İnsektisit, Fungusit ve Rodentisit Yönetmeliği ve balık yetiştiriciliğinde ilaçların kullanımının onaylanmasını ve deniz ürünleri güvenliğini denetleyen Gıda, İlaç ve Kozmetik Yönetmeliği dâhil çeşitli federal yasalar akuakültürün çevreye olan potansiyel etkilerini düzenlemektedir.

Akuakültürün tabiat üzerindeki görsel etkileri de sorunludur. Örneğin, İskoçya'nın bazı alanlarında sahil boyunca uzanan kabuklu deniz canlıları için konulmuş kafeslerin bolluğunun kıyışeridi manzarasının doğal estetik görünüşünü bozduğuna dair görüşler ileri sürülmektedir. Hem su ürünleri yetiştiricileri hem de çevreciler tarafından gündeme getirilen çok ciddi bir konu var ki, o da, yetiştirilen balıkların kazayla doğaya kaçması durumunda doğal türlere karşı potansiyel bir tehdit oluşturabileceğidir (gelecek sayfalardaki "Kararı Siz Verin" kutusunu inceleyiniz).

Akuakültürün Geleceği

Akuakültür endüstrisini neler beklemektedir? Gelecekteki yönü önceden tanıladığımız bazı engel ve kısıtlamaları aşacak gibi görülmektedir. Akuakültür uzmanları balık yemi olarak kullanılan yem balıkları sürülerinin fazla avlanması hakkındaki endişeleri azaltmak için bazı türleri yetiştirmede az miktarda veya hiç balıketi ve yağı içermeyen farklı gıda kaynakları bulmanın yollarını aramaktadır. Balık yetiştiriciliğindeki ilerlemeler, akuakültür tesislerindeki atık sıvıların çevreye boşaltılmasını azaltacak ve yetiştirilen türleri tedavi etmede kullanılan antibiyotik, pestisit ve diğer kimyasalların kullanımını minimuma indirecek yöndedir. Su ürünleri yetiştiricilerinin su kaynaklarını artırma girişimleri devam ettikçe, polikültür yaklaşımları daha da yaygın olacaktır.

Gelecek kısımda irdeleyeceğimiz gibi, moleküler genetik yaklaşımlarının gelecekte akuakültür üzerinde kuvvetli bir etkisi olacaktır. Akuatik biyoteknologlar, bu bölümde sunulan stratejileri rekombinant DNA teknolojisiyle birlikte kullanmak kaydıyla, hastalık dayanıklılığı ve önemli gıda kaynağı olan türlerin genetik



KARARI SİZ VERİN

Balıkçılık ve Genetik Kirliliğin Riskleri: Akuakültür ve Genetiği Değiştirilmiş Türler Hakkında Tartışmalar

Balık kirliliği terimi doğal ekosistemleri değiştirerek veya biyoçeşitliliği azaltarak zarar verebilecek akuakültür türlerinin doğaya kaçmasını; yeni parazitlerin ortaya çıkmasını; besin, habitat ve yumurtlamak için doğal türlerle yarışılmasını; doğal stoklarla ırkların karışmasını ve habitatların yok olmasını tanımlamaktadır. Çiftliklerde yetiştirilen balıklar kaçmaktadır. Balık kirliliğinin ve etkilerinin pek çok örneği belgelendirilmiştir. Örneğin, Florida'da bazı kanallarda obur iştahlı hızlı büyüyen bir tava balığı olan tilapia, besin ve yumurtlama alanları gibi açılardan doğal türlere karşı üstün gelmiştir. Sonuç olarak bazı doğal türler tilapia kirliliğinin olduğu bölgelerde gözden kaybolmuştur. Benzer şekilde Teksas'ın körfez kıyısında ve Güney Carolina'nın Atlantik kıyısında yetiştirilen yerli olmayan pasifik beyaz karides türleri kaçmıştır ve bu sahalarda serbestçe yüzmektedirler.

Kanıtlar göstermektedir ki çiftlikte yetiştirilmiş Atlantik somonu Kuzeybatı Pasifik sularında üremektedir. Pasifik somonu ve çelikbaştan oluşan 26 stok, nesli tükenmekte veya tehlike altında olarak listelenmiştir. Bazı bilim insanları bu doğal türlerin kaybının çiftlik balıklarından kaynaklanan bitlerin ve diğer parazitlerin yayılması sonucu olduğunu düşünüyorlar. Norveç'te çiftliklerden kaçan somonlar yerel nehirlerdeki somonların yaklaşık % 30'unu oluşturmaktadır ve yerel akarsulardaki yerli somonlardan daha fazla sayıda olduğu düşünülmektedir. Istakoz yetiştiriciliğinin yanında en büyük balıkçılık olan somon yetiştiriciliğinin yapıldığı Maine'de Kasım 2000'deki bir poyraz, somonların yetiştirildiği çelik kafeslerin kökünden sökülmesine ve Machias körfezine 100 000'in üzerinde balığın salınmasına yol açmıştır. Bu kazanın ABD'nin doğu kıyısında meydana geldiği bilinen en büyük akuakültür kaçışı olduğu düşünülüyor. Bazı insanlar bu yayılmanın Maine nehirlerindeki yabani somonların gelecek nesillerinin genetik potansiyelini zayıflatacağı konusunda endişelidirler. ABD hükümeti sahadaki akuakültürün etkisiyle ilgili kaygıların bir sonucu olarak sekiz Maine nehrindeki yabani somonları soyu tükenmekte olarak kaydetmiştir. New Brunswick ve Maine'de bazı yumurtlama nehirlerindeki firari somonların sayısı yabani somonları aşın derecede geçmiştir.

Çiftlik balıklarının kaçışı, çevrecilerin ve diğer grupların dünyanın pek çok alanında yeni balık çiftliklerinin kurulması ve akuakültür endüstrisinin düzenlenmesiyle ilgili bir moratoryumda toplanmalarına neden olmuştur. Bu gruplar balık kirliliğini bir sorun olarak görmektedirler, çünkü çiftlik balıkları doğal balık türlerini tehdit edebilir ve doğal akuatik ekosistemleri etkileyebilir. Pek çok akuakültür türü evcil yetiştirilen hayvanlara benzemektedir, çünkü bunlar insanlara bağımlıdır ve vahşi yaşama çok az adapte olmuşlardır. Kaçak çiftlik balıkları çiftleşme ve doğal türlerle melezleşme için diğer balıklarla yarıştığından, doğal stokların gen havuzunu etkileyebilir. Ayrıca kanıtlar göstermektedir ki, çiftlik somonları yabani stoklara kıyasla daha küçük ve muhtemelen daha az fertil yumurtalar üretmektedir.

Transgenikler ve triploidler gibi genetiği değiştirilmiş türlerin kaçması hakkında daha da ciddi kaygılar gündeme gelmiştir. Bu türlerin çoğunun yeniden üreyememesine rağmen, tüm modifiye balıkların steril olacağından emin olunmasını sağlayacak bir teknik bulunmamaktadır. Bir kez doğaya karışırlarsa, okyanuslar kurutulamayacağından, geri dönüş söz konusu değildir. Hedeflenen büyüme menzilinin dışına kaçıp büyüyen transgenik stoklar çoğu zaman kendi ortamlarındaki gibi iyi büyümemektedir. Sonuç olarak, eğer doğal türlerle çiftleşirlerse, karışık stokların üreme yeteneği bozulur ve daha yavaş gelişme görülür. Transgenik türlerin karışması doğal stokların dirliğini azaltabilir ve binlerce yılda oluşmuş adaptasyonları yok edebilir. Artırılmış büyüme yeteneğine sahip balıklar, besin ve yumurtlama bölgelerini ele geçirmek açısından doğal balıklara üstün gelebilir. 2001 yılında Maryland genetiği değiştirilmiş balıkların diğer kanallara bağlı olan göl ve göletlerde üretilmesini yasaklayan ilk yer olmuştur.

Eleştirmenler doğal olmayan türlerin yayılmasına dair tarihi örnekleri de kaygı sebebi olarak dile getirmektedir. Örneğin, 1980'lerde okyanusu aşan gemilerle Great Lakes'e geldiği düşünülen zebra midyeleri önemli sorunlar çıkarmıştır. Çabuk üreyen bu kabuklu canlıların kolonileri diğer türlerin habitatlarını da baskı altına almıştır. Great Lakes'de doğal planktonların azalmasına yol açmış ve gemilerin gövdelerinde büyümüşlerdir. Sadece Great Lakes bölgesindeki zebra midyelerini kontrol etmenin maliyetinin yıllık 400 milyon doları aştığı hesaplanmıştır.

ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) bir gıda kaynağı olarak transgenik balıkların güvenliğini düzenlemekten sorumlu olsa da, ABD'de akuakültür türlerinin (transgenikler dahil) yayılmasıyla ilgili açık bir politika bulunmamaktadır. Eğer açıklanan kaygılar dikkate alınırsa bu durum değişecektir. ABD Tarım Bakanlığı (USDA) biyomühendislik ürünü türlerin risk değerlendirmesine ve hem deniz hem de karasal çevrelere genetiği değiştirilmiş organizmaların salınmasının güvenliğine daha yakından bakmanın yollarını aramaktadır. Bazı bilim insanları artan insan nüfusuna yeterli miktarda gıda üretmek için akuakültür ve genetik mühendisliğinin gerekli olduğuna inanmaktadır, fakat bu teknolojilerin riskleri hiçbir şey yapmamanın risklerinden daha mı fazladır? Karar siz verin.

içeriğini geliştirerek, yetiştirilen türlerin büyüme ve üretkenliklerini artırmaya çalışacaktır. Moleküler biyolojinin akuakültür üzerinde, balık ve kabuklu canlıların yumurtlamasını kontrol eden genlerin tanımlanmasından istenilen özellikte genetiği değiştirilmiş türleri yaratmaya kadar, güçlü bir etkisi olacaktır.

Deniz canlılarının erken gelişme dönemlerindeki kritik zamanlarda ölüm oranını etkileyen koşulları anlamaya yönelik çalışmalar, kültürü yapılan türlerin üretkenliğini artırabilecek yeni yetiştirme tekniklerinin bulunmasına yol açacaktır. Bazı ülkeler akuakültürle yetiştirilmesi zor olan diğer türlerin yetiştirilmesiyle ilgili araştırmaları aktif bir şekilde yürütmektedir. Örneğin, Güney Carolina Doğal Kaynaklar Bölümü yüksek ticari değeri olan çok popüler bir oyun balığı olan cobia için akuakültür teknikleri denemektedir. Cobia okyanusun derin ve açık sularında dolaşmakta, bu durum kapalı alanlarda büyütülmesini zorlaştırmaktadır.

Şimdiye kadar akuatik biyoteknolojinin en eski uygulamalarından birisi olan akuakültür sektörünü detaylı olarak inceledik. Bu kısımda akuakültürün diğer bazı endüstrilerden pek de farklı olmadığını gördük; topluma hizmet etmekte fakat bazı problemler de göstermektedir. Gelecek kısımda henüz daha yeni yeni gelişmekte olan bir alanı işleyeceğiz; akuatik canlıların moleküler genetiği.

10.3 Genetik Teknolojiler ve Akuatik Organizmalar

Akuatik organizmalarda gen ekspresyonu (ifadesi) ve regülasyonuyla ilgili temel bilgiler ve üreme, büyüme, gelişme ve ekstrem çevre koşullarında hayatta kalma gibi faaliyetlerde rol alan genleri anlamak; nesli tehlikede olan deniz türlerinin popülâsyonlarını sürdürmede, zararlı türlerin popülasyonlarını sınırlamada ve akuatik organizmaların genetik manipülasyonunu geliştirmeye yönelik uygulamalarda kritik rol oynayacaktır.

Ayrıca, balık ve kabukluları etkileyen patojenler her yıl geniş çapta parasal kayba neden olmaktadır. Bilim insanları akuakültür türlerinin büyüme ve hayatta kalma becerilerini ıslah etme çalışmalarında ve hastalığın bulaşması ve patojenlerin hayat döngülerini kapsayacak şekilde akuatik türlerin bağışıklık sistemini ve hastalık yapıcı organizmalara olan hassaslığı ve dayanıklılığı daha iyi öğrenmede moleküler biyolojiden yararlanmaktadır.

Yakında göreceğiniz gibi, akuatik organizmaların genomlarını daha iyi anlamamıza yönelik yeni uygulamalardan biri de deniz türlerinin genetiğini değiştirmektir.

Yeni Genlerin Keşfi ve Klonlanması

Akuatik organizmaların genlerini keşfetme süreci pek çok ilginç alanı kapsamaktadır. Örneğin, araştırmaların büyük bir çoğunluğu yeni genlerin belirlenmesi; gen ekspresyonunu kontrol eden aşırı sıcaklık ve derin okyanus basınçları gibi çevresel etkilerin anlaşılması; eşsiz adaptasyonların moleküler temellerinin tanımlanması; akuatik organizmaların üreme, büyüme ve gelişmesini kontrol eden genetik ve hormonlar gibi moleküler faktörlerin belirlenmesi üzerine adanmıştır.

Yeni genlerin belirlenmesinin yanında, birçok araştırma grubu balıklardaki hastalıklarla ilişkili mutasyonları tanımlamakla meşguldür. Sonuç olarak, bu gibi bilgiler balık çiftlikleri için seçilmiş karakterde hastalıktan âri balık ıslah stoklarının geliştirilmesinde kullanılacaktır. Bilim insanları balık büyümesi, sağlığı ve hayat süresine olumsuz etkisi olabilecek istenmeyen genlerin belirlenmesiyle, akuakültür için geliştirilmiş türlerin ıslahında bu genlerin bazılarının değiştirilebileceğini veya kaldırılabileceğini öngörmektedir. Pek çok deniz türü için önemli gıda kaynakları olan fitoplankton ve zooplankton gibi mikroskopik deniz organizmalarının tanımlanmasında prob olarak kullanılabilecek genlerin keşfi, bilim insanlarının bu mikroorganizmaların genetiği üzerine çevre faktörlerinin yaptığı etkileri inceleme olanağı sağlayacaktır. Bu konu mikroskopik canlıların besin zincirindeki daha yüksek organizmaları nasıl etkilediğini anlamada kritik derecede önemlidir.

Çiftliklerde yetiştirilenlerle yabani balıkları ayırt etmede kullanılabilecek genler, DNA markörleriyle tanımlanmıştır. Biyologlar hastalıklara karşı daha dayanıklı ve balık yetiştiriciliğine elverişli çeşitleri tanımlamada bu markörleri kullanmaktadır. Çiftlikte yetişen ve kaçan balıkların doğal stoklara etkilerini belirlemede de bu markörler bilim insanları için ayrıca önemli rol oynayacaktır. Bu markör genlerden çoğu türe özgüdür ve balık ve yabani hayat görevlilerine izinsiz avlanmanın ve kotalara bağlı balık perakende satışlarının kontrol edilmesinde PCR tekniklerini uygulamayı mümkün kılmıştır. Örneğin, ABD'nin kuzeydoğusunda karabalık gıda olarak tercih edilen bir balıktır. Fakat karabalığın aşırı avlanması, yasal karabalık avlamada katı bölgesel avlanma sınırları ve yasak mevsimsel zamanların belirlenmesine yol açmıştır. Eğer doğal hayat yetkilileri karabalık avlayan kaçak avcı olabilecek birisiyle kapalı sezonda karşılaştığında, kaçak avcı botunda sadece kılçıksız et ve bozulmamış gövdeler bulduklarında, görevliler bu etlerin hangi türlerden geldiğini nasıl belirleyebilir? Etlerin karabalığa ait olup olmadığını belirlemek için karabalığa özgü primerler kullanılarak, etlerden izole edilen DNA ile PCR yöntemleri kullanılabilir.

Büyüme hormonu (Growth Hormon-GH) geninin klonlanması genlerin keşfedilme sürecinin deniz biyoteknolojisinde ne gibi ilerlemelere yol açtığına mükemmel bir örnektir. İnsan büyüme hormonunun cüceliğin tedavisinde nasıl klonlandığını daha önce görmüştük (Bölüm 3). Büyüme hormonunun epifiz

bezi tarafından salgılanan, kemik ve kas hücrelerinin ergenlik boyunca büyümesini uyaran bir hormon olduğunu hatırlayınız. Somon balığı büyüme hormonunun klonlanması, doğal suşlarla karşılaştırılınca oldukça hızlı büyüme oranı gösteren **transgenik** somon türlerinin geliştirilmesine önayak olmuştur. Büyüme hormonu örneğini daha detaylı olarak gelecek kısımda ele alacağız. Diğer bir örnek olarak, Birmingham Alabama Üniversitesi araştırıcılarının mavi yengeçteki deri değiştirmeyi engelleyici hormon (molt-inhibiting hormone, MIH) genini klonlamaları, verilebilir. Deri değiştirme MIH'daki bir azalmayla gerçekleşir ve tamamı yenebilen yumuşak kabuklu yengeçlerin oluşumuna neden olur. Mevcut araştırmalar, deniz ürünleri sektöründe talebe bağlı olarak yumuşak kabuklu yengeç üretmenin bir yolu olarak, MIH salınımını durdurmaya yöneliktir.

Antifriz proteinleri

Umut veren uygulamaları olabilecek yeni genlerin belirlenmesinde en başarılı örneklerden bir diğeri **antifriz proteinleri**nin (AFP) genleriyle ilgilidir. Massachusetts'de A/F Protein Şirketi antifriz proteinlerinin üretiminde lider bir firmadır. İlk AFP'lerden bazıları Kanada'nın doğu sahillerinde yaşayan kuzey morina balığı gibi balık türlerinden ve yeryüzünün en ağır koşullarında – aşırı soğuk buzlu sularda – yaşayan teleost adı verilen antarktik balığından izole edilmiştir. Daha sonradan AFP'ler kış dil balığı (*Pleuronectes americanus*) iskorpit (*Myoxocephalus scorpiu*), okyanus mezgiti (*Marcrozoarces americanu*), gümüş balığı (*Osmerus morda*) ve ringa balığı (*Clupea harengus*) gibi diğer çeşitli soğuk su türlerinden izole edilmiştir. İlginçtir ki benzer proteinler böcekler, bakteriler ve soğukta hayatta kalabilen diğer organizmalarda da keşfedilmiştir.

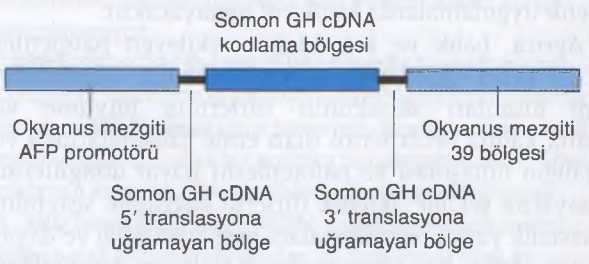
AFP'lerin çeşitli tipleri bulunmuştur. Yapısal olarak çoğu AFP fazlaca alfa heliksler içerir ve büyük ölçüde disülfit köprüleriyle birbirine tutunmuştur. AFP'ler balık kanının ve hücre dışı sıvıların donma sıcaklığını düşürmede işlev görürler, bu sayede dondurucu deniz sularında balığı donmaktan korurlar. Deniz suyu yaklaşık –1.8 °C'de donar. AFP'ler tipik olarak balık vücut sıvılarının donma noktasını 2 ila 3 °C kadar düşürür. Güncel uygulamalarda AFP'lerin büyük çoğunluğu balık kanından izole edilmektedir. Bilim insanları AFP'ler için öngörülen aşırı talebi karşılamak için, dünya çapında gelecekteki AFP ihtiyacını karşılayacak, bakteriyel ve memeli hücrelerinde rekombinant AFP üretimi üzerinde çalışmaktadır.

AFP'ler çeşitli yollarla canlıları donmaktan korur. Buz kristallerinin oluşumunu modifiye veya bloke etmek için kristal yüzeyine bağlanabilirler, biyolojik sıvıların donma sıcaklığını düşürebilirler ve hücre membranlarını soğuk hasarından koruyabilirler. Bu eşsiz yeteneklerinden dolayı donmayı engelleyici bu kriyoprotektif proteinler için bir takım yenilikçi uygulamalar geliştirilmektedir. AFP'ler düşük sıcaklıklara ve donmaya karşı artırılmış dayanıklılığa sahip transgenik balık ve bitkiler tasarlamada kullanılmaktadır. Örneğin, somon balığı antifriz moleküller üretemez; dolayısıyla dondurucu soğuğa yakın sulara maruz kalınca ölmektedir. Somon türleri için çok soğuk olan doğu Kanada sahillerinin suları AFP genlerini içeren, soğuğa dayanıklı transgenik somon türleri için potansiyel akuakültür habitatı olarak değerlendirilmektedir.

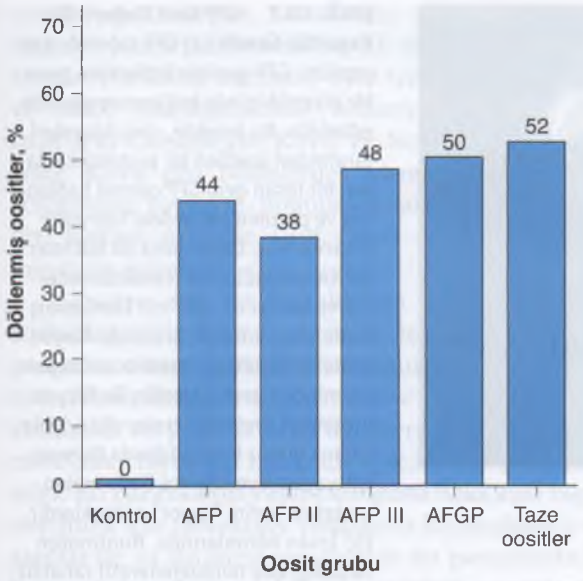
AFP geni promotör dizileri, somonda büyüme hormonu da dahil olmak üzere, transgenlerin ekspresyonunu uyarmak için rekombinant DNA deneylerinde kullanılmaktadır. AFP promotör dizilerinin transkripsiyonu soğukta uyarılmaktadır. Promotör dizinin 3′ ucuna çalışılan geni bağlamak suretiyle, bu "akış aşağı" genlerin soğuk su koşullarında transkripsiyonunu uyarmada AFP promotörleri kullanılabilir (**Şekil 10.5**). Böylece AFP promotör gen yapıları, yabancı genlerin transkripsiyonunda, protein üretiminde artış sağlayan çok etkili trankripsiyon vektörleri olarak iş görebilir. Gelecek kısımda ayrıntılarıyla inceleyeceğimiz bu yapılar balıklar için genetik mühendisliğinde çok etkili olabilirler.

Soğuğa dayanıklı transgenik çeşitler üretmek için AFP'ler domates gibi bitkilere aktarılsa da, bunlar henüz geniş çapta kullanılabilir değillerdir. Bazı nadir ticari tahıl bitkileri balıktaki AFP'ler kadar etkili kriyoprotektif proteinler üretmektedir. Buğday, kahve, meyve (naranciye, elma, vişne ve şeftali), soya fasülyesi, bezelye, mısır ve patates gibi pek çok popüler bitki için soğuk nedeniyle üründe hasar oluşumu dünya çapında bir sorundur.

İnsan hücre, doku ve organlarının dondurularak korunması AFP'lerin umut veren tıbbi uygulamalarındandır. **Şekil 10.6**'da gösterildiği gibi, in vitro fertilizasyonda kullanılan oositlerin soğukta muhafazası potansiyel bir uygulamadır. AFP'ler kan da dahil bazı



ŞEKİL 10.5 AFP Promotörlerinin Transgenik Balıkta Gen Ekspresyonunu Uyarması Okyanus mezgiti adı verilen bir balıktan alınan antifriz protein gen promotörünün, somon büyüme hormonu cDNA'sına eklendiği bir rekombinant DNA plazmidi, akuakültürde hızlı büyüyen balık üretmede kullanılabilir. AFP promotörünün transkripsiyonu soğuk koşullarla uyarılır; böylece bu yapıya sahip transgenik balıklar serin sularda yetiştirildiklerinde fazla miktarlarda büyüme hormonu sentezler. Büyüme hormonlarının artan üretimi transgenik balığın transgenik olmayanlara kıyasla daha hızlı büyümesine neden olur.



ŞEKİL 10.6 İnsan Dokusu Kriyoprotektanları Olarak AFP'ler
Sığır oositleri 24 saat boyunca 4°C'de, hem farklı tiplerdeki AFP'ler veya karbonhidratça zengin bir AFP türü olan antifriz glikoproteinler (AFGP) ortamda yokken (kontrol) hem de bulunurken inkübe edilmiş ve ardından sığır spermiyle döllenmiştir. AFP ve AFGP uygulanmış oositlerin, taze oositlerinkine benzer döllenme oranları gösterdiğine dikkat edin. Bu durum, AFP'lerin oositlere soğuğa dayanıklılık koruması sağlayarak, onların döllenme yeteneğini sürdürmesini sağladığını göstermektedir.

insan dokularının saklanmasında ve organ nakli ameliyatından önce karaciğer, kalp gibi insan organlarının dondurularak saklanması için yeni protokollerin geliştirilmesinde yararlı olabilir.

Son olarak, bilim insanları dondurma dâhil dondurulmuş gıdaların raf ömrünü uzatmada ve kalitesini artırmada AFP'lerin kullanılabileceği yolları araştırmaktadır. Dondurulmuş gıdaların kalitesindeki değişiklikler genellikle marketten gıdayı alıp buzdolabına koymak gibi, eritip tekrar dondurma sırasında gerçekleşir. AFP'lerin dondurulmuş gıdaların toplamda kalitesini artırmak için kristallenme özelliklerini değiştirmede kullanılması mümkündür. Hatta bilim insanları hava taşıtlarında ve yollarda buz oluşumunu kontrol etmede AFP'lerin kullanılabileceğini önermiştir.

Görüldüğü gibi AFPler çeşitli ilginç uygulamalarda kullanışlı olabilir. Hiç süphesiz ki okyanuslar gelecekte biyoteknolojinin yararına kullanılabilecek diğer pek çok yeni genlere sahip türleri içinde barındırmaktadır.

"Yeşil Genler"

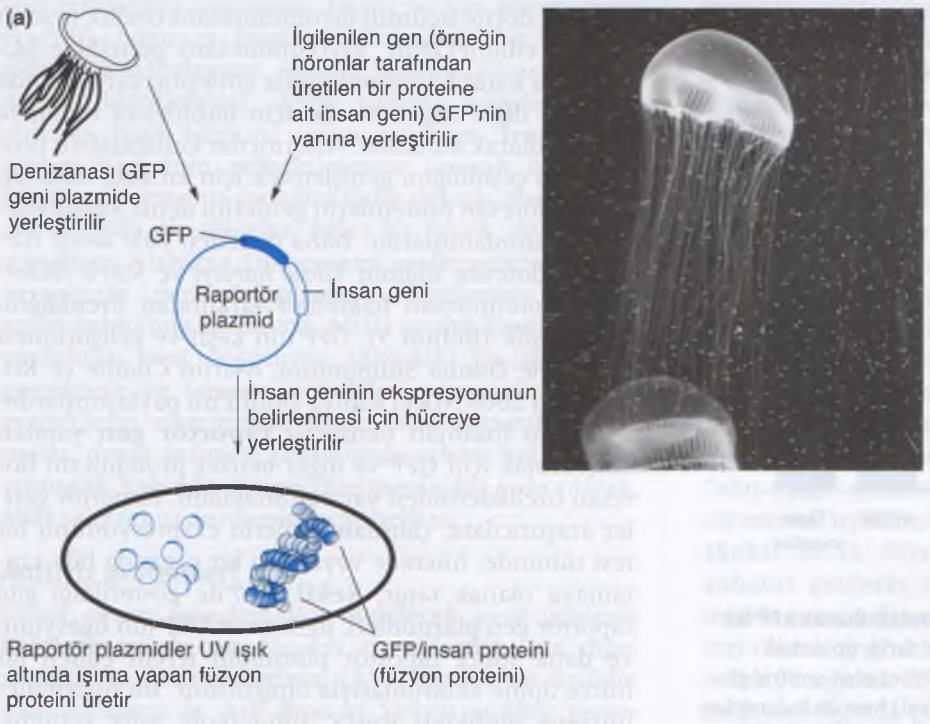
Akuatik bir organizmadaki yeni bir genle ilgili göze çarpan bir diğer araştırma örneği, biyolüminesan (ışık yayan) denizanası *Aequorea victoria*'dır. *A.victoria* **yeşil floresan proteini** (**GFP-** green fluorescent protein) adı verilen bir proteini kodlayan bir gen sebebiyle floresan ışığı yayabilmekte ve karanlıkta parıldayabilmektedir. GFP ultraviyole ışığa maruz bırakıldığında parlak yeşil ışıldamaktadır. Tüm deniz canlılarının yaklaşık dörtte üçünün biyolüminesans özellik taşıdığı tahmin edilmektedir. Biyolüminesans genellikle okyanusun karanlık ortamlarında çiftleşme süreçlerinde balık ve diğer organizmalar için birbirlerini bulmada bir araç olarak kullanılır. Araştırıcılar kullanılabilir proteinlerin çeşitliliğini genişletmek için kırmızı, turuncu ve sarı floresan proteinlerin genlerini deniz anemonlarından klonlamışlardır. Daha önceden bazı deniz türlerinin floresan ışığının *Vibrio harveyi* ve *Vibrio fischeri* gibi biyolüminesan bakteriler tarafından üretildiğini belirtmiştik (Bölüm 5). GFP'nin keşfi ve geliştirilmesi nedeniyle Osama Shimomura, Martin Chalfie ve Roger Tsien 2008 Nobel Kimya Ödülü'nü paylaşmışlardır.

Bilim insanları benzersiz **raportör gen** yapıları oluşturmak için GFP ve diğer benzer proteinlerin floresan özelliklerinden yararlanmaktadır. Raportör genler araştırıcılara, çalışılan genlerin ekspresyonunu bir test tübünde, hücrede veya tüm bir organda bile saptamaya olanak tanır. **Şekil 10.7**'de gösterildiği gibi raportör gen plazmidleri, ilgili gene GFP'nin ligasyonu ve daha sonra raportör plazmidin tercih edilen bir hücre tipine aktarılmasıyla oluşturulur. Bu plazmidler hücreye girdikten sonra, ultraviyole ışığa tutulduğunda, floresan ışık yayan bir füzyon proteini oluşturmak üzere transkripsiyon ve translasyon geçirir. Sadece GFP füzyon proteini sentezleyen hücreler floresan ışıma yapar. Bu sayede bu plazmidler ilgilenilen genin nerede çalıştığını saptamaya yararlar.

Bu yaklaşım gen ekspresyonu ve regülasyonundaki temel süreçleri çalışmak için geniş çaplı olarak kullanılmaktadır. Gelişim biyologları embriyoların gelişmesinde farklı hücre tiplerinde farklılaşmayı yakalamada GFP üreten embriyonik kök hücreleri kullanmışlardır. Bilim insanları GFP raportör gen yapılarını tıbbi tanı ve tedavileri ilerletebileceği düşünülen bazı yenilikçi yollarda da kullanmışlardır (Şekil 10.7b). Örneğin, GFP genleri farede tümör oluşum yerlerini belirlemede, bağırsaklarda bakteriyel enfeksiyonların gelişimini takip etmede, antibiyotik uygulamasının ardından bakteri ölümlerini görüntülemede ve insan sindirim sisteminde gıda kirletici mikroorganizmaların varlığını incelemede kullanılmıştır (Şekil 10.7c).

Deniz patojenlerinin genomlarının klonlanması

Deniz biyologları, yabani ve çiftlik türlerini etkileyen çeşitli deniz patojenlerinin genomlarını klonlayarak, bu organizmaların hastalık meydana getirmek ve hastalıkların yinelenmesini sağlamak için kullandıkları genler hakkında bilgi edinmeyi amaçlamaktadır. 2001'de Şili'li bilim insanları *Piscirikettsia salmonis* bakterisinin genomunu çözümlediler. *P. salmonis* somon balıklarını enfekte eder ve enfekte somonun karaciğerini etkileyerek ölümüne yol açan riketsiyal sendromuna neden olur. Bu hastalıkla savaşım somon üreticileri için dünya çapında bir sorundur. Günümüzde etkili bir tedavi mevcut değildir. Bu sendrom yalnızca Şili'nin somon endüstrisinde, yılda tahminen 100 milyon dolar maddi kayba yol aç-



ŞEKİL 10.7 GFP Geni Değerli Bir Raportör Gendir (a) GFP raportör gen yapılan, GFP geninin ilgilenilen gene bir plazmid içinde bağlanmasıyla elde edilebilir. Bu örnekte, sinir hücreleri tarafından üretilen bir proteini kodlayan bir insan geni GFP genine bağlanmış ve plazmid kültürdeki hücrelere aktarılmıştır. Daha sonra bu hücreler mRNA moleküllerini transkribe edecek ve bunlar da, GFP'nin klonlanmış insan proteinine ilişik olduğu füzyon proteinini üretmek üzere translasyon işleminden geçeceklerdir. Bu füzyon proteinini üreten hücreler ultraviyole ışığına maruz bırakıldığında floresan ışık yayacak ve böylece ifade edilen proteinin yerini "rapor" edeceklerdir. (b) İnsan nöronlannda, Huntington hastalığı adlı nörodejeneretif rahatsızlıktan sorumlu olabilecek bir proteinin belirlenmesi için kullanılmakta olan bir GFP raportör geni. (c) GFP raportör plazmidleri ayrıca, şekilde gösterilen insan bağırsak hücrelerini enfekte eden *Campylobacter jejuni* türleri gibi, insan sindirim sisteminde hastalık meydana getiren bakterilerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. *C. jejuni*, ABD'de her yıl yaklaşık 2.4 milyon besin zehirlenmesi vakasına yol açan yaygın bir tavuk bulaşkanıdır.

maktadır. Bilim insanları, patojenlerin genomları hakkında bilgi donanımına sahip olarak, çiftlik türlerinin patojenlere dayanıklılıklarını artırmak amacıyla bağışıklık sistemlerini desteklemeyi hedeflemektedir. Örneğin, *P. salmonis* genleri veya proteinleri, somona aktarılarak bunların bağışıklık sistemini bu bakterinin enfeksiyonuyla savaşması için uyaracak bir aşı gibi kullanılabilir.

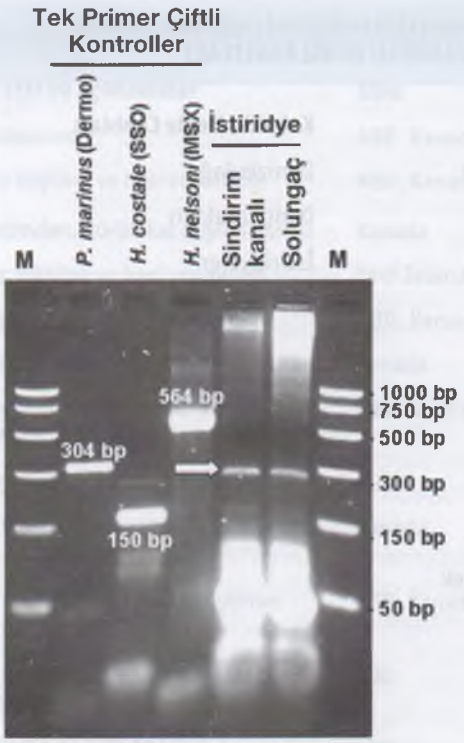
Benzer genom çalışmaları, zehirli deniz yosunu olan ve bilim insanlarının North Carolina haliçlerindeki büyük balık ölümlerinden ve kabuklu deniz hayvanlarının hastalıklarından sorumlu tuttukları *Pfiesteria piscicida*'nın genetiğini aydınlığa kavuşturmak için de yürütülmektedir. *P. piscicida* aynı zamanda orta-Atlantik'ten Gulf Coast'a kadar çeşitli su ürünleri tesislerinde de balık ölümlerine ve hastalıklarına neden olmuştur. *P. piscicida* balıklarda lezyonlara, iç kanamalara ve enfekte balıkların ölümüne yol açabilecek başka semptomlara da neden olmaktadır. Bu patojenin özellikle büyük balık ölümlerinin etkisi altında kalan bazı kıyı kesimlerinde yaşayan kişiler arasında histeri boyutuna varan derecede dikkat çekmesinin nedenlerinden biri de, *P. piscicida* toksinlerinin insanlarda da ciddi sağlık sorunlarına yol açabileceğinin kanıtlanmış olmasıdır.

Bilim insanları ABD'nin çeşitli bölgelerinde ticari istiridye avcılığını yok olma noktasına getiren hastalık ve parazitlerle savaşımda moleküler yaklaşımların kullanılması üzerinde çalışmaktadır. İstiridyeler ülke çapında kuşatma altında bulunmaktadırlar. Aşırı avlanmanın, kirliliğin, doğal yaşam alanlarının zarar görmesinin yanı sıra, parazitik ve viral hastalıkların bir sonucu olarak, daha önceleri insan tüketimi için zengin istiridye kaynağı olarak bilinen birçok bölgede istiridye

varlığı yok olmuştur. Protozoalar ABD'nin doğusunda istiridye kitleleri üzerinde büyük zararlara yol açmıştır. Dermo (*Perkinsus marinus*), SSO (*Haplosporidium costale*) ve MSX (*Haplosporidium nelsoni*) parazitleri, Maryland'deki Chesapeake Koyu ve New Jersey'deki Delaware Koyu gibi bölgelerde bulunan doğu istiridyesi (*Crassostrea virginica*) populasyonlarını tahrip etmişlerdir. Benzer sorunlar Gulf Coast ve California'da da meydana gelmiştir.

Şimdiye dek bu hastalıklarla savaşımda yaşanan zorlukların bir kısmı, çalışmak için yeterli miktarda parazitin olmayışından kaynaklanmaktaydı. Bu sorunun üstesinden gelmek için hücre kültürü yöntemleri kullanıldı ve şimdi araştırıcılar Dermo, SSO ve MSX'in moleküler biyolojisi hakkında çok fazla şey öğrenmekteler. Bu parazitlerin yaşam döngüsü hakkında bilgi edinebilmek için moleküler yöntemler kullanılmıştır ve dış alanlar ile su ürünleri tesislerinde bu parazitlerin belirlenmesinde yararlanılabilecek moleküler problar şu an kullanıma hazır durumdadır. Örneğin; Dermo, SSO ve MSX'in hızlı ve duyarlı bir şekilde belirlenmesini sağlayarak, geniş çaplı enfeksiyonlar meydana gelmeden su ürünleri yetiştiricilerine hasta istiridyeleri tarama ve belirleme olanağı sunan PCR temelli yaklaşımların, oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır (**Şekil 10.8**).

İstiridyelerin bağışıklık sistemiyle ilişkili genler hakkında daha fazla bilgi edinilmiş olması; hastalık dayanıklılığı genlerinin Pasifik istiridyesi (*Crassostrea gigas*) gibi türlerden *C. virginica* gibi hastalık riskine daha açık doğu istiridyelerine aktarılması için yeni yöntemler geliştirilmesini de sağladı. Gelecekte bu ve diğer parazitlerin meydana getirdiği zararlara karşı dayanıklılık sağlayacak genler taşıyan transgenik istiridyelerin üretilmesi mümkün olabilir.



ŞEKİL 10.8 İstiridye DNA'sının Belirlenmesinde PCR Kullanılabilir Dermo, SSO ve MSX istiridyelerin ölümüne yol açan önemli etkenlerdir. Bu kabuklu deniz hayvanlarında meydana gelecek ve istiridyelerin büyük populasyonlarını ortadan kaldırabilecek olan enfeksiyonların kontrol altında tutulması amacıyla, bu patojenlerin ortamda ne zaman bulunduğunun anlaşılması konusunda bilim insanlarına yardımcı olması açısından, istiridye dokularında bu patojenlere ait DNA'ların belirlenmesi için PCR'dan yararlanılabilir. Bu örnekte, bir istiridyenin sindirim kanalı ve solungaçlarından alınan DNA örneklerinin, Dermo DNA'sının varlığını ortaya koyduğuna dikkat edin (okla gösterilmiştir). M, DNA büyüklük markörleri.

Genomik ve akuatik organizmalar

Bilindiği üzere, genomik yaklaşımları birçok akuatik organizmanın genomlarını incelemek amacıyla kullanılmaktadır. Uluslararası bir bilim insanı grubu denizkestanesinin genomunun dizilenmesini tamamladı. Denizkestaneleri, denizyıldızı ve denizhıyarını da kapsayan bir deniz hayvanları grubu olan derisi dikenlilerdendir. Denizkestanelerinin kökeninin 540 milyon yıldan daha öncesine dayandığı düşünülmektedir. Denizkestanelerinin genomları moleküler biyologların yoğun ilgisini çekmektedir, çünkü denizkestaneleri insanlarla ortak atalara sahiptir. Bu atadan Deuterostomlar denen bir hayvan üst şubesi doğmuştur ve derisi dikenliler, insanlar ve diğer omurgalılar bu şubeye dâhildir. Deuterostomlar birbirlerine bu üst şubede olmayan hayvanlardan daha yakın olduğundan, genom bilimciler denizkestanelerinin genetik olarak insanlara benzer olabileceğini düşünmektedirler. Karşılaştırmalı genetik çalışmaları denizkestaneleriyle duyma, denge, bağışıklık ve gelişmeyle ilgili olanların dâhil olduğu yaklaşık 7 000 geni paylaştığımızı göstermiştir. Bu nedenle denizkestanelerinin, hem akuatik genomları hem de insan genomunu inceleyen moleküler biyologlar için çok önemli deneysel model organizmalar olmayı sürdüreceğini tahmin ediyoruz.

Balıkların ve Kabuklu Deniz Canlılarının Genetik Manipülasyonu

Tüm dünyadaki biyologlar, artırılmış büyüme oranı ve hastalık direnci gibi istenen özelliklere sahip balık ve kabuklu deniz canlısı türleri meydana getirmek için genetik yöntemler kullanmaktadırlar. Tablo 10.2'de çeşitli amaçlar için genetiği değiştirilmiş farklı türler gösterilmiştir.

Genetiği değiştirilmiş türler: transgenikler ve triploidler

Transgenik organizmaların (transgeniklerin) nasıl yapılabileceğini daha önce tartışmıştık. Diğer transgenikler

TABLO 10.2 GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ BALIKLAR VE KABUKLU DENİZ CANLILARI

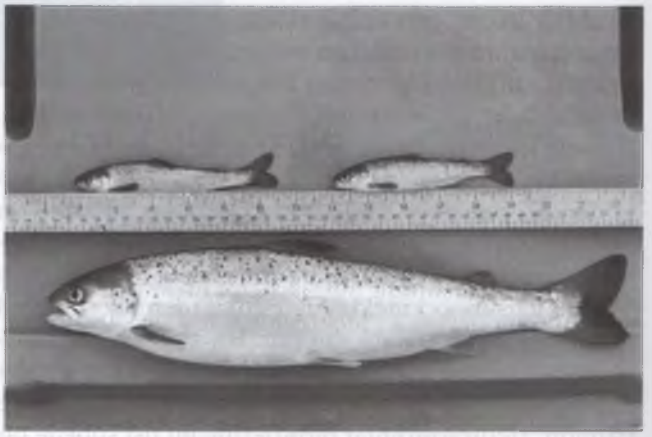
Balık Türleri	Kabuklu Deniz Canlıları
Atlantik somonu	Denizkulağı
Karagöz	Deniztarakları
Nehir kedibalığı	İstiridyeler
Kral somonu	
Coho somonu	
Pullu sazan	
Çipura	
Japon balığı	
Yıllık balığı	
Büyük siyah levrek	
Çopra balığı	
Medaka	
Çamur sazanı	
Küçük kaya balığı	
Turna balığı	
Penaeid karides	
Gökkuşağı alabalığı	
İzmarit	
Çizgili levrek	
Tilapia	
Sudak	
Zebra balığı	

Kaynak: Goldberg, R., and Triplett, T. (2000): *Something Fishy*. Environmental Defense, www.environmentaldefense.org'dan uyarlanmıştır.

gibi transgenik balıklar da diğer türlerden gelen DNA içerir ve akuakültür endüstrisiyle birlikte transgenik balıklara olan ilgi artmaktadır. Akuakültür yetiştiricileri, daha hızlı ve sağlıklı büyümeleri için tasarlanmış, genetiği değiştirilmiş, balıklar üretmek için rekombinant DNA teknolojisine ilgi duymaktadır.

Tablo 10.3'te gösterildiği gibi, birçok tür akuakültür endüstrisindeki potansiyel uygulamalar için genetik olarak değişikliğe uğratılmıştır. Gelişimi hızlandırmak, soğuğa dayanımı artırmak ve et kalitesini iyileştirerek sunum kalitesini yükseltmek amacıyla, balıklara ve kabuklu deniz canlılarına yabancı genler aktarılmıştır. Her ne kadar transgenik mısır, soya fasulyesi ve domates türleri ABD'de yıllardır kullanılıyor olsa da, hiçbir transgenik balık insan tüketimi için FDA tarafından onaylanmamıştır. A/F Protein A.Ş., AFP genlerini içeren transgenik balıkları piyasaya sürmek için bu kurumdan onay talep etmiştir. Birçok diğer şirket de transgenik balıkların satışı için FDA onayı beklemektedir. Genetiği değiştirilmiş besinlerin tüketimi söz konusu olduğunda, özellikle deniz ürünlerinde, dünyadaki en açık görüşlü ülke Küba'dır. Benzer şekilde Norveç şirketleri, normalinden yaklaşık iki kat daha hızlı büyüyen çiftlik üretimi genetiği değiştirilmiş tilapia geliştirmişlerdir.

Massachusetts'te bulunan Aqua Bounty Technologies, kral somonuna (*Oncorhynchus tshawytscha*) – Atlantik somonlarından daha hızlı büyüyen ve erginleri daha büyük olan bir tür – ait GH geni ve bir gen düzenleyici dizi ile *okyanus mezgiti* denilen yılan balığı benzeri bir organizmaya ait düzenleyici bir dizilim içeren, transgenik Atlantik somonunu üretti. Atlantik somonu normalde kışın gelişimini durdurur, fakat transgenik olmayan somonlardan % 400-600 kadar daha hızlı büyüyen bu transgenik somonlarda durum böyle değildir (**Şekil 10.9**). Bu balıklar piyasaya sunulacak büyüklüğe 30 ay yerine 18 ayda ulaşır. Yabani somonla kıyaslandığında besin değeri, görünüm ve tat yönünden bu balıkların hiçbir fark taşımadığını gösteren verilere sahip olmasına karşın, Aqua Bounty 10 yıldan fazla süredir FDA onayı almaya çalışmaktadır. 2009'da, FDA hayvanlarda meydana gelen genetik değişimleri veterinerlik ilaçlarıyla aynı sınıflamaya almıştır. 2011 başı itibarı ile, FDA hala bu transgenik somonların onaylanmasını tartışıyordu. Bu somonun çevreye olan etkileri, en temel risk kaygılarından biri olmayı sürdürüyor. Aqua Bounty ise, bu transgenik somonların tamamının dişi ve bunların yaklaşık % 99,8'inin kısır *triploidler* (bir sonraki sayfanın başındaki triploid tartışmasını inceleyin) olduğunu söylemektedir.



ŞEKİL 10.9 Transgenik Somon Büyüme hormonu genlerini normalden daha fazla eksprese eden transgenik somon, transgenik olmayan yabani somon türlerine kıyasla çok daha hızlı gelişme oranları gösterir. Bu transgenik somon türleri, transgenik olmayanlardan ortalama 10 kat daha fazla ağırlığa sahiptir.

TABLO 10.3 SU KÜLTÜRÜNDE KULLANIM İÇİN TEST EDİLMEKTE OLAN GENETİĞİ DEĞİŞTİRİLMİŞ TÜRLERE BAZI ÖRNEKLER

Tür	Yabancı Gen	İstenen Etki ve Açıklamalar	Ülke
Atlantik somonu	AFP	Soğuğa dayanım	ABD, Kanada
	AFP, somon GH	Artırılmış büyüme ve besi verimliliği	ABD, Kanada
Coho somonu	Kral somonu GH + AFP	1 yılın ardından, 10-30 kat büyüme artışı	Kanada
Kral somonu	AFP, somon GH	Artırılmış büyüme ve besi verimliliği	Yeni Zelanda
Gökkuşağı alabalığı	AFP, somon GH	Artırılmış büyüme ve besi verimliliği	ABD, Kanada
Kesikboğaz alabalık	Kral somonu GH + AFP	Artırılmış büyüme	Kanada
Tilapia	AFP, somon GH	Artırılmış büyüme ve besi verimliliği; stabil kalıtım	Kanada, İngiltere
	Tilapi GH	Artırılmış büyüme ve stabil kalıtım	Küba
	Değiştirilmiş tilapi insülin üretim geni	Şeker hastaları için insan insülini üretimi	Kanada
Somon	Gökkuşağı alabalığı lizozom geni ve dilbalığı pleurosidin geni	Hastalık dayanıklılığı; hala geliştirme aşamasında	ABD, Kanada
Çizgili levrek	Böcek genleri	Hastalık dayanıklılığı; araştırmalar henüz ilk aşamalarda	ABD
Nehir kedibalığı	GH	Kültür koşullarında % 33 büyüme artışı	ABD
Pullu sazan	Somon ve insan GH	Kültür koşullarında % 150 büyüme artışı; artırılmış hastalık dayanıklılığı; düşük oksijen koşullarına tolerans	Çin, ABD
Japon balığı	GH, AFP	Artırılmış büyüme	Çin
Denizkulağı	Coho somonu GH + çeşitli promotörler	Artırılmış büyüme	ABD
İstiridye	Coho somonu GH + çeşitli promotörler	Artırılmış büyüme	ABD
Tavşan	Somon kalsitonin geni	Kemiklerden kalsiyum kaybının kontrolü için kalsitonin üretimi	İngiltere
Çilek ve patates	AFP	Artırılmış soğuk toleransı	İngiltere, Kanada

Not: Transgenik organizmaların geliştirilmesi, ilgilenilen genin ve bu genin ekspresyonunu düzenleyen anahtar olan bir promotörün aktarılmasını gerektirir. AFP, antifriz protein geni (Kuzey denizi yassıbalığı); GH, büyüme hormonu geni.

2004'te, Texas, Austin'de bulunan Yorktown Industries denizşakayığına ait kırmızı floresan proteinini taşıyan transgenik bir zebrabalığı çeşidi olan GloFish'i ürettiğini açıkladığında manşetlere konu olmuştu. Ultraviyole ışıkla aydınlatıldığında parlak pembe floresan ışık yayan GloFish, ABD'de satılan genetiği değiştirilmiş ilk evcil hayvan olarak tanıtılmıştı. Bazı biyoteknoloji karşıtı gruplar ise, genetik mühendisliğinin bu yeni kullanım alanına karşı itirazlarını ettiler.

Transgenik türler, genetiği değiştirilmiş deniz türlerinin en yaygın tipi olsa da; çeşitli **poliploid** türler de meydana getirilmiştir. Poliploidler, artırılmış sayıda *tam kromozom takımları* taşıyan organizmalardır. Daha önce değinmiş olduğumuz gibi, çoğu bitki ve hayvan türü **diploid**dir ($2n$ olarak kısaltılır, n = kromozom sayısı);

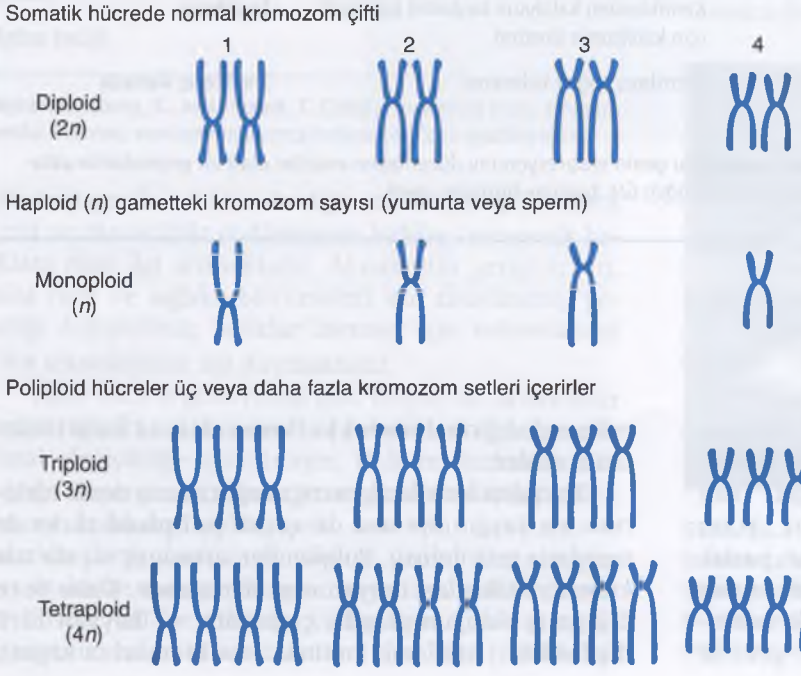
yani bu, somatik hücrelerinde iki kromozom takımı, eşey hücrelerinde ise bir ya da **haploid** (*n*) sayıda kromozom taşıdıkları anlamına gelir. İnsanlarda haploid kromozom sayısı 23'tür; bu nedenle insan vücut hücrelerindeki diploid kromozom sayısı 46'dır ($2n = 46$). **Şekil 10.10**'da haploid, diploid ve poliploid türler arasındaki farklılıklar basit bir şekilde gösterilmiştir.

Günümüze değin meydana getirilmiş poliploid deniz canlıları **triploid** türlerdir. Triploid organizmalar üç kromozom takımı içerirler ($3n$). Triploid organizma oluşturmak için birçok farklı yöntem kullanılabilir. Triploidler, genellikle, balık yumurtalarını sıcaklık değişimine ya da kimyasal uygulamalara maruz bırakarak yumurtadaki hücre bölünmesine müdahale edilmesiyle elde edilir. Bu uygulamalardan geçirilen yumurta, fazladan bir kromozom takımıyla olgunlaşır.

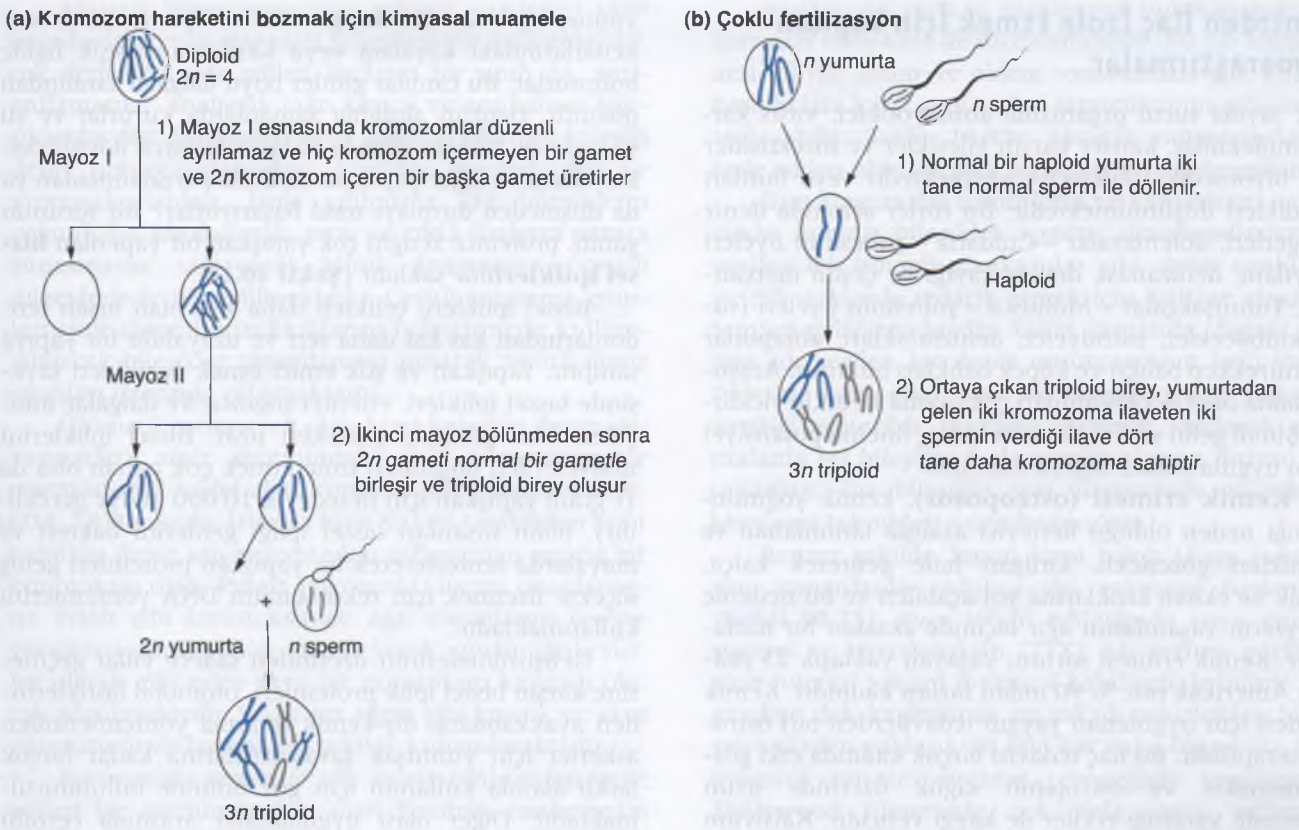
Örneğin, yumurtalara güzçiğdemi (*Colchicum autumnale*) çiçeğinden elde edilen bir kimyasal olan **kolkisin** uygulanması, poliploidlerin meydana getirilmesinde kullanılan yaygın bir yaklaşımdır (**Şekil 10.11a**). Kolkisin, hücre bölünmesi için gerekli olan mikrotübüllerin oluşumunu engelleyerek hücre bölünmesini durdurur. Bunun sonucunda, işlem görmüş yumurta hücrelerinde kromozomlar eşlenir, fakat bu hücrelerin bölünme yeteneği yoktur. Bu nedenle bu yumurtalar, normal kromozom sayısının iki katı yani, diploid sayıda kromozoma sahip olurlar. Böyle bir yumurtanın normal bir haploid sperm hücresiyle döllenmesi sonucunda triploid bir organizma oluşur. Triploidlerin oluşturulması için başka bir yaklaşım da, normal bir haploid yumurta hücresinin, iki sprem hücresiyle döllenmesi şeklindedir (Şekil 10.11b). Meydana gelen embriyo, yumurtadan bir kromozom takımı ve iki farklı spermin her birinden de birer kromozom takımı içeren bir triploiddir.

Poliploidi genellikle bir organizmanın büyüme özelliklerini etkiler. Örneğin triploidler genelde daha hızlı büyürler ve bu çoğu türde % 30'dan % 50'ye kadar artan oranlardadır; ayrıca normal diploid kuzenlerinden daha büyüktürler. Ancak çoğu triploid kısırdır, çünkü olağan dışı miktarda kromozom içeren eşey hücreleri meydana getirirler; hatta bazı durumlarda triploidler hiç eşey hücresi oluşturmayabilir. Yaygın olarak kullanılan ilk triploid balık türlerinden biri, triploid ot sazanıdır (*Ctenopharyngodon idella*). Ot sazanı, suda yaşayan birçok bitki türüne karşı doymak bilmez bir iştah duyar. 1960'ların başlarında, ABD Balık ve Yaban Hayatı Dairesi, Malezya'dan diploid ot sazanı ithal etti. 1980'lerin başlarındaysa, yumurtalara uygulanan ısı şokuyla diploid yumurtalar elde edilip bunlar normal haploid spermle döllenerek, triploid ot sazanları geliştirildi. Triploidler hızlı büyürler ve ağırlıkları 11 kg'ı geçebilir. Çok fazla miktarda bitki tüketebilme yetenekleri nedeniyle ot sazanları, tatlısu havuzları ve göllerdeki yabancı ot gelişiminin kontrolünde, tüm ABD'de çok fazla kullanılır olmuştur. Göllerde yüksek miktarlarda kimyasal herbisit kullanımına olan gereksinimi en aza indiren bu balıkların triploid formları, göl ve gölet yöneticileri için ot gelişiminin kontrolünde "doğal" bir çözüm olarak, bir acil durum kurtarıcısı haline gelmiştir.

Triploid ot sazanları herkesi mutlu etmemiştir. Bazı su geçitlerinde aşırı derecede üreyen ot sazanları (ot sazanının az sayıda doğal predatörü vardır) yolları üzerindeki bitki örtüsünü öyle etkin bir şekilde yediler ki, su kalitesi ciddi boyutta değişti. Alabalık ve lev-



ŞEKİL 10.10 Poliploid Türler Tam Kromozom Takımlarında Farklılıklar Taşır Birçok bitki ve hayvana ait somatik hücre diploid sayıda kromozom taşırken, eşey hücreleri tek kromozom takımına veya haploid sayıda kromozoma sahiptir. Poliploidler üç ya da daha fazla sayıda kromozom takımı içerir. Diploid miktarda ($2n$) 8 kromozom taşıyan bir organizmaya ait kromozomlar gösterilmiştir. Tetraploid ($4n$) ve pentaploid ($5n$) organizmalar da üretilebilse de, poliploid sucul türlerin büyük çoğunluğunu triploidler ($3n$) oluşturmaktadır.



ŞEKİL 10.11 **Bir Triploid Üretmek** (a) Yumurta hücreleri, hücre bölünmesi boyunca kromozom hareketi engellenip diploid yumurtalar elde etmek amacıyla kimyasal işlemlerden geçirilebilir. Bu yumurtalar normal haploid sperm hücreleriyle döllendiğinde, triploid yavrular üretilmiş olur. (b) Normal haploid yumurtanın, normal iki haploid spermle döllenmesiyle de bir triploid meydana getirilebilir.

rek gibi balıklarca yaşam alanı olarak kullanılan otlarda meydana gelen bu önemli azalış, öncelerde balık yönünden çok verimli olan sulardaki balık avcılığında önemli bir gerilemeye neden oldu. Ayrıca birçok triploid bulundurulduklarını yerlere komşu olan sulara kaçarak, bataklıklar ve doğal göller gibi yabancı ot kontrolü amacı güdülmeyen alanlarda bitki örtüsü kaybına yol açtı. Son olarak, kısır oldukları varsayılan bu balıkların üreyebildikleri de belgelendi.

Başka bir poliploidi başarı öyküsünde de, Batı Yakası'nda bitmekte olan istiridye endüstrisini canlandırdığına inanılan triploid istiridyeler yer alır. İstiridye üretimi mevsimliktir, çünkü hava koşullarından, yetiştirme biçimlerinden ve yaşam alanlarından çok fazla etkilenir. Pasifik istiridyesinin bir triploid çeşidinin geliştirilmesiyle, tüm yıl boyunca hasat olanağı sağlanması yanında, triploid istiridyeler diploid akrabalarına göre çok daha fazla büyüme gösterdiler. Diploidler normalde şekerleri dokularında saklar ve yaz aylarında yavrulamak için enerji harcadıklarında cılızlaşırlar. Cılız istiridyeler ise piyasada talep görmez. Triploidler yavrulamadığından, yaz boyunca etlenirler ve böylece satışa uygun hale gelirler.

Bir sonraki altbaşlıkta sizlere, suda yaşayan organizmaların önemli tıbbi uygulamalarından bazılarını anlatacağız.

10.4 Akuatik Biyoteknolojinin Tıbbi Uygulamaları

Akuatik organizmalardan oldukça az sayıda tıbbi ürün elde edilmiştir, ancak bu durum hızlı bir şekilde değişmektedir. Bilim insanları, okyanusların ve tatlısu doğal yaşam ortamlarının, tıbbi ürünlerin belirlenmesi açısından neredeyse sınırsız olanaklara sahip olduğunu düşünmektedir. Gelecekte akuatik organizmalardan yeni ve önemli ilaç çeşitlerinin elde edileceği ve insan yararına sunulabileceği ve insan hastalıklarının anlaşılması, tanılanması ve tedavi edilmesinde sucul organizmaların biyomedikal modeller olarak kullanılabileceği düşünülmektedir. Sucul türler üzerinde yapılan biyoaraştırmalar tüm dünyada sürüyor ve dünyadaki tüm suların yeni tıbbi tedaviler sağlayacağı konusunda iyimser olmak için nedenlerimiz var.

Denizden İlaç İzole Etmek İçin Yapılan Biyoaraştırmalar

Çok sayıda sucul organizma antibiyotikler, virüs karşıtı moleküller, kanser karşıtı bileşikler ve insektisitler gibi biyomedikal bileşikler içermektedir veya bunları içerdikleri düşünülmektedir. Bu türler arasında deniz süngerleri, Sölenteralar – Cnidaria – şubesinin üyeleri (suyılanı, denizanası, denizşakayığı ve çeşitli mercanlar), Yumuşakçalar – Mollusca – şubesinin üyeleri (sümüklüböcekler, istiridyeler, deniztarakları, ahtapotlar ve mürekkep balığı) ve köpek balıkları bulunur. Araştırılmakta olan deniz canlıları çok sayıda ve etkileyicidirler. Şimdi gelin su ürünlerinin birkaç önemli potansiyel tıbbi uygulamasını değerlendirelim.

Kemik erimesi (osteoporoz), kemik yoğunluğunda neden olduğu ilerleyici azalışla tanımlanan ve kemikleri gözenekli, kırılgan hale getirerek kalça, bacak ve eklem kırıklarına yol açabilen ve bu nedenle bireylerin yaşamlarını ağır biçimde aksatan bir hastalıktır. Kemik erimesi sorunu yaşayan yaklaşık 25 milyon Amerikalı'nın % 90'ından fazlası kadındır. Kemik erimesi için uygulanan yaygın tedavilerden biri östrojen terapisidir. Bu ilaç tedavisi birçok kadında etki göstermemekte ve östrojenin sağlık üzerinde uzun dönemde yarattığı etkiler de kaygı vericidir. Kalsiyum alımını ve kemik kalsifikasyonunu düzenleyen osteoklast adlı kemik yıkım hücrelerini durduran bir tiroid hormonu olan, insan rekombinant **kalsitonini** ile tedavi edilen bireyler de vardır. Araştırıcılar bazı somon türlerinin, insan kalsitonininden 20 kat daha fazla biyolojik etkinliğe sahip bir kalsitonin formu ürettiğini belirlediler. Klonlanmış somon kalsitoninleri, enjeksiyon biçminde ve burun spreyi olarak kullanıma hazır durumdadır.

Mercan kayalıklarının ince bir güzelliğe sahip desenlerini, mercan iskeletleri meydana getirir. Bu yapılar, kısmi olarak, insanlar ve hayvanlarda kemik ve kıkırdakları oluşturan ana yapının önemli bir bileşeni olan **hidroksiapatitten (HA)** oluşur. Biyoteknoloji şirketi Interpore International, HA implantlarının küçük kutucuklar halinde kesilerek kırılmış kemiklerdeki boşlukların doldurulmasında kullanılmasını sağlayan bir teknoloji geliştirdi. Vücuttaki bağ dokularının içi bu kutularla kaplanarak iyileşme hızlandırılır. Sonuç olarak, hastalara bedenlerinin diğer kısımlarından alınan kemik aşıları yapılmasına gerek kalmaz. Bu doku aşıları (implant) diş kökü çevresindeki kayıp kemik materyalinin doldurulması için de kullanılabilir.

Benzer şekilde, midye ve diğer kabuklu deniz canlıları tarafından üretilen tutkal benzeri reçinelerde birçok farklı yapışkan belirlenmiştir. Birçok deniz ürünü restoranının en beğenilen yemeklerinden biri midyelerdir (*Mytilus edulis*); bunlar sert, zorlu fiziksel koşullara sahip çevrelerde yaşayan, açılır kapanır kabuklara sahip yumuşakçalardır. Bunlar genellikle okyanus ya da koy kenarlarındaki kayalara veya kazıklara yapışık halde bulunurlar. Bu canlılar günler boyu dalgalar tarafından dövülür. Denizin alçaldığı zamanlarda kururlar ve su yükselince yine su altında kalıp dalgalarca dövülürler. Kayaların ve diğer yapıların üstünde parçalanmadan ya da düşmeden durmayı nasıl başarıyorlar? Bu sorunun yanıtı, proteince zengin çok yapışkan bir yapı olan **bissel iplikleri**nde saklıdır (**Şekil 10.12**).

Bissel iplikleri, çelikten daha sert olan insan tendonlarından kat kat daha sert ve uzayabilir bir yapıya sahiptir. Yapışkan ve şok emici esnek özellikleri sayesinde bissel iplikleri, enerjiyi soğurur ve dalgalar midyeleri tüm gücüyle çekerken uzar. Bissel ipliklerini midyelerden doğrudan izole etmek çok pahalı olsa da (1 gram yapışkan için neredeyse 10 000 midye gereklidir), bilim insanları bissel ipliği genlerini bakteri ve mayalarda sentezleterek bu yapışkan proteinleri geniş ölçekte üretmek için rekombinant DNA yöntemlerini kullanmaktadır.

Geliştirilmelerinin üzerinden sadece yıllar geçmesine karşın bissel iplik proteinleri, otomobil lastiklerinden ayakkabılara, diş-kemik onarma yöntemlerinden askerler için yumuşak savaş zırhlarına kadar birçok farklı alanda kullanım için göz önünde bulundurulmaktadır. Diğer olası uygulamalar arasında cerrahi dikiş iplikleri ve doku aşısı olarak kullanılabilecek yapay tendonlar ve bağlar yer almaktadır.



ŞEKİL 10.12 Midyeler Benzersiz Yapıştırıcılar Üretir Midyeler ve diğer kabuklu deniz canlıları, bissel ipliği denen benzersiz bir yapışkan türü üreterek, kayalara ve diğer yüzeylere sıkıca tutunurlar. Bissel iplikleri çok güçlüdür. Bu iplikler, midyelerin yaşadığı sulardaki dalgaların meydana getirdiği gibi, zorlu fiziksel şiddetlere karşı koyabilir.

Akuatik biyoteknolojinin gelecek vaadeden tıbbi uygulamalarında insanları iyileştirmede kullanılabilecek denizden elde edilen ilaçların bir sınıfı da, anti-enflamatuar, analjezik (ağrı kesici) ve antikanser bileşiklerdir. Bir düzineden fazla farklı antikanser bileşiği deniz omurgasızlarından, özellikle süngerlerden ve yumuşakçalardan, izole edilmiştir. Bu bileşiklerin çoğunluğu, ideal olarak, yeni ve etkili ilaçların pazara sunulmasını sağlayacak klinik denemelerin çeşitli düzeylerinde test edilmektedir. Çeşitli araştırma grupları sinir sistemi bozukluklarını iyileştirmede kullanılabilecek bileşikler tanımlamayı umarak zehirli deniz canlıları üzerinde çalışmaktadır.

Ölümcül potansiyeli olan koni kabuklu deniz salyangozları, sinir sistemindeki özel nörotransmitör reseptörlerini hedef alan konotoksinler üretmektedir. FDA 2004 yılında, İrlanda Elan Şirketi tarafından koni kabuklu deniz salyangozundan saflaştırılan peptid bir konotoksin olan, **Prialt** (zikonotid) ilacını onaylamıştır. Prialt gibi konotoksinler, ağrı mesajlarını beyine gönderen nöral yolları engelleyerek, güçlü ağrıkesiciler olarak etki eden yeni bir nörotoksin kaynağı olarak görülmektedir. Prialt sırt ağrısı gibi kronik ve akut ağrı türlerinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır.

Ecteinascidia turbinate adlı deniz canlısından izole edilen bir antitümör ilacı olan Yondelis (trabestedin veya ekteinasidin) yumuşak doku sarkomları ve yumurtalık kanserinin tedavisi için Avrupa Komisyonu ve FDA tarafından yetim ilaç (az görülen hastalıkları tedavi eden) statüsünde kabul edilmiştir. Yondelis ayrıca prostat ve meme kanseri tedavisinde faz II denemelerinde kullanılmaktadır. Yondelis DNA'nın küçük oyuğuna bağlanır ve transkripsiyon ve DNA tamir proteinlerinin çalışmasını engelleyerek hücre bölünmesini önler.

Araştırıcılar mercan özütlerinde bulunan anti-enflamatuar bileşikleri de incelemektedir. Bu tür bileşikler deri tahrişi, astım ve eklem romatizması gibi iltihaplı hastalıklara karşı yeni tedavi stratejilerinin gelişmesini sağlayabilir. Tablo 10.4'te akuatik organizmalardan izole edilen tıbbi bileşiklerin örnekleri listelenmiştir.

Bazı araştırıcılar tümörlerin ve kanserlerin tedavisinde önemli bileşikler içeren, dinoflagellatlar adı verilen tek hücreli planktonlar gibi, deniz canlılarını yeterli miktarda tedarik etmek için kültüre alma sistemleri geliştirmektedir. Yakın zamanda, *Bagula neritina* adı verilen bir deniz omurgasızının belli lösemi tiplerine karşı etkili olan bir bileşiği çok az miktarda ürettiği gösterildi. İnsanlar üzerinde yapılacak çalışmalarda bu bileşiğin fazlaca miktarlarına ihtiyaç olacağından, bu bileşiğin seri üretiminde moleküler klonlama teknikleri önemli olacaktır.

Benzer şekilde Japon kirpi balığı (*Fugu rubripes*) son zamanlarda oldukça ilgi çekmeye başlamıştır (**Şekil 10.13**). *Fugu* tehdit edildiğinde suyu yutarak şişmesi ve tetrodotoksin (TTX) adı verilen güçlü bir sinir hücresi toksini üretmesi kabiliyetiyle bilinir. TTX şimdiye dek keşfedilmiş en toksik zehirlerden biridir (siyanürden yaklaşık 10 000 kat daha ölümcül). *Fugu* ölümcül zehirini üretme yeteneğiyle sergilenerek, Hollywood filmlerinde çok defa tasvir edilmiştir. Japonya'da, riskine rağmen, bu tadı güzel balığın zevkini çıkaran pek çok suşi sever için *Fugu* değerli ve çok pahalı bir besindir (Fugu yemek, çoğu Japonya'da olmak üzere, her yıl yaklaşık 100 insanın ölümüne neden olmaktadır).

Bilim insanları sodyum kanalları adı verilen proteinlerin nöronlara elektriksel sinyaller göndermede nasıl yardımcı olduğunu derinlemesine anlamada TTX'i kullanmıştır. TTX sodyum kanallarını bloke



ŞEKİL 10.13 Kirpi balığı gibi deniz canlıları insanlarda kanser ve kronik ağrıların tedavisine yeni yollar bulmada bilim insanlarına yardımcı olmaktadır

TABLO 10.4 AKUATİK ORGANİZMALARDAN ELDE EDİLEN TIBBİ BİLEŞİKLERE ÖRNEKLER

Organizma	Tıbbi Ürün	Uygulama
Afrika tırnaklı kurbağası (*Xenopus laevis*)	Magaininler	Antimikrobiyal peptidler ilk olarak kurbağa derisinde keşfedilmiştir. Bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılmaktadır.
Coho somonu (*Oncorhynchus kisutch*)	Kalsitonin	Kemik hücrelerince kalsiyum alımını uyaran hormon. Osteoporoz tedavisinde kullanılır.
Çekiç başlı köpekbalığı (*Sphyrna lewini*)	Neovastat	Antianjiyogenik bileşik (kan damarı oluşumunu engeller). Kanser tedavisinde kullanılır.
Sülük (*Hirudo medicinalis*)	Hirudin	Kanı sulandırmak için antikoagulant (pıhtılaşmayı engelleyici) olarak kullanılan sülük tükrük peptidi.
Koni deniz salyangozu (*Conus magus*)	Prialt (zikonotit)	Kronik şiddetli ağrıların ve artritisin tedavisinde rahatlatıcı olarak kullanılan sentetik peptid toksin.
Deniz süngeri (*Halichondria okadai*)	Eribulin	Meme kanseri tedavisinde kullanılan kemoterapi bileşiği.
Deniz üzümü (*Ecteinascidia turbinata*)	Yondelis (trabectedin)	İlerlemiş yumuşak doku sarkomlarına müdahale için geliştirilmiş antitümör ajanı.

ettiği ve sinir impulslarının iletimini engellediği için ölümcül bir zehirdir. TTX' in sodyum kanallarını nasıl etkilediğinin anlaşılması, sadece farklı türlerde kronik ağrılı hastalara uygulamada anestetik olarak değil, insanlarda antikanser ajanlar olarak test edilmekte olan yeni ilaçların da geliştirilmesine yol açtı. Araştırıcılar insanla yaklaşık aynı sayıda gen içeren fakat çok daha küçük olan kirpi balığı genomunun dizilenmesi üzerinde de çalışmaktadır. *Fugu* insan genomundan çok daha az kodlanmayan DNA (intron) içermektedir ve dolayısıyla intronların önemini araştırmak için ideal bir model organizma sayılmaktadır.

İlk olarak köpekbalıklarında (*Squalus acanthias*) tanımlanan skualamin adı verilen bir steroid, AIDS ve kanser gibi durumlarda hastaları öldürebilecek derecede hayatı tehdit eden fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilecek güçlü bir antifungal ajan olarak ortaya çıkmaktadır. Köpekbalıkları nadiren kansere yakalanır (kansere yakalanmadıklarına dair bir efsane de mevcuttur) ve köpekbalığı kıkırdağı zengin bir antikanser ajanı olarak önerilmektedir. Köpek balığı kıkırdağından elde edilen hiçbir bileşiğin kontrollü klinik denemelerde etkinlik göstermemesine karşılık, kıkırdak ekstraktları *antianjiyogenik* bileşikler içermektedir ve bu ekstraktlar çeşitli düzeylerde klinik denemelerde kullanılmaktadır. **Anjiyogenez** veya kan damarı oluşumu pek çok tümör tipinin büyüme ve gelişmesi için gerekli olan bir süreçtir. Deniz türlerinden elde edilen antianjiyogenik bileşikler, kan damarı oluşumunu engelleyerek, belli tümörlerin büyümesini önlemede umut vaat etmektedir.

Ayrıca akuatik canlıların çoğu ağır şartlar altında yaşadıklarından, bilim insanları bu organizmaların geliştirdiği adaptasyonları öğrenerek fayda sağlanabileceği konusunda iyimserdir. Örneğin, araştırıcılar halen ultraviyole ışığa tolerans gösteren deniz canlılarını incelemekteler, bu araştırmaların sonucunda bu canlılar doğal güneş yansıtıcıları için bir kaynak olabilir. Diğer bir örnek; timsahlar mikroplarca istila edilmiş sularda yüzmesine rağmen timsah yaraları enfeksiyona önemli derecede dayanıklıdır. Bilim insanları timsahların modern antibiyotiklere karşı direnç kazanmış MRSA (metisilin-dirençli *Staphylococcus aureus*, hastanelerdeki ölümcül enfeksiyonların % 70'inden sorumludur) gibi mikropları öldürebilen antimikrobiyal peptidler ürettiğini bulmuşlardır.

Ticari yengeç avcılığından arta kalan atılmış yengeç kabukları bile akuatik biyoteknolojinin tıbbi uygulamalarında bir rol oynamaktadır. Artropot şubesinin – yengeçleri, ıstakozları, karidesleri, böcekleri ve örümcekleri içeren – üyelerinin dış iskelet veya ekzoiskeleti zengin bir **kitin** ve **kitosan** kaynağıdır. Bu kompleks karbohidratlar yapısal olarak bitkilerde hücre duvarının sert dış tabakasını oluşturan selüloza benzer. Selüloz yaygın olarak bir diyet lifi olarak bilinir. Benzer şekilde kitin ve kitosan da lif kaynağıdır. Lif almak için sebze ve meyveleri yemek, sindirim yolu için yengeç kabuklarını yemekten çok daha kolaydır. Bununla birlikte yengeç kabuğu ekstraktları çoğu gıda mağazasından pudra olarak satın alınabilir. Birçok deri kremi ve kontakt lensler de kitin içermektedir ve kitin, cerrahlar tarafından insanlara uygulandığında, iyileşmeyi uyaran ve alerjik olmayan dağılabilir dikişler atmada kullanılmaktadır.

Şimdiye kadar deniz kaynaklı ilaçların çok azı yaygın ölçekte tıbbi pazarda kullanım bulmuştur; fakat gelecekte rekombinant DNA teknolojisi akuatik orga-

nizmalarda tipik olarak çok düşük derişimlerde bulunan biyoaktif bileşiklerin seri üretimine geçmek için kullanılacaktır.

10.5 Tıbbi Olmayan Ürünler

Dünyamızın su potansiyelini daha iyi değerlendirebilmek için şimdi de, araştırmalarda kullanılan maddelerden besin katkılarına kadar, biyoteknoloji endüstrisinde önemli etkiler yaratmış çeşitli akuatik ürünlerine göz atacağız.

Ürünlerden Bir Derleme

Sıcak kaynak sularında bulunan *Thermus aquaticus* arkebakterisinden izole edilen ve moleküler biyolojide güçlü bir araç olarak PCR'm geliştirilmesine olanak sağlayan *Taq* polimerazın önemini daha önce tartışmıştık (Bölüm 3). Enzimler ile temel ve uygulamalı araştırmalarda önemli roller oynayan diğer ürünler açısından okyanusların da mükemmel bir kaynak olduğu görülmüştür. Örneğin, hidrotermal ağızların (okyanus tabanındaki sıcak su kaynakları) yakınlarında yaşayan bakteriler PCR için ikinci nesil sıcağa dayanıklı enzimler ile ligazlar ve restriksiyon enzimleri gibi DNA üzerinde değişiklik yapan enzimler elde edilmesini sağlamıştır.

Deniz bakterilerince üretilen diğer enzimler, gelecekte kullanılabilecek yeni uygulamalar sağlayacak olan ilginç özelliklere sahiptir. Bazı enzimlerin tuza dayanıklı oluşu, onları yüksek tuzlu çözeltiler gibi endüstriyel ölçekte yetiştirme yöntemleri için ideal hale getirmektedir. Biyolojik ışıldayan *Vibrio harveyi* bakterisinin çevre kirliliğinin belirlenmesinde oynadığı role değinmiştik (Bölüm 5). *Vibrio*'nun deniz türleri çeşitli proteazlar üretirler; bunların bazıları imalat süreçlerinde kullanılan birçok deterjana karşı dirençli, özgün proteazlardır. Sonuç olarak deterjana dirençli bu proteazlar, giysilerdeki protein lekelerini çıkaran çamaşır deterjanlarında kullanım gibi, çözücü protein olarak temizlik işlemleri için potansiyel uygulamalara sahip olabilir. *Vibrio*, doku kültüründe kullanılan bir proteaz olan **kollajenaz** için de iyi bir kaynaktır. Bilim insanları, kültüre alınmış karaciğer hücreleri gibi hücreleri büyütmek istediklerinde, hücreleri bir arada tutan bağlantı dokuları kesmek için kollajenazları kullanarak, hücrelerin kültür petrilerinin içinde ayrı ayrı dağılmasını sağlayabilmektedirler.

Denizden elde edilen bir diğer ürün; birçok korunmuş besinde, diş macununda ve kozmetik üründe bulunan **karrajenan**dır. Sülfatça zengin bu polisakkarit, kırmızı suyosunlarından elde edilir ve 50 yılı aşkın süredir birçok üründe kullanılmaktadır. Karrajenan polisakkaritlerinin geniş bir ailesi vardır. Farklı sıcaklıklar altında, değişen yoğunluklarda jel oluşturabilirler. Bu nedenle karrajenanlar kıvam verici maddeler olarak, çiğnediğimiz sırada besinlerin ağzımızda yarattığı "hissi" iyileştirmesi için kullanılmaktadır. Karrajenanların yaygın uygulamaları arasında; ciklet, çikolatalı süt, bira ve şarap, salata sosları, şuruplar, soslar, işlenmiş etler, yapıştırıcılar, kumaşlar, cilalar ve yüzlerce diğer üründe dengeleyici ve hacim artırıcı olarak bu maddenin kullanılması gösterilebilir. Filipinler bol miktarda karrajenanın elde edildiği kırmızı suyosunlarının (Rhodophyta) dünyadaki en büyük üreticisidir. Kırmızı algler suşileri sarmakta kullanılan ve kağıt kalınlığındaki bir su yosunu ürünü olan nori için de önem taşır. Su yosunu yetiştiriciliğindeki ilerlemeler diğer alg polimerlerinin üretiminde de bir artış sağlamıştır; bunlar arasında bakteri yetiştirmek için agar jel yapımında kullanılan agar ve DNA elektroforezi için agaroz jel yapımında kullanılan alginik asit gibi önemli araştırma materyalleri sayılabilir (Bölüm 3).

Biyokütle ve Biyoişleme

Deniz biyoteknolojisinin yeni doğmakta olan alanlarından biri de, deniz biyokütlesinin araştırılmasıdır. Yosunsu sucul bitkilerin oluşturduğu bir yığın veya bir balık sürüsü, biyokütleyi temsil eder. Bildiğiniz gibi, bitkiler karbondioksit ve suyun karbonhidrat ve oksijene dönüştürüldüğü bir süreç olan fotosentez olayıyla oksijen üretiminden sorumludur. Deniz bitkileri (su yosunları, çimenler ve planktonlar) güneşin büyük enerjisini (dünya çapında üretilen tüm enerjinin yaklaşık % 30'u) yakalayıp onu kimyasal enerjiye dönüştürmek için fotosentez yapar. Bu biyokütlelerin kimyasal enerjisi toplanabilir mi?

Bilim insanları alternatif yakıt üretiminde alglerin ve bitkilerin kullanılabileceği yollar üzerinde çalışıyorlar. Örneğin, deniz alglerinin, hidrokarbon ve lipidlerin toplu üretimini olağan dışı miktarlarda yapabilme yeteneklerinin sağladığı, hızlı biyosentezsel özelliklerinden yararlanılarak, normalde üretilmesi veya doğal materyallerden izole edilmesi yüksek maliyetli olan materyaller için alternatif kaynaklar sağlanabilir. Benzer şekilde, deniz biyokütlesinin etanol gibi yakıtlara dönüştürülmesi de olasıdır.

ABD Denizcilik Araştırma Laboratuvarları, planktonların su altı "yakıt hücreleri" olarak kullanılması için olası yollar araştırmaktadır. Suyun yüzeyindeki planktonlar fotosentez yaptıkça enerji açığa çıkarırken, okyanusun dibindeki (daha az oksijenin olduğu) çökeltiye yakın olan planktonlar enerji üretmek için farklı tepkimeler kullanır. Sonuç olarak, bilim insanları, bu planktonların yüzey ile okyanus tabanı arasında, sınırsız bir elektrik enerjisi kaynağı elde etmek için toplanması mümkün olan doğal bir voltaj değişimi meydana getirdiğini ortaya çıkardılar. Okyanuslar gelecekte önemli bir enerji kaynağına dönüşebilir. Son olarak, bilim insanları deniz algleri biyokütlesinin

karbondioksit emiliminin artırılmasında ve yeryüzündeki sera gazı etkisinin azaltılmasında kullanılabileceği yolları araştırmaktadırlar.

Bilim insanları, rekombinant protein gibi bir biyolojik ürünün üretiminde, deniz ürünlerinin yer alabileceği **biyoişleme** süreçlerini keşfetmeye çalışmaktadırlar. Algler, olanak dâhilinde, rekombinant proteinlerin ekpresyonunda önemli rol oynayabilir. Bilim insanları, geniş ölçekte yetiştirilebilmeleri nedeniyle, deniz alglerinden bol miktarda protein (antibiyotikler gibi) üretebileceklerini görmüşlerdir. Deniz biyologları, endüstriyel üretim süreçlerinde kullanılabilecek çeşitli polimerlerin ve diğer biyolojik materyallerin sentezinde deniz organizmalarının nasıl kullanılabileceğini araştırmaktadır. Örneğin, istiridye kabuk proteinlerinin, şu an kullanılmakta olan materyallerin toksik olmayan ve biyolojik olarak çözünebilen alternatifleri olarak, deterjanlarda ve diğer çözücülerde katkı maddesi olarak kullanılması düşünülmektedir.

Bu bölümü, doğanın temizlenmesi için kullanılacak uygulamalarda akuatik organizmalardan nasıl yararlanılabileceğini tartışarak sonuçlandıracağız.

10.6 Akuatik Biyoteknolojinin Çevresel Uygulamaları

Ne yazık ki dünyadaki okyanuslar, endüstriyel ve insani atıklar için bir döküm alanı görevi görmekte ve kirliliğin balık sürülerine, deniz organizmalarına ve çevreye olan etkisi gözetilmemektedir. Şüphesiz ki okyanuslar atık ürünleri bünyelerine almak için sınırsız alana sahip değildir; bizler bunun sonuçlarını, birçok deniz türünün kritik yumurtlama ve yavru deniz organizmalarının gelişme bölgeleri olan sulak alanlarla nehir ağızlarında, çevre kirliliği ve insan etkisinin sonucu ortaya çıkan şiddetli bir azalma olarak görmekteyiz.

Bakteriler, çevre kirleticilerinin belirlenmesi ve ayrıştırılması amacıyla kullanılabilir (Bölüm 5 ve 9'da tartışıldı). Bu kısımda, akuatik organizmaların yaşadıkları ortamdaki kirliliğin kontrol edilmesi ve temizlenmesinde nasıl kullanılabileceğini gözden geçireceğiz.

Kirlenme Önleyici Maddeler

Biyofilmleme, diğer bir deyişle biyokirlenme, organizmaların yüzeylere bulaşması anlamına gelmektedir. Bu yüzeyler arasında gemilerin tekneleri, boruların iç astarları, çimento duvarlar ile iskele, köprü ve binaların yakınlarında kullanılan kazıklar da vardır. Biyokirlenme deniz organizmalarının, özellikle de kabuklu deniz canlılarının yüzeylerinde de meydana gelmektedir. Eğer deniz kenarlarındaki iskelelerde vakit geçirdiyseniz, hiç şüphesiz biyofilmlemenin suda bulunan yapılar üzerindeki etkilerini görmüşsünüzdür.

Kaya midyeleri, algler, midyeler, deniztarakları ve bakteriler deniz ortamlarında biyofilmlemeden sorumlu en yaygın organizmalardır (**Şekil 10.14**). *Biyofilmleme* teriminden anlaşılacağı gibi, organizmalar yapıştıkları yüzeyler üzerinde kelimenin tam anlamıyla "film" meydana getiren bir katman veya genellikle çoklu katmanlar oluşturacak şekilde gelişirler. Ancak, biyofilmleme yalnızca bir deniz sorunu değildir. Örneğin, benzer bir biyofilmleme durumu evinizin su tesisatında, kontakt lenslerde ve ağzınızda da meydana gelir. Dişlerinizi kaplayan bakteriler ile cerrahi implant malzemelerine ve protezlere yapışan bakteriler biyofilmlemeye birer



ŞEKİL 10.14 İstenmeyen İstilacılar Ciddi Ekonomik Etkileri Olan Biyofilmler Meydana Getirir (a) Zebra midyesi gibi istenmeyen türlerin kontrolsüz gelişimi, birçok soruna yol açar. (b) Midyeler, kaya midyeleri ve diğer organizmalar burada gösterilen boruyu kaplayan gibi sert biyofilmler meydana getirebilir.

örnektir. Dişlerinizi düzenli olarak fırçalamanız ağzınızdaki biyofilmlemeyi en aza indirse de, deniz ortamlarındaki biyofilmlemenin önlenmesi için bu tarz basit çözümler mevcut değildir.

Biyofilmleme önemli sorunlara yol açabilir. Deniz organizmalarının gemilerin su içindeki gövdelerini kaplaması, geminin ilerlerken suya gösterdiği direnci büyük oranda artırır, seyahat hızını yavaşlatır ve yakıt etkinliğini düşürür. Biyofilmlerin ilerleyen şekilde birikmesi boruları tıkayabilir, su girişlerini ve gemilerdeki filtrasyon sistemlerini kapatabilir ve metal yüzeyleri aşındırabilir. Ayrıca omurgasız hayvanlar ve yumuşakçaların yüzeylerde koloni haline gelmesi, ortadan kaldırılması güç ve pahalı olan "sert" biyokirlenmeye neden olur (Şekil 10.14).

Geleneksel olarak kirlenme (yosunlanma) önleyici etmenlerde, kirliliğe neden olan organizmaların gelişimini en aza indiren, bakır ve civalı boyalar gibi toksik kimyasallar kullanılmaktadır. Ancak bu boyalardan sızan metaller, kendileri çevre kirliliği yaratabilir. Bu nedenle araştırıcılar, organizmaların kendi yüzeylerindeki kirlenmeyi önlemek için kullandıkları doğal mekanizmaları incelemektedir. Eğer biyofilmleme hem imal edilmiş yüzeylerde hem de deniz organizmalarının yüzeylerinde yaşanan bir sorunsa; deniztarakları, midyeler hatta kaplumbağalar biyofilmlemeyi nasıl en aza indiriyor ve böylece biyofilmleyici organizmaların kabuklarını tamamen kaplamasını önlüyor? Bilim insanları yanıtı bulmak için moleküler yöntemler kullanıyorlar. Bazı organizmaların püskürtücü bileşikler kullandığı düşünülmekteyken, bazılarının biyofilmleyici organizmaların yapışmasını önleyici moleküller ürettiği tahmin edilmektedir (**Şekil 10.15**). Birçok deniz çimeni – deniz çayırı *Zostra marina* gibi – ve alg bakterilerin, mantarların ve alglerin yapışmasını önleyen veya onları etkisiz hale getiren bileşikler üretirler. Yakın gelecekte bu bileşikler gemi gövdeleri, su kültürü ekipmanları ve biyofilmlemeye açık diğer yüzeyler için koruyucu kaplama maddeleri üretilmesi amacıyla kullanılabilecektir.

Biyosensörler

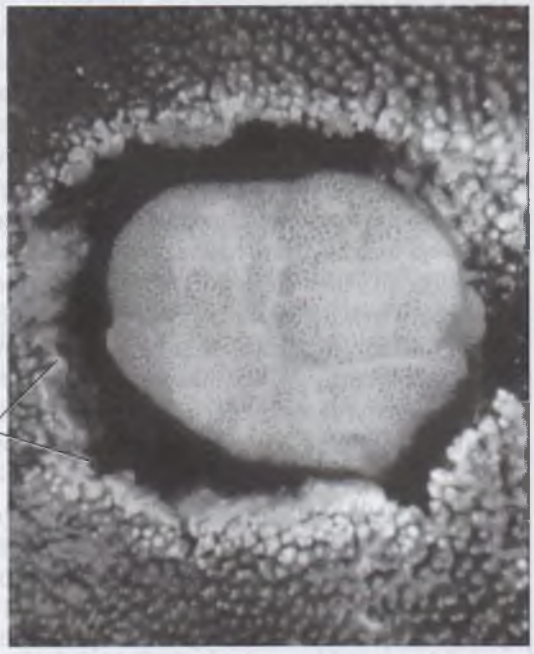
Bilim insanları su kanallarında kirletici ve toksinlerin düşük konsantrasyonlarını belirlemede akuatik organizmaları biyosensör olarak kullanmak için uğraşmaktadırlar. Biyolüminesan bakteri suşları biyosensör olarak kullanılabilir (Bölüm 5). Bazı türler biyolüminesans özelliklerini çevrelerini aydınlatmada kullanırken, diğerleri okyanusun karanlık derinliklerinde eşler bulmak için kullanmaktadır. Bunların çoğu, biyolüminesan derin deniz balığı *Vibrio fischeri* gibi, biyolüminesan bakterilerle simbiyotik bir ilişki içerisindedir.

V. fischeri ve diğer biyolüminesan suşlar (*V. harveyi* gibi) ışık yayan lusiferaz enzimini kodlayan *Lux* genleri eksprese etmektedir. Çevresel koşulların değişmesine yanıt olarak *Vibrio* organizmaları tarafından yayımlanan ışığın şiddeti değişebilir. Bu yetenekleri sayesinde, organik kimyasallar ve azot içeren bileşikler gibi, deniz ortamlarını kirleten maddeleri belirlemede *Vibrio* bakterileri biyosensör olarak kullanılmaktadır.

Deniz canlıları sadece çevresel kirleticilerin tespitinde önemli olmakla kalmayıp, pek çoğunun aynı zamanda hem doğal hem de üretilmiş çeşitli maddeleri parçalayıcı metabolik yollara sahip olduklarına da inanılmaktadır. Birçok bilim insanı çalışmalarını, parçalama süreçlerinde yer alan biyokimyasal yolların tanımlanmasına, böylece deniz ortamlarına nüfuz etmiş olan çeşitli zararlı maddelerin çevreden temizlenmesinde ya da remediyasyonda deniz canlılarının nasıl kullanılabileceğini belirlemeye adamışlardır.

Çevresel Remediyasyon

Doğal mikroorganizmaların veya genetiği değiştirilmiş suşların kimyasalları parçalamada nasıl kullanıldığını hatırlayınız (Bölüm 5 ve 9). Deniz organizmaları da, çoğu zaman aynı yolla fenoller ve toluen gibi toksik organik kimyasallar dâhil, limanlarda ve yağlı ekipmanlarda bulunan yağ atıkları ve toksik metaller gibi maddeleri etkisizleştirmede eşsiz mekanizmalara sahiptir.



ŞEKİL 10.15 Birçok Deniz Organizması Kirlenmeyi Önleyici Mekanizmalara Sahiptir Birçok durağan deniz canlısı koruyucu bir alan oluşturmak için etraflarına bir takım kimyasallar salgılar (bu deniz mercanının etrafında koyu renkli bandla gösterilmiştir). Bu kimyasallar tortu oluşturan mikroorganizmaları engelleyebilir ve canlıyı avcılardan koruyabilir.

Denizin iyileştirilmesinde kullanılan en eski tekniklerden biri, kirli alanlarda kabukluların sayısını artırmaktır. Bilim insanları midye, istiridye ve kara kabuk midyesi gibi çift kabukluların doğal beslenme yöntemini kullanarak kabukluları içeren rafları kirli sulara yerleştirmiştir. Çünkü bu canlılar suyu süzer, nehir ağzında bulunan filtreler gibi iş görerek azotlu bileşikler ve organik kimyasallar gibi atıkları uzaklaştırırlar. Bu kimyasallar da kabuklu deniz canlılarının dokularında absorbe edilir. Belli zaman aralığından sonra bu kabuklular toplanarak atıklar sudan uzaklaştırılmış olur.

Deniz sularında ağır metal kirliliği birçok endüstriyel üretim sürecinin sonucudur. Bu soruna bir



KARİYER PROFİLİ

Akuakültürde Kariyerler

Akuakültür ilgi uyandırıcı çeşitli kariyer fırsatları sunmaktadır. Dünya çapında yaklaşık 36 milyon insan akuakültür ve ilgili alanlarda çalışmaktadır. Giriş düzeyinde olan veya teknisyen pozisyonları, besin veya bazı formlarda gıda takviyeleriyle ve atık materyalin veya yenmemiş gıdaların uzaklaştırılmasıyla kültüre edilen türler için uygun çevresel koşulları sağlar. Bazı sistemlerin bilgisayarlı takibi kabul görmesine rağmen, yetiştirilen organizmaların görsel takibi hafife alınmamalıdır. Örneğin, büyüme modellerinde, beslenmede veya davranıştaki değişimler tanımlanması gereken ürün ile ilgili sorunların ortaya çıkacağının habercisidir. Ama yine de elle yapılan işlemlerin performansı genellikle işin önemli bir kısmıdır. Yönetici ve sorumlu pozisyonundakiler bile kimi zaman suyun veya atık materyallerin içinde olacaklardır – bu işin bir parçasıdır.

Akuakültürde pek çok potansiyel kariyer yolları bulunmaktadır. Mühendisler akuakültür üretim sistemleri tasarlar. Biyologlar ve gıda bilimcileri en uygun büyüme için besinler geliştirir. Bitki ve hayvan genetikçileri fiyat veya dayanıklılık açısından daha uygun özellikte olan veya hızlı büyüyen, hâlihazırda kültür ortamında olan türlerin yeni melezlerini ıslah ederler. Veterinerler hasta balıklarla ilgilenmeli ve onları tekrar sağlıklarına döndürmelidir. Akuakültürde satış pozisyonlarında da fırsatlar mevcuttur, çünkü nihayetinde son ürünü birilerinin satması gerekir. Eğer kültürü yapılan ürün karlı bir şekilde satılmazsa, kayda değer bir emek boşa gitmiş olur.

Teknisyen düzeyinde akuakültüre girmek için, fen bilimleri veya hayvan yetiştirmede temel eğitim gerekir. Biyoloji veya hayvan biliminde 4 yıllık bir mezuniyet ve bir akuakültür tesisinde deneyim tercih edilir; araştırmada yer almak için ise doktora değilse bile yüksek lisans derecesine gerek duyulur. Çoğu işveren en azından ön lisans derecesi olan, kendini işine verebilen kişiler aramaktadır. Deneyim harika bir öğretmendir, balık veya bitki bakıcılığına ilgisi olanlar ne zaman mümkünse tecrübe kazanmak için adım atmalıdır. Tüm bunların yanında, her su ürünleri yetiştiricisinin aşina olması gereken bir şey varsa, o da tesisatçılıktır! Eğer bir su tesisatçılığı kursu varsa ona katılınız. Hem hava hem de su pompalarıyla ve temel hidrodinamikle ilgili bilgiler kritiktir, çünkü bunlar akuakültürle bir bütündür.

Balıklar ve bitkiler yaşayan organizmalardır. Eğer ihmal edilirlerse, ölürler. Dolayısıyla, su ürünleri her gün, günde birkaç kez, izlenmelidir. Balıklar beslenmeli, atık maddeler uzaklaştırılmalı, oksijen ve azot düzeyleri izlenmeli ve ayarlanmalı, predatör sorunu üzerine eğilinmeli ve sistemin tüm şartları değerlendirilmelidir. Bir mahsülün izlenmesi ve bakımıyla uğraşan biri olmazsa, bu süreç – çoğu zaman hızlı bir şekilde – çöker.

Çalışma koşulları çeşitlidir, çünkü akuakültür belli tek bir tipte şekillenmemiştir. Balık ve kabuklu canlılar soğuk veya çok ılık iklimlerde büyüyebilirler. Türler açık veya kapalı ortamda ve bitkiler ise genellikle seralarda yetiştirilir. Çalışma koşulları ıslak olabilir, fakat soğukta, fırtınalı havada suda yüzen bir kafesin üstünde bulunmayı gerektirebilen somon kafes kültürleri hariç, genellikle oldukça rahattır.

Akuakültürde maaşlar, çoğu tarımsal bilimlerde olduğu gibi, biyoteknolojinin diğer alanlarının yanında geride kalmıştır. Akuakültür işine girişmek isteyenler, ürünlerini satana kadar 2 ilâ 3 yıl beklemesi gereken çiftçilere benzer şekilde, kazanç problemleriyle yüzleşmek zorundadır. Bununla birlikte açık havada çalışmak oldukça çekicidir. İnsanlar büyümekte olan balık veya kabuklulara karşı, geçici bir ilgiden öte, sahiplik ve gurur hisseder. Aynı durum yetiştirilen süs bitkileri için de geçerlidir.

Akuakültürde iş bulma ihtimali yüksektir, çünkü dünya çapında insanlar daha çok balık yemektedir. Eğer okyanuslar sınırlı miktarda balık ve diğer mahsülleri sağlayabiliyorsa, akuakültür ilerlemeli ve bu talebi karşılamalıdır. Biyoteknolojinin bu alanı ve aynı şekilde onunla ilişkili işler de gelecekte kesinlikle büyüyecektir.

Toms River- New Jersey, Rutgers Cooperative Extension'dan Gef Flimlin'in katkılarıyla.

çözüm olarak bilim insanları demir, manganez, nikel ve kobalt gibi metalleri yükseltgeyen deniz bakterilerini izole etmiştir. Bu bakterilerden bazıları alt kalite cevherlerden metalleri ekstrakte etmede kullanılabilir. Ayrıca bazı deniz bakterileri ve tek hücreli algler, metal bağlayan bir protein sınıfı olan, metallotiyoneinler üretmektedir. Bu türler kadmiyum ve diğer ağır metallerle kirlenmiş sularda gelişmektedir ve tam anlamıyla ortamdaki kadmiyumu silip süpürmekte, toksik metalleri zararsız yan ürünlere çevirmektedir. Bilim insanları bu organizmaları üretim süreçlerinde altın ve gümüş gibi önemli ve pahalı metalleri saflaştırma, iyileştirme ve geri dönüşümde kullanmanın yollarını aramaktadır.

Birçok deniz canlısı çeşitli çöp materyallerinin parçalamasında ve işlenmesinde değerli olan maddeler üretmektedir. Akuatik organizmaları veya ürünlerini kullanarak doğal ortamlarda veya bu organizmaları içeren biyoreaktörlerde atıkların parçalanmasını uyarmak mümkündür. Örneğin, USDA'daki mikrobiyologlar doğal filtre olarak kullanma amacıyla azot metabolize edici alglerin paspas gibi tabakalarda büyütülmesini denemişlerdir. Bu temizleyiciler akvaryumda azotlu atıkları yakalayan aktif kömür filtreleri gibi iş görür. Çiftlik hayvanı atıklarıyla kirlenmiş olan su, temizleyici üzerinden geçirilir, algler atıkları absorblar ve metabolize eder. Bu atıklar kalın tabakalar içinde büyüyebilen algler için besin elemanları sağlar. Algler periyodik olarak azaltılıp temizlenir fakat çimen gibi tekrar büyümelerine izin verilir. Bu yolla temizlenen su sulama amaçlı kullanılmıştır ve yetiştirilen bazı algler de çiftlik hayvanı besini olarak değerlendirilmiştir. Florida'da benzer denemeler fosfor, azot ve diğer besinlerce zengin suyu temizlemek için su sümbülleri kullanılarak yapılmıştır.

BİR FARK YARATMAK

Amerika Birleşik Devletleri'nin doğu kıyılarındaki çoğu sahilde ilkbahar ve yazın ortak bir manzara yıllardır tekrarlanmaktadır. Çok miktarda at nalı yengeci (*Limulus polyphemus*) çiftleşmek için sığ körfez alanlarını istila etmiştir (bölüm tanıtım fotoğrafında açıkça görülmektedir). At nalı yengeci yeryüzünde dinazorlardan daha önce ortaya çıkmıştır. Bu "yaşayan fosiller" 300 milyon yıldan daha önce ortaya çıkan ilkel formlarına göre, bazı açılardan, çok az farklılık gösterirler. 1950'lerin başlarında *Limulus*'un bakteri öldürücü kan hücreleri içerdiği keşfedilmiştir. Bu basit araştırmadan, deniz biyoteknolojisinden çok güçlü bir tıbbi uygulama geliştirilmiştir. **Limulus amöbosit lizat (LAL) testi** yengeçlerin kan hücrelerinden elde edilen, bakteriyel **endotoksin**leri belirlemede kullanılan bir ekstraktır. Lipopolisakkaritler olarak da adlandırılan endotoksinler, *Escherichia coli* ve *Salmonella* gibi birçok bakterinin dış hücre duvarının yapısal elemanıdır. Endotoksinler birçok hücrenin ani ölümüne neden olabilmektedirler. Bazı bakterilerden açığa çıkan endotoksinler insanlarda eklem ağrıları, iltihaplanma ve ateş gibi hafif semptomlardan, felç gibi daha vahim durumlara kadar sonuçlanabilmektedir. Bazı endotoksinler öldürücü olabilmektedir.

Araştırıcılar at nalı yengeci kanının *E. coli*'nin tamamı veya saflaştırılmış endotoksinlerine maruz bırakıldığında pıhtılaşabileceğini keşfetmişlerdir. Daha sonra, at nalı yengecinin kanındaki amöbositlerin – insanlardaki beyaz kan hücrelerine benzerler – parçalanıp, santrifüjlenip, dondurup kurutularak bir lizat oluşturarak LAL testinde kullanılabileceğini belirlemişlerdir. LAL testi, insan kanı ve sıvı örneklerde endotoksinleri çok etkili ve hızlı bir şekilde belirlemek, ayrıca rekombinant terapötik proteinler gibi biyoteknoloji ilaçlarında endotoksinlerin bulunmadığından emin olmak için kullanılır. Ayrıca çiğ süt ve biftekte bulunan bakterilerin belirlenmesinde de kullanılmaktadır. Ek olarak, birçok tıbbi şirket ve hastane; cerrahi aletlerin, kan ve omirilik sıvısı alınması için kullanılan iğnelerin ve kalp pili gibi implantların endotoksin içermediklerinden emin olmak için LAL testini kullanmaktadır.

Amöbositler yengeçlerden toplanmakta, daha sonra yengeçler salıverilmektedir. Yengeçlerin yuva yaptığı habitatlarının yok edilmesi, avlanmaları ve tüketilmeleri ile *Limulus* populasyonu azalmakta, bu türün uzun vadede sürdürülebilirliği konusunda kaygılara neden olmaktadır. LAL testi, insan yararına olan deniz biyoteknolojisinin gücünü gösteren, tartışmasız sıra dışı bir örnektir ve milyonlarca insan, evcil hayvan, çiftlik hayvanı ve diğerlerine güvenli tıbbi ürünler sağlamakla "bir fark yaratmıştır".

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. 2011 yılında, ABD Ulusal Okyanus ve Atmosfer Yönetimi (NOAA), su ürünleri yetiştiriciliğinde istiridye ve midye üretiminin arttırılması ve kabuklu deniz canlıları habitatının yenilenmesine yardımcı olmak için, yeni bir ulusal başlangıç ilan etmiştir. Bu çabayı destekleyecek potansiyel politika girişimleri öneriniz.
2. Transgenik balık ve triploidler arasındaki farklılıkları tanımlayınız ve her bir genetiği değiştirilmiş balık türünün nasıl meydana gelebileceğini tartışınız
3. Genetiği değiştirilmiş deniz canlılarının risk değerlendirmeleri için yollar öneriniz. Genetiği değiştirilmiş bu türlerin doğal ortamları içerisinde yetiştirilmesiyle ilgili risk olduğu kadar, bu türlerin tüketilmesiyle ilgili de riskler taşıdığını göz önünde bulundurunuz.

4. Akuakültürün sorunları ve faydaları ile ilgili bir liste oluşturunuz.
5. Bu bölümde akuatik biyoteknoloji ile ilgili öğrendiğiniz en ilginç konuyu açıklayınız. Seçmiş olduğunuz konu nedir? Neden bu konuyu ilginç buldunuz?
6. Biyoteknolojik bir uygulama için önemli olabilen değişik bileşiklerin saptanması ile ilgili akuatik biyoteknologların dikkatini çekebilen bir akuatik organizmanın bazı özelliklerini belirtiniz.
7. Su ürünleri yetiştiriciliği açısından önemli olan balık ve kabuklu deniz canlısı türlerine örnek veriniz.
8. Bu bölümde ilk olarak insanlara faydalı olan akuatik biyoteknoloji uygulamaları üzerinde durduk. Birçok akuatik biyoteknolog, dünya genelinde, doğal akuatik organizma (balık veya kabuklu deniz canlısı) popülasyonlarını artırmaya yönelik olarak biyoteknoloji kullanımı ile ilgilenmektedirler. Balık stoklarının yenilenmesinde kullanılabilecek en az 3 biyoteknolojik yöntem öneriniz.
9. GloFish dünyanın ilk genetiği değiştirilmiş evcil hayvanı olarak pazarlanmıştır. GloFish insanların tüketimi için geliştirilmemiş olmasına rağmen, birçok farklı gruplar (bilim insanları dâhil) tarafından bu transgenik hayvanların kullanımına karşı yoğun bir tepki almıştır. Oysa federal kuruluşlar GloFish ile ilgili düzenlemeye gerek olmadığına karar vermiştir. Bu konuda ne düşünüyorsunuz? GloFish'in çok tartışmalı olmasının muhtemel nedenleri nelerdir?
10. Biyofilmler nedir? İnsanlar kadar akuatik çevrede de biyofilmlere örnekler veriniz. Bilim insanlarının biyofilmlere karşı mücadelesinde kaç tane akuatik organizma kullanılmaktadır?
11. LAL (limulus amöbosit lizat) testi nedir? Kısaca nasıl çalıştığı ve kullanıldığını açıklayınız.
12. Marinebiotech.org websitesine erişiniz. Deniz canlılarından türetilen birçok bileşik hakkında bilgi edinmek için "resources" sekmesini kullanın. Bu site ayrıca deniz biyoteknolojisindeki birçok konu için iyi bir kaynak niteliğindedir.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

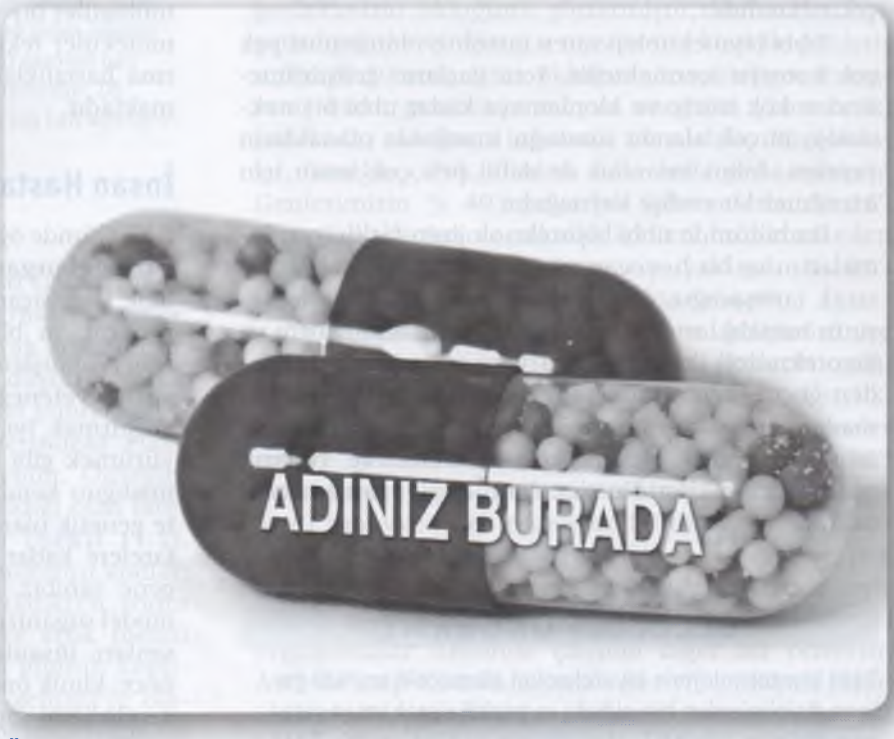
11

Tıbbi Biyoteknoloji

Çeviren: Derya ÖZYÖRÜK

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Model organizmaların tıbbi biyoteknoloji için neden önemli olduğunu açıklayabilmelisiniz.
- Kromozom anormalliklerini saptamak ve genetik testler için farklı moleküler teknikleri tanımlayabilmelisiniz.
- Farmakogenomiğin genetik koşulları nasıl iyileştirdiğini gösteren örnekler verebilmelisiniz.
- Hastalıkların tedavisinde monoklonal antikorların nasıl kullanılabileceğini tartışabilmelisiniz.
- Gen terapisinin amacını anlayabilmeli, farklı gen terapisi stratejilerini karşılaştırabilmeli ve gen terapisinin sınırlarını tanımlayabilmelisiniz.
- Rejeneratif tıbbı tanımlayarak, hücre ve doku transplantasyonlarının ve doku mühendisliğinin nasıl kullanılabileceğine örnekler verebilmelisiniz.
- Kök hücrelerin ne olduğunu bilmeli, nasıl izole edildiklerini anlatabilmeli ve kök hücrelerin kullanılabileceği olası tedavilere örnekler verebilmelisiniz.
- Terapötik ve reprodüktif klonlamaları karşılaştırıp farklılıklarını gösterebilmelisiniz.



Özelleştirilmiş tıp tıbbi biyoteknolojide bir hedeftir.

Biyoteknoloji alanında belki de **tıbbi biyoteknoloji**den daha fazla umut veren ve tartışmalı bir alan yoktur. Tıbbi biyoteknoloji uygulamaları uzun yıllardan beri mevcuttur. Örneğin, 100 yıl önce kan emici olarak adlandırılan sülükler hastalık tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktaydı. Bazı doktorlar sülüklerin hasta kanını emmesiyle hastaların hastalıktan kurtulduğuna inanmaktaydılar. Şimdi ise biyoteknoloji sayesinde daha iyi tedavi yöntemleri kullanılmaktadır. Tıbbi biyoteknoloji hakkında bilgi edinmek için oldukça heyecan veren bir çağdayız, çünkü bu alandaki ilerlemeler baş döndürücü bir şekilde gerçekleşmektedir. Hatta bu sefer kan emici özelliklerinden değil, tükrüklerindeki pıhtı eriten enzimler nedeniyle kalp krizi ve felçlerin tedavisinde kullanılmaları ile ilgili olarak, sülükler tekrar dikkat çekmektedirler.

Tıbbi biyoteknoloji zaten tartışmış olduğumuz pek çok konuyu içermektedir. Yeni ilaçların geliştirilmesinden kök hücre ve klonlamaya kadar tıbbi biyoteknoloji, birçok alanda sunduğu inanılmaz olanakların yanısıra, bilim insanları da dahil pek çok insan için inanılmaz bir endişe kaynağıdır.

Bu bölümde tıbbi biyoteknolojinin farklı uygulamalarını ve bu heyecan verici alanın etkilerini anlatarak tartışacağız. Moleküler biyoteknoloji tekniklerinin hastalıkların tanısında nasıl kullanıldıklarını ve biyoteknoloji ile geliştirilen yeni tıbbi ürünleri gözden geçireceğiz. Daha sonra, rejeneratif tıbbı tartışmadan önce, gen terapisi örnek ve uygulamalarını tanıtacağız. Bu bölüm kök hücreler ve onların potansiyel etkilerinin incelenmesiyle tamamlanacaktır.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Tıbbi biyoteknolojinin biyoteknoloji alanındaki en hızlı gelişen disiplinlerden biri olduğu ve pozitif olarak insan yaşamını etkileme olasılığı kuşku götürmeyen bir gerçektir. Tıbbi biyoteknolojideki yeni ve farklı uygulamaların çeşitliliği nedeniyle, yakın gelecekte hangi yeni buluşun gerçekleşeceğini tahmin etmek oldukça zordur. Bununla ilgili sorduğumuz sorular tıbbi biyoteknolojistler tarafından tartışılan başlıca problemlerdir.

- Kişiselleştirilmiş genomik ve bireysel genomların dizilenmesi gelecekte hastalıkların tanı ve tedavisini ne derece etkileyecektir?
- Genom ve epigenomu anlamamız hangi yeni ilaç ve tedavileri ortaya çıkaracaktır?
- Hastalıkların anlaşılması ve tedavilerinde nanoteknoloji nasıl bir rol alacaktır?
- Rejeneratif tıp ve hücre, doku ve organ mühendisliğinde yetkinlik ne gibi yeni tedaviler sağlayacaktır?
- Gen terapisi tekniklerindeki gelişmeler bu uygulamaları genetik hastalık tedavisinde daha rutin bir seçenek yapabilecek midir?
- Hastalıkların tedavisinde kök hücreler güvenilir ve hesaplı tedavi seçenekleri olabilecek midir?

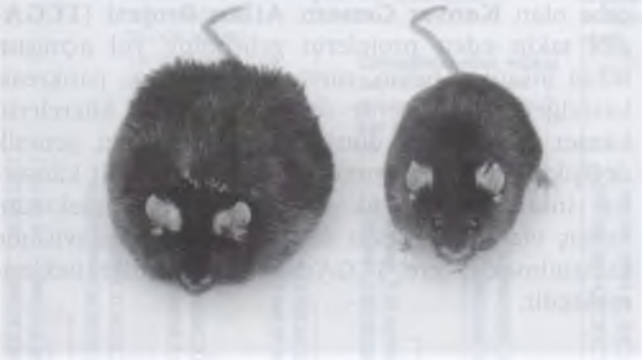
11.1 Moleküler Biyolojinin Gücü: İnsan Hastalıklarının Tanı ve Teşhisinde

2003 yılı, James Watson ve Francis Crick'in DNA'nın yapısını ortaya çıkarmaları nedeniyle aldıkları Nobel ödülünün 50. yıl dönümüydü. O zamandan bu yana moleküler biyoloji şaşırtıcı hızda ilerlemekte, sağladığı moleküler tekniklerle tıp doktorları ve bilim insanlarına hastalıklarla mücadelede çok güçlü araçlar sunmaktadır.

İnsan Hastalık Modelleri

Bu bölümde öğreneceğiniz uygulamaların çoğu önemli **model organizmalar** sayesinde mümkündür. Özellikle fare, sıçan, solucan ve sinekler insan hastalıklarını çalışan bilim insanlarına yardımda çok önemli roller almışlardır (Bölüm 7). Yalnızca konuşma ve yazma yeteneği değil, aynı zamanda uzak gezegenleri araştırmak, iyi pizza yapmak, müzik eserleri yaratmak, yürümek gibi becerilerimizin de diğer türlerle uyuşmadığını kendi kendimize düşünürüz. Fakat gerçekte genetik olarak eşsiz değiliz. Maya ve solucanlardan farelere kadar diğer organizmalarla çok sayıda ortak gene sahibiz. Bazı insan hastalıkları aynı zamanda model organizmalarda da görülür. O nedenle bilim insanları, insanlarda **klinik deneyler**de kullanmadan önce, klinik öncesi çalışmalarla ilaçların etkinlik ve güvenilirliğini saptamak, hastalık genlerini tanımlamak, gen terapisini test etmek için bu model organizmaları kullanmaktadırlar.

Deneysel amaçla insan genetiğine müdahale edemediğimiz için, model organizmalar bilim insanları için çok önemlidirler. Şüphesiz ki, genlerini almak ve fonksiyonlarını öğrenmek için insanları üremeye zorlamak illegal ve etik dışı bir durumdur. Ancak model organizmaların genleri bu yaklaşımlar için yaygın olarak kullanılmaktadır. Fare, sıçan, civciv, maya, meyve sinekleri, solucan, kurbağa ve hatta akvaryumlarda yaşayan zebra balığının dahi insan genetiği ile ilgili bilginin artmasında çok önemli rolleri olmuştur. Çoğu önemli genler türden türe çok iyi korunmaktadır. Eğer model organizmalardaki önemli genleri belirleyebilirsek, bu genlerin insanlarda nasıl çalıştığı ile ilgili hipotez ve tahminler yapabiliriz.



ŞEKİL 11.1 Obez Fare Model organizmalar bilim insanlarına insan hastalık genlerini öğrenmelerinde yardımcı oldukları için çok değerlidirler. Soldaki fare genetik olarak değiştirilmiş olup, kelime anlamı "ince" olan ve Yunanca *leptos*' dan gelen, leptin denilen bir protein hormonu üreten *obezite* (*Ob*) geninin gen nakavt yöntemi kullanılarak yok edilmesiyle oluşmuştur. *Ob* nakavt fare sağdaki normal kardeşin neredeyse beş katı ağırlığındadır.

Farklı model türlerdeki çoğu genin DNA dizilimi bakımından insan genlerine benzerlikleri vardır. Böyle ilişkili genler **homologlar** olarak adlandırılır. İnsan hastalıklarında rol oynadığı düşünülen bir gen, model organizmalarda gen nakavt yoluyla etkisiz hale getirilebilir. Organizma üzerindeki etkisi çalışılarak genin fonksiyonu öğrenilebilir. Örneğin, yıllar önce bilim insanları *Ob* gen eksikliği olan farelerde obezite geliştiğini bulmuşlardır (**Şekil 11.1**). *Ob* geni leptin denen bir protein hormonunu kodlar; leptin yağ hücreleri tarafından üretildikten sonra kan dolaşımı yoluyla beyne ulaşır ve açlık hissini düzenler, beyin vücuda tokluk halini bildirir. Leptinin bulunması bu alanda önemli bir gelişmeye olanak sağlamıştır. Bazı çocukluk çağı obezitelerinde *Ob* gen mutasyonları saptanmıştır. İngiltere'de leptin verilen aşırı obez çocukların çok iyi yanıt verdiği görülmüştür.

Gelişmekte olan embriyoda bazı hücrelerin diğerlerine yer açmak için ölmeleri gerekir. Vücut hangi hücrelerin öleceğini ve belli organların nerede gelişeceğini nasıl bilmektedir? Segmentsiz bir yuvarlak solucan olarak bilinen nematod *Caenorhabditis elegans* ile yapılan çalışmalar, gelişimle ilgili bu soruların cevabını bulmada önemli katkılar sağlamıştır. 959 hücreden oluşan *C. elegans* haritası, bilim insanlarına solucanın bütün embriyonik hücrelerinin, yani olgun solucanın sinir sistemi, bağırsak ve diğer dokularına dönüşecek hücrelerin kaderi hakkında bilgi sağlamıştır. Bu hücrelerin 131'i **apoptosis** denen, hücrelerin kendi kendilerini yok ettikleri, programlı hücre ölümü ile yok olmaya programlanmıştır. İnsan embriyosunun gelişimi sırasında el ve ayak parmak aralarında deri hücre tabakalarından cepler oluşur. Doğumdan önce bu ceplerin oluşumundan apoptosis sorumludur. Artrit ve bazı kısırlık tipleri yanında, Alzheimer hastalığı, Huntington hastalığı, amiyotrofik lateral skleroz (ALS-Lou Gehrig hastalığı) ve Parkinson hastalığı gibi nörodejeneratif hastalıklar da apoptosis ile ilişkilidir. Model organizmalar bu dejeneratif süreçlerin durdurulması veya yavaşlatılmasının yollarının bulunmasında ve genlerinin daha iyi anlaşılmasında bilim insanlarına yardımcı olmaktadır.

İnsan Genom Projesi ve karşılaştırmalı genomik çalışmaları diğer organizmalarla çok sayıda ortak genlerimizin olduğunu göstermiştir. Manavdan eve getirdiğimiz sinir bozucu meyve sinekleri ile genlerimizin % 50'sinin ortak olduğuna inanabiliyor musunuz? İnsan genlerinin meyve sineğinin yalnızca iki katı kadar olduğuna inanmak zor olabilir. Bazı bitkiler, örneğin çeltik, bizden daha fazla gene sahiptir. Genlerimizin % 40'ı yuvarlak solucanlarla, % 31'i ekmeği kabartan ve alkollü içkileri fermente eden mayalarla aynıdır. Genlerimizin yaklaşık % 90'ı farelerle benzer yapı ve fonksiyona sahiptir.

Vücudumuzun yapısını, organ gelişimini ve hatta yaş ve ölümünü belirleyen genlerin çoğu meyve sinekleri ile hemen hemen aynıdır. Üstelik, insanlarda hastalık nedeni olan mutant genler meyve sineklerinde de hastalığa neden olur. 289 insan hastalığında mevcut mutant genlerin yaklaşık % 61'i meyve sineklerinde de bulunur. Prostat kanseri, pankreas kanseri, kistik fibroz, lösemi ve pek çok diğer insan genetik hastalığı bu grup içinde sayılabilir. Kalp hastalıkları bilim insanlarının model organizmalar üzerinde çalıştığı diğer bir örnektir. ABD'de kalp hastalıklarından her yıl 1 milyon insan ölmektedir. Araştırıcılar kolesterol metabolizması için gerekli olan genlerin eksik olduğu, kalp krizine yatkın fareleri geliştirmek için gen nakavt yöntemini kullanırlar. Bu farelerin damarları tıkayan ateroskleroz dakine benzer şekildeki yüksek kolesterol seviyeleri, kalp hastalığı ile mücadele için geliştirilen tedavileri test edebilme açısından umut vericidir.

Araştırıcılar 20 yıldan beri AIDS tedavisi için çalışmaktadırlar. Birçok bilim insanının önceliği AIDS için küçük hayvan modeli yaratabilmektir. HIV ve benzeri virüsler insanlardan başka, şempanze ve rhesus makak maymunları gibi primatlarda da hastalığa neden olurlar. Fakat bu hayvanlarla çalışmak hem çok pahalıdır hem de primatlar üzerinde deneysel çalışma yapılmasıyla ilgili etik sorunlar vardır. Bu hayvanların her biri yaklaşık 50 000 dolar ve sınırlı sayıdadır. Araştırıcılar HIV ile enfekte kemir-

gen modelleri geliştirme yolunda yavaş ama kararlı bir ilerleme kaydetmektedirler. Bu tür hayvanlar yaratılsa bile, onların insan AIDS'ine yeterince benzer reaksiyonlar göstereceklerinin bir garantisi yoktur. HIV insanlarda T lenfositlerini enfekte ve harab eder. Kemirgen modelle ilgili başlıca engel, HIV'in insan T hücrelerine bağlandığı gibi, fare T hücrelerinin reseptör proteinlerini tanımadığından, bunlara bağlanamamasıdır. Bununla beraber, bilim insanları enfekte faredeki virüsün tanınması için fare T hücrelerinde insan T hücre proteininin eksprese olmasını sağlayabilirler.

Hastalık Tanısında Biyomarkörler

Teorik olarak doğru tanı araçları ile hemen hemen her hastalığın erken dönemde teşhis edilmesi mümkün olabilir. Kanser gibi birçok hastalık için erken teşhis hayatta kalma olasılığını arttırmak ve başarılı tedavi için çok önemlidir. Tanı yaklaşımlarından biri de hastalığın göstergesi olan **biyomarkörler**e bakmaktır. Biyomarkörler hastalıklı doku tarafından üretilen tipik proteinlerdir veya doku hastalandığında üretimi artan proteinlerdir. Birçok biyomarkör, apoptosise giden hücreler gibi, ölü veya ölmekte olan hücrelerden hücre hasarının bir ürünü olarak kan ve idrar gibi vücut sıvılarına salınır. Örneğin, **prostat-spesifik antijen (PSA)** adlı protein, prostat bezi iltihaplı olduğunda kan dolaşımına salınır ve kandaki yüksek düzeyleri prostat iltihabı ve hatta prostat kanserinin bir markörü olabilir. Bireysel genler ve gen ekspresyonları bilim insanlarına hastalık için biyomarkör sağlar ve (bakınız bu bölümün devamındaki Şekil 11.8) birçok biyoteknoloji şirketi hastalığın tanı ve erken saptanmasında daha iyi biyomarkörler bulmaya çalışmaktadır.

İnsan Genom Projesi İnsan Kromozomlarının Tümündeki Hastalık Genlerini Belirledi

Günümüzde test edilebilen hastalık genlerinin birçoğu İnsan Genom Projesi sayesinde keşfedilmiştir. Genom projesinden önce sadece 100 genetik hastalık test edilebilirken, şimdi 2000'den fazla hastalığın genetik testi yapılabilmektedir. İnsan Genom Projesi aracılığıyla bilim insanları tüm insan kromozomları üzerindeki normal ve hastalık yapan genlerin yerlerini gösteren kompleks haritalar geliştirmişlerdir. Kromozom haritaları, ilgili hastalık ve normal genlerin bulunduğu noktaları saptamayı mümkün kılmaktadır. İnsanda genetik hastalıklara yol açtığı bilinen her bir kromozom için bir veya iki önemli genin vurgulandığı, basitleştirilmiş haritalar **Şekil 11.2**'de gösterilmektedir.

İnsan Genom Projesi farklı kanserlere yol açan genomik değişikliklerin saptanması için kapsamlı bir çaba olan **Kanser Genom Atlası Projesi (TCGA)** gibi takip eden projelerin gelişimine yol açmıştır. Bilim insanları beyin, meme, yumurtalık, pankreas, karaciğer ve akciğerde özellikle normal hücrelerin kanser hücrelerine dönüşmesini tetikleyen genetik değişiklikler ile ilgilenmektedirler; çünkü bu kanserler insanların büyük bölümünü etkilemektedir. Sonuç olarak, kanserin daha iyi tanı ve tedavisinde kullanılmak üzere TCGA'dan yeni bilgiler beklenmektedir.

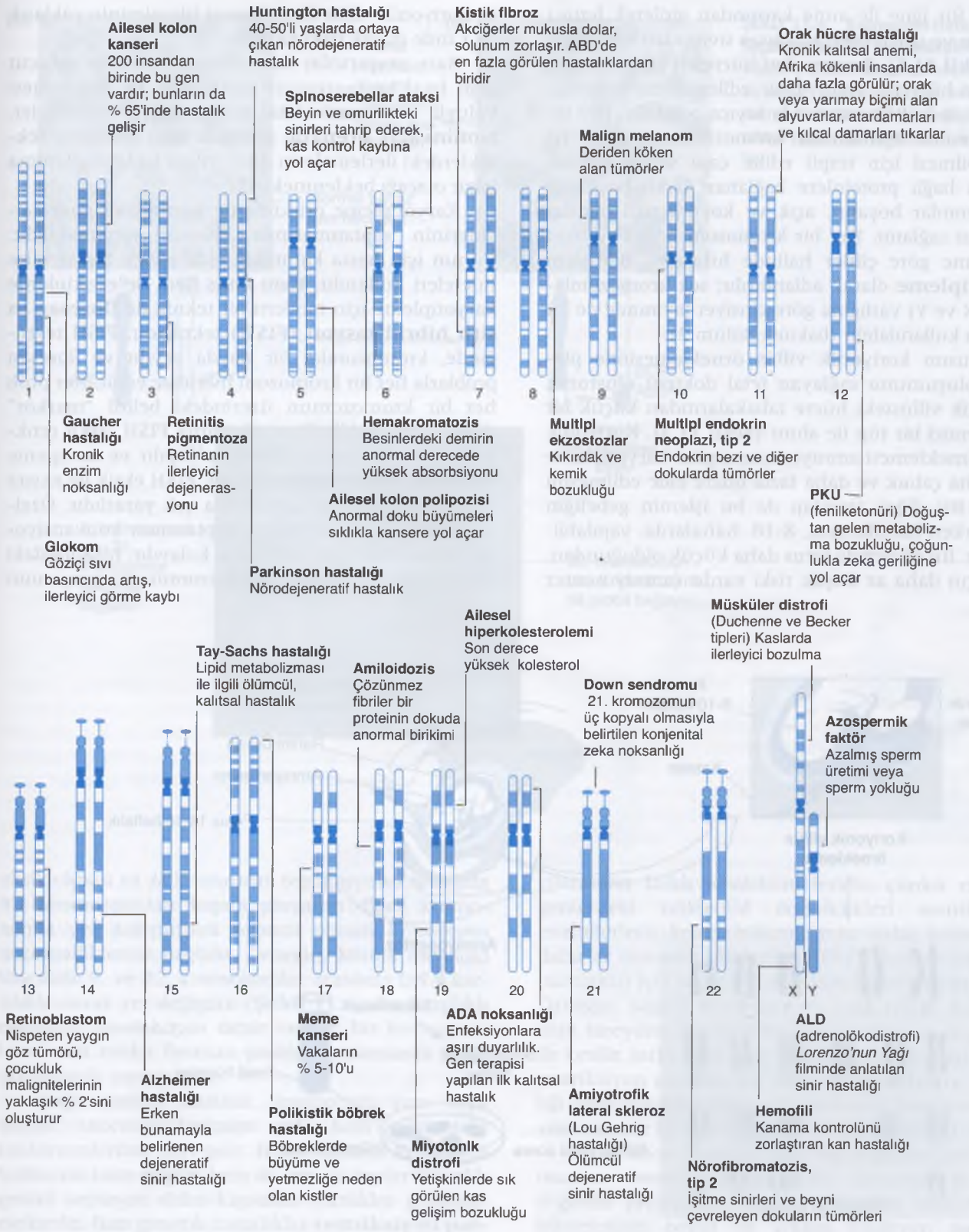
Genetik Hastalıkların Saptanması: Kromozom Anormallikleri ve Hatalı Genler İçin Testler

Moleküler biyoloji tekniklerinin birçok farklı genetik hastalığın saptanmasında çok değerli olduğu kanıtlanmıştır.

Son zamanlara kadar, çocuğun cinsiyetinin saptanması veya az sayıdaki genetik hastalığın saptanması için fetus üzerinde birçok genetik test yapılmıştır. Bu işlemlerin çoğu sayısal ya da büyük yapısal kromozom anormalliklerinin görüldüğü genetik durumları test etmekteydi. Eğer sperm veya yumurta hücrelerinin oluşumu sırasında kromozom ayrılma problemi olursa, fetus anormal sayıda kromozom içerebilir. Kromozom sayısındaki değişikliklerden kaynaklanan hastalıklara verilecek iyi bilinen örneklerden biri, **Down sendromu**dur. Bu durumdaki bireylerin çoğunda 21. kromozom 3 kopyadır (trizomi 21). Etkilenen bireylerde bilişsel bozukluklar, kısa boy ve tipik yüz görünümü gibi semptomlar görülür. Bilim insanları insan 21. kromozomunun hemen hemen tam kopyasına sahip olan fare ırkı geliştirmişlerdir. Bu fareler Down sendromunun karakteristik özelliklerini gösterirler ve bu hastalığın genetiğinin anlaşılması için çok değerli bir model olabilirler.

Down sendromunun fetal testi özellikle 40 yaşın üzerindeki gebe kadınlarda oldukça yaygın kullanılmaktadır, çünkü Down sendromu görülme sıklığı kadın tarafından üretilen yumurtanın yaşı ile ilişkilidir. Trizomi 21 ve diğer sayısal kromozom anormallikleri, gebeliğin devamına dair kararın belirlenmesinde ebeveynlere bilgi vermek amacıyla fetusun test edilmesiyle belirlenebilir. Eğer hata saptanırsa, genetik testler fetusun gebelik sırasında ve doğumdan sonra tedavisinde kullanılacak bilgiyi de sağlayabilir.

Öyleyse gelişmekte olan fetusta Down sendromu nasıl test edilir? Bunun için iki farklı teknik kullanılır: **Amniyosentez** ve **koriyonik villüs örnekleme**. Amniyosentez gelişmekte olan fetusun 16. haftasında



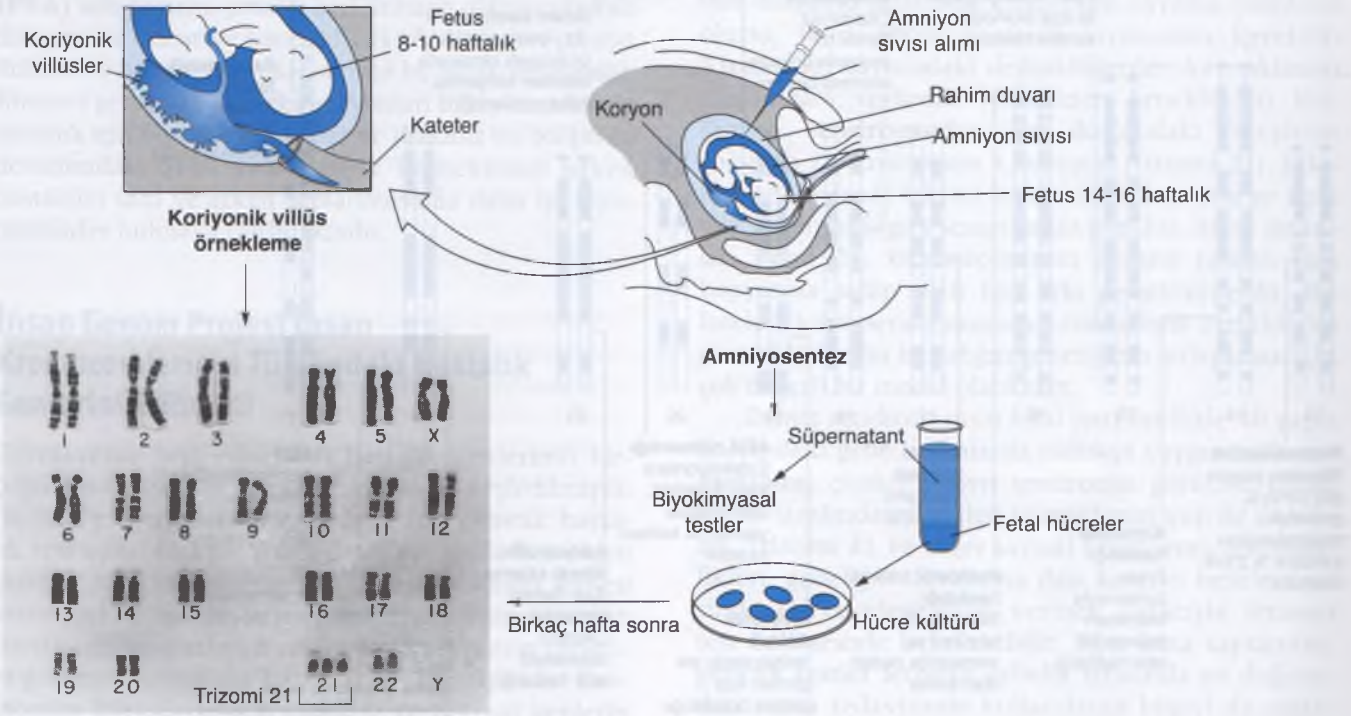
ŞEKİL 11.2 İnsan Kromozomlarının Hastalık Gen Haritaları Haritalar her bir kromozomda genetik bozuklukları temsil eden bir veya iki geni göstermektedir. Her kromozomda buradaki şekillerde gösterilenden daha fazla gen bulunmaktadır. Not: Kromozomlar ölçekli çizilmemiştir.

yapılır. Bir iğne ile anne karnından girilerek fetusu koruyan ve çevreleyen amniyon sıvısından örnek alınır (**Şekil 11.3**). Bu sıvı, deri hücreleri gibi, fetustan dökülen hücreleri içerir. İzole edilen hücreler birkaç gün içinde kültür ortamında sayıca çoğaltılır. Her bir hücre mitoz aşamasında kromozomların daha iyi görülebilmesi için tespit edilir, cam slayda yayılır. DNA'ya bağlı proteinlere bağlanan farklı boyalarla kromozomlar boyanır, açık ve koyu renkli bantlar oluşması sağlanır. Her bir kromozom boyut ve bant şekillerine göre çiftler halinde hizalanır. Bu işlem **karyotipleme** olarak adlandırılır; sex kromozomlarının (X ve Y) varlığına göre cinsiyet tayininde de bu yöntem kullanılabilir (bakınız Bölüm 2).

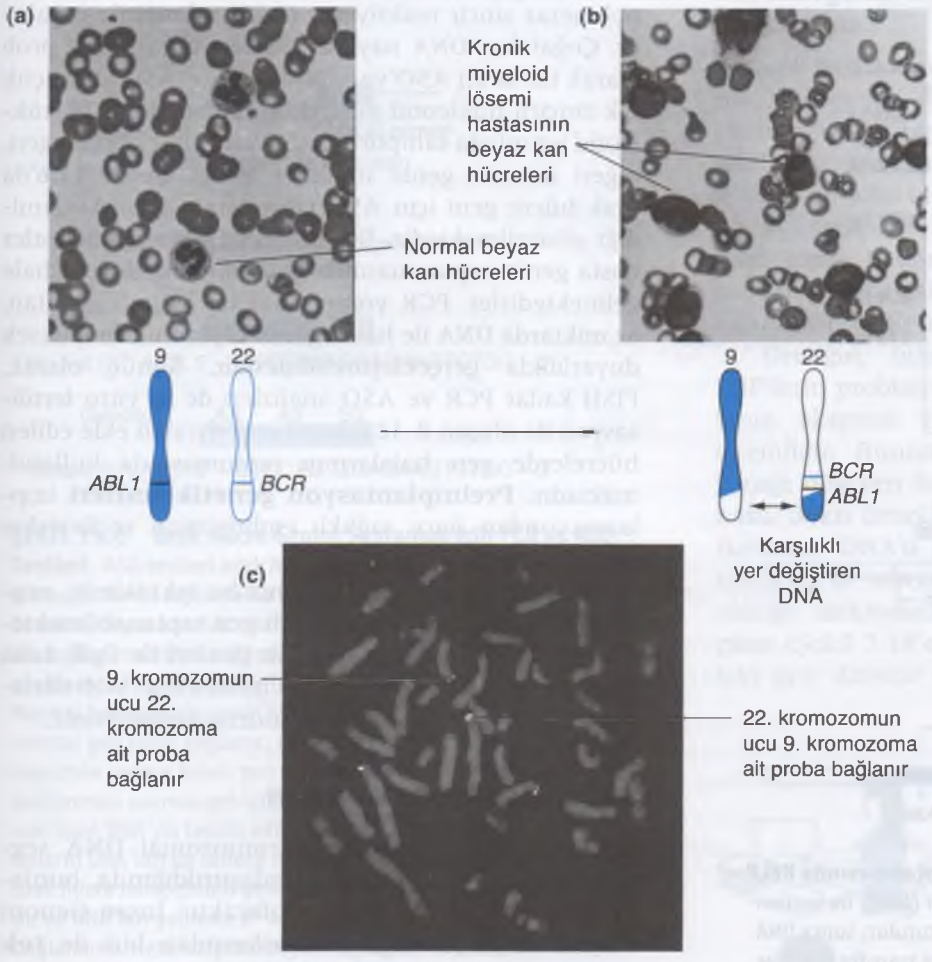
Fetusun koriyonik villüs örneklemesinde plasenta oluşumunu sağlayan fetal dokuyu oluşturan koryonik villüsteki hücre tabakalarından küçük bir parça emici bir tüp ile alınır (Şekil 11.3). Koriyonik villüs örneklemesi amniyosenteze göre karyotipleme için daha çabuk ve daha fazla hücre elde edilmesini sağlar. Bir diğer avantajı da bu işlemin gebeliğin daha erken haftalarında, 8-10. haftalarda, yapılabilmesidir. Bu dönemde fetus daha küçük olduğundan, fetus için daha az düşük riski vardır (amniyosentez ve koriyonik villüs örneklemesi işlemlerinin yaklaşık % 1'inde düşük riski vardır).

Bazı araştırıcılar hamilelerin kanında mevcut olan fetal kromozomun saptanması ve dizilenmesi yoluyla noninvaziv fetal testler geliştirmektedirler. **Noninvaziv prenatal genetik tanı** denen bu tekniklerdeki ilerlemelerin 2013 yılına kadar kullanıma hazır olacağı beklenmektedir.

Karyotipleme erişkinlerde kromozom anormalliklerinin saptanmasında kolayca yapılmaktadır. Bunun için hasta kanından elde edilen beyaz küre hücreleri kullanılır. Hem fetus hem de erişkinlerde karyotipleme için modern bir teknik de **floresan in situ hibridizasyon (FISH)** tekniğidir. FISH tekniğinde, kromozomlar bir slayda yayılır ve floresan problarla her bir kromozom hibridize edilir. Her prob her bir kromozomun üzerindeki belirli "markör" diziler için özeldir. Bazı olgularda FISH farklı renklerde floresan yayan problarla yapılır ve bu işleme **spektral karyotipleme** denir. FISH eksik ve ekstra kromozomların saptanmasında çok yararlıdır. Özellikle hatalı kromozomların saptanması konvansiyonel karyotiplemeye göre daha kolaydır. İnsanlardaki birçok genetik hastalık kromozomun bir parçasının



ŞEKİL 11.3 Amniyosentez ve Koriyonik Villüs Örneklemesi Kromozom anomalilerini saptamak için yapılan fetal testler en çok ya amniyosentez ya da koriyonik villüs örneklemesi yoluyla gerçekleştirilir. Down sendromu olan bir kişiye ait bu karyotipte 21. kromozom üç kopya (trizomi 21) olarak görülmektedir.



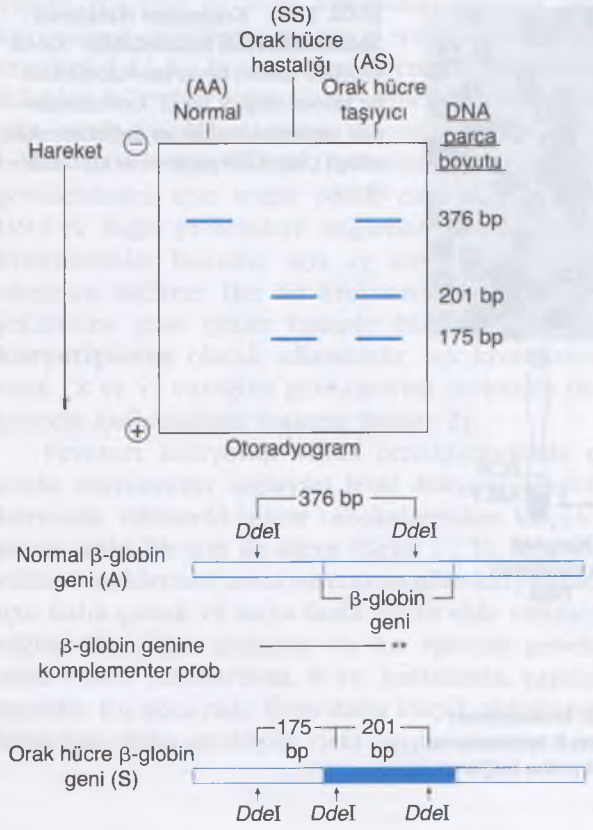
ŞEKİL 11.4 Kromozom Hatalarını Saptamada FISH Kullanılabilir Kronik miyeloid lösemi, beyaz kan hücrelerinin bir kanseri olup, 9. ve 22. kromozomlardaki genlerin karşılıklı yer değiştirmesiyle ortaya çıkar; FISH yöntemi ile saptanabilir.

eksik olması ya da kromozom replikasyonu sırasında bir kromozomdan kopan parçanın diğer kromozomla yer değiştirmesi sonucu oluşan kromozom anormalliklerine bağlıdır. Örneğin, kronik miyeloid lösemide 9. ve 22. kromozomlar arasında DNA karşılıklı olarak yer değiştirir (**Şekil 11.4**). Bu karşılıklı değişime *translokasyon* denir ve her bir kromozom için farklı renkli floresan problar kullanılarak FISH yöntemiyle saptanabilir.

Çoğu genetik hastalık, kromozom yapı veya sayısal anormalliklerinden çok, belli genlerdeki mutasyonlardan ileri gelir. İnsan Genom Projesinin katkısıyla hem erişkin hem de fetusta *her bir* hastalık genini saptayan daha kapsamlı teknikler geliştirilmektedir. Bazı genetik hastalıklar **restriksiyon parçaları uzunluk polimorfizmi (RFLP) analizi** yöntemi ile embriyoda amniyotik hücreden, erişkinde kan hücrelerinden saptanabilirler. RFLP yönteminin arkasındaki temel fikir hatalı gen dizilerinin restriksiyon enzimleri tarafından normal tamamlayıcılarından farklı kesilebilmeleridir, çünkü mutant genlerdeki nükleotid değişiklikleri restriksiyon enzimlerinin kesici bölümlerinin daha fazla veya daha az olmasını etkilerler. RFLP yönteminin DNA parmakizi için kullanıldığını hatırlayınız (Bölüm 8). Örneğin, sağlıklı bireyden ve orak hücre hastalığı olan bireyden alınan DNA'lar restriksiyon enzimleri ile kesilir, farklı ölçülerde olmaları her bir geni kesen restriksiyon enzimlerine bağlıdır. Orak hücre hastalığı geni olan ß-globin gen probuyla Southern blot yönteminde bu durum gözlenebilir (**Şekil 11.5**).

Orak hücre hastalığı eğer kişi ß-globin geninin 2 mutant versiyonundan birini taşıyorsa görülür. ß-globin proteininin mutant kopyaları kırmızı kan hücrelerinin boyut ve şeklini etkileyen anormal hemoglobin oluşumuna yol açar, kırmızı kan hücreleri karakteristik olarak "orak" şeklinde görülür (ayrıca bakınız Şekil 11.20).

RFLP yönteminin başlıca dezavantajı, gende yalnızca restriksiyon bölgesinde oluşan mutasyonların



ŞEKİL 11.5 Bir Genetik Hastalığın Saptanmasında RFLP Analizinin Kullanımı Restriksiyon enzimi (*DdeI*) ile kesilen insan DNA'sı agaroz jel elektroforeze tabi tutulur, sonra DNA Southern blotlama ile naylon bir membrana transfer edilir ve ß-globin genine özgü radyoaktif probla hibridize edilir. Normal ß-globin geni (A) *DdeI* enzimi için iki kesme yeri içerir, orak hücre ß-globin genindeki (S) mutasyonlar (mutant) *DdeI* enzimi için üç kesme yeri oluşturur. DNA parça boyutlarındaki farklar (polimorfizm), probun ß-globin geninde komplementer dizilere bağlandığı yere göre, otoradyografik olarak saptanır. Normal ß-globin geninin iki kopyası bulunan (homozigot, AA) sağlıklı bireyde 376 bp tek band görülür. Mutant ß-globin geninin iki kopyası olan orak hücre hastasında (homozigot, SS) 201 ve 175 bp'de bantlar görülür. Heterozigot birey "taşıyıcı" olarak kabul edilir ve bir normal bir de hatalı geni vardır (AS), fakat fonksiyonel ß-globin kopyası olduğu için orak hücre hastalığı oluşmaz; bantlar 376, 201 ve 175 bp'de görülür.

neden olduğu hataların gösterilmesinde yararlı olmasıdır. **Allel-spesifik oligonükleotid (ASO) analizi** ise gen mutasyonu restriksiyon bölgesinde olmasa da tek nükleotid değişikliklerini saptayabilir. Bu teknikte, DNA insan hücrelerinden, genellikle beyaz kan hücrelerinden, izole edilir, daha sonra hastalık geninin bulunduğu bölge buraya özgü primerler kullanılarak polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) tekniği ile çoğaltılır. Çoğaltılan DNA naylon filtrelere aktarılır ve prob olarak iki farklı ASO'ya hibridize olur. ASO'lar küçük tek zincirli nükleotid dizileridir ve genellikle 20 nükleotid uzunluğa sahiptirler. ASO'ların biri normal gen, diğeri mutant genle hibridize edilir. **Şekil 11.6**'da orak hücre geni için ASO yönteminin nasıl kullanıldığı gösterilmektedir. Bunun gibi PCR tabanlı testler hasta genin saptanmasında giderek daha değerli hale gelmektedirler. PCR yönteminin en önemli avantajı, az miktarda DNA ile hatalı genin saptanmasını yüksek duyarlılıkla gerçekleştirebilmesidir. Sonuç olarak, FISH kadar PCR ve ASO analizleri de in vitro fertilizasyon ile oluşan 8-32 hücreli embriyodan elde edilen hücrelerde gen hatalarının taranmasında kullanılmaktadır. **Preimplantasyon genetik testleri** implantasyondan önce sağlıklı embriyonun seçilmesine olanak sağlar.

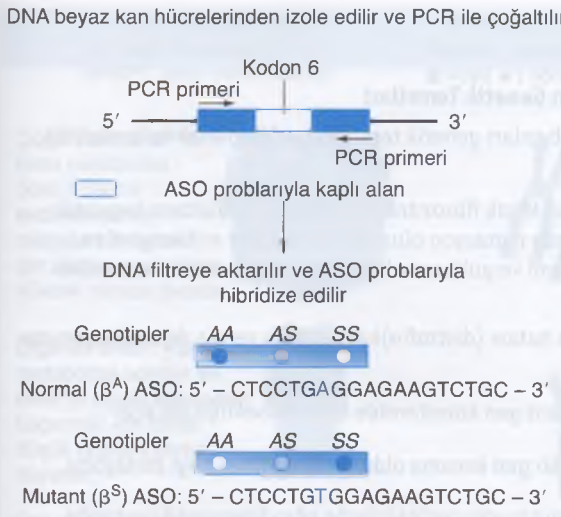
Günümüzde, tanımladığımız bu tekniklerle, erişkin ve fetusta birkaç yüz hatalı gen saptanabilmektedir (Tablo 11.1). İnsan hastalık genleri ile ilgili daha fazla bilgi edinebileceğiniz bazı mükemmel web sitelerine "Ticaret Araçları" bölümünden ulaşabilirsiniz.

Tek nükleotid polimorfizmleri

İki farklı bireyden alınan kromozomal DNA segmentlerinin DNA dizileri karşılaştırıldığında, bunların % 99.9'u tamamen aynı olacaktır. İnsan Genom Projesinin birçok ilginç buluşlarından biri de **tek nükleotid polimorfizmlerinin** (**SNPs**; "snips" olarak okunur) keşfedilmesidir. SNP insanlar arasında en sık gözlenen genetik varyasyon formlarından birini temsil eder. SNP, DNA dizisindeki tek nükleotid değişikliği olup, kişiden kişiye değişir (bakınız Şekil 1.12).

SNP'ler tüm insan kromozomları üzerinde bulunmuştur. SNP'lerin insan genetik varyasyonlarının yaklaşık % 90'ını oluşturduğu ve insan genomundaki her 100 ilâ 300 baz çiftinde bir meydana geldiği tahmin edilmektedir. SNP'lerin çoğu insan genomunun intron adı verilen ve protein kodlamayan bölümlerinde meydana geldiği için hücre üzerindeki etkileri azdır. Ancak SNP bir gen dizisi içinde meydana geldiği zaman, protein yapısında değişime yol açarak hastalık oluşturabilir ya da hastalığın bazı tiplerine yatkınlığı artıran bir etki gösterebilir.

SNP sonuçta hastalık ve strese yanıtımızın nasıl olacağını belirleyen DNA dizilerindeki varyasyonları temsil eder. Hastalık durumu ile bağlantılı ilk keşfedilen SNP orak hücre hastalığında bulunmuştur. SNP'ler genom boyunca sıklıkla meydana geldiği için, hastalıkla ilgili genlerin saptanmasında değerli genetik markörler olarak kullanılırlar. Bazı SNP'ler felç, şeker hastalığı, kanser, kalp hastalığı, davranışsal ve ruhsal



ŞEKİL 11.6 Orak Hücre Genini Saptamak için PCR ve ASO Testleri ASO testleri orak hücre hastalığı gibi tek nükleotid mutasyonlarını saptamakta çok değerlidir (bakınız Şekil 2.20). Bu örnekte, beyaz kan hücrelerinden elde edilen DNA PCR ile çoğaltılır, naylon membrana aktarılır ve floresan olarak işaretli ASO problarıyla hibridize edilir (bağlı prob mavi nokta olarak görülür). Normal hemoglobin geni ($ß^A$) ASO'su naylon membranda sadece normal gen varsa bağlanır, mutant hemoglobin geni ($ß^S$) ASO'su naylonda sadece hatalı gen varsa bağlanır. Bu şekilde, probun bağlanması normal gen için homozigot olan (AA) bireylerden alınan mavi DNA'yla temsil edilir ve $ß^A$ allelin iki kopyası vardır, onların DNA'ları da sadece normal $ß^A$ ASO' ya bağlanır. Homozigot orak hücre hemoglobin geni olanlarda (SS) iki kopya B^S aleli vardır ve DNA'ları yalnızca $ß^S$ ASO'ya bağlanır, normal $ß^A$ ASO'ya bağlanmaz. Heterozigot bireylerin (AS) bir normal, bir mutant kopyaları vardır; sonuç olarak DNA'ları her iki proba bağlanır, fakat homozigotlara göre daha hafif hibridizasyon sinyali oluştururlar.

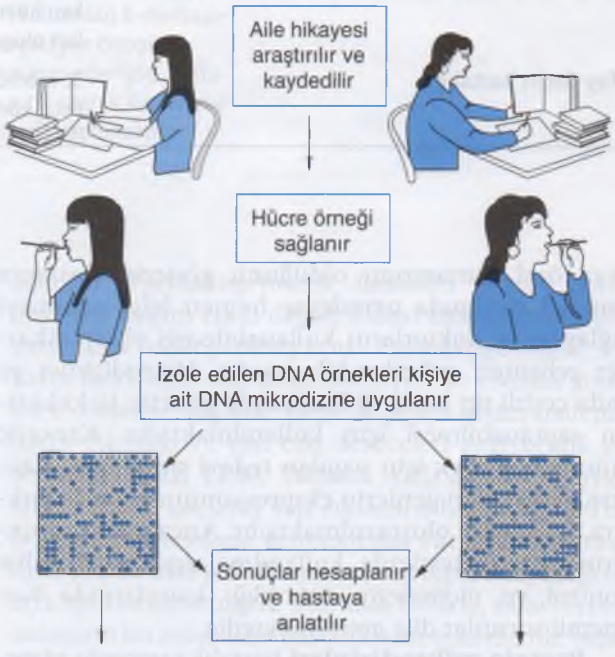
hastalıklar gibi rahatsızlıklar ve genetik temele sahip diğer hastalıkların konukçusu olmaya yatkınlığın saptanmasında kullanılmaktadırlar.

SNP'ler gelecek vaat etmeleri nedeniyle birçok ilaç firmasının dikkatini çekmiş ve bu şirketler **HapMap Projesi** olarak adlandırılan uluslararası çok ortaklı bir projeye milyon dolarlık yatırım yapmışlardır. Aynı kromozomdaki birçok SNP haplotip adı verilen gruplar halinde kümelenmiştir. "Hap" haplotipin kısaltılmış formudur. HapMap, hastalıkların tanı ve tedavisinde SNP'lerin rolünün anlaşılabilmesi ve insan genomunda mevcut 3 milyar baz çiftinde bulunabilecek 1.4 milyondan fazla SNP'in kromozomal lokuslarının saptanması ve katologlanması amacıyla şirketler, akademik enstitüler ve özel vakıflar arasında uluslararası işbirliğiyle yürütülen bir çalışmadır. Biraz önce öğrendiğiniz gibi, ASO analizi SNP saptanmasında kullanılan bir yöntemdir.

Hastalık genlerinin mikrodizin analizleri ile saptanması

Genetik hastalıkların incelendiği bir diğer anahtar teknik, gen çipleri de denen **DNA mikrodizinleri**dir (Bölüm 3). Tek bir mikrodizin binlerce gen probu içerebilir. Araştırıcılar belirli bir hastalıkta eksprese olabilen gen motifini belirlemek için mikrodizin kullanarak hastayı tarayabilirler. **Şekil 11.7**'de gösterildiği gibi, daha sonra hastanın eksprese ettiği hastalık genine bağlı olarak, hastalık gelişme riskini tahmin etmek için mikrodizin verileri kulanılabilir.

Örneğin, bilinen hastalık genleri veya bazı SNP'lerin problarıyla oluşturulan mikrodizinler, hastanın eksprese ettiği genlerin çalışılabilmesi için önemlidir. Bunun için hastanın kan örneği veya yanağı döşeyen hücrelerin kazınması ile elde edilen hasta doku örneğinden DNA veya RNA izole edilir. Hastanın DNA'sı floresan boyalarla etiketlenir ve sonra çip ile hibridize edilir. Hastanın DNA'sının bağlı olduğu mikrodizindeki alanlar floresan ile ortaya çıkar (Şekil 3.18'e bakınız). Hastanın DNA'sının çipteki gen dizisine bağlanması, hasta DNA'sının SNP



Susan'ın Genetik Profili

Karakter	Risk
Bağımlılık davranışı	: Genel populasyondan daha yüksek
Akciğer kanseri	: Genel populasyondan daha yüksek
Kolon kanseri	: Genel populasyondan daha düşük
Alzheimer hastalığı	: Genel populasyondan daha düşük

Lisa'nın Genetik Profili

Karakter	Risk
Kistik fibroz	:% 100 tanı
Tip II diyabet	:Genel populasyondan daha az
Kardiyovasküler hastalık	:Genel populasyondan daha az

ŞEKİL 11.7 Genetik Profil Çıkarmak için Gen Mikrodizinlerin Kullanımı

TABLO 11.1 GENETİK HASTALIK TESTLERİ

Genetik Hastalık Durumu	Hastalık ve Belirtilerin Genetik Temelleri
Kanserler (beyin tümörleri; mesane, prostat, yumurtalık, meme, beyin, akciğer ve kolorektal kanserler)	Farklı mutant genlerin bazıları genetik test için markör olarak kullanılabilir.
Kistik fibroz	Kromozom 7'de yer alan kistik fibroz transmembran kondüktans regulatör (*CFTR*) geninde çok sayıda mutasyon olur. Bunlar akciğer enfeksiyonları, pankreas, sindirim sistemi ve pulmoner fonksiyonlarda problemlere neden olurlar.
Duchenne müsküler distrofi	X kromozomundaki gen hatası (distrofin)kas zayıflığı ve kas dejenerasyonuna neden olur.
Ailevi hiperkolesterolemi	19. kromozomdaki mutant gen kolesterolde aşırı yüksekliğe yol açar
Hemofili	X kromozomundaki hatalı gen kanama olduğunda pıhtılaşmayı zorlaştırır.
Huntington hastalığı	4. kromozomdaki gen mutasyonu yetişkinlerde nörodejeneratif hastalığa neden olur.
Fenilketonüri	Fenilalanini tirozine dönüştürmek için gereken gende mutasyon vardır. Zeka geriliği dahil olmak üzere ciddi nörolojik hasara neden olur.
Şiddetli kombine immün yetmezlik	Adenozin deaminaz gen mutasyonunun neden olduğu bir immün yetmezliktir.
Orak hücre hastalığı	11. kromozomda yer alan ß-globin gen hatası hemoglobin yapısını ve kırmızı kan hücrelerinin yapısını etkiler, kanda oksijen taşınımı bozulur, eklem ağrıları oluşur.
Tay-Sachs hastalığı	5. kromozomda yer alan bir gendeki nadir mutasyondur. Beyinde lipid birikir. Felç, körlük, retardasyon ve respiratuar enfeksiyonlara neden olur.

veya özel mutasyonu olduğunu gösterir. Hastanın genetiği hakkında neredeyse hemen bilgi edinmeyi sağlayan ve doktorların kullanabileceği el çip cihazları geliştiren şirketler bile vardır. Mikrodizinler şu anda çeşitli tip kanserli hastalarda genetik farklılıkların saptanabilmesi için kullanılmaktadır. Kanserle mücadele etmek için yapılan tedavi stratejileri, kansere neden olan genlerin ekspresyonundaki ince farklara dayanarak oluşturulmaktadır. Ancak mikrodizinlerin genetik testlerde kullanılmalarıyla ilgili kalite kontrol ve ölçümlerin tutarlılığı konularında bazı önemli sorunlar dile getirilmektedir.

Protein mikrodizinleri hastalık tanısında nispeten yeni olan bir diğer seçenektir. DNA çipleriyle hemen hemen aynı şekilde kullanılırlar. Örneğin, bu çipler üzerlerine yerleştirilmiş yüzlerce ve binlerce antikor içerebilirler. Hastanın kan proteinlerinin uygulanması ile araştırıcılar hastalığa yol açan mikroorganizmaların poteinlerinin varlığına bakarak hastalığı saptayabilmektedirler.

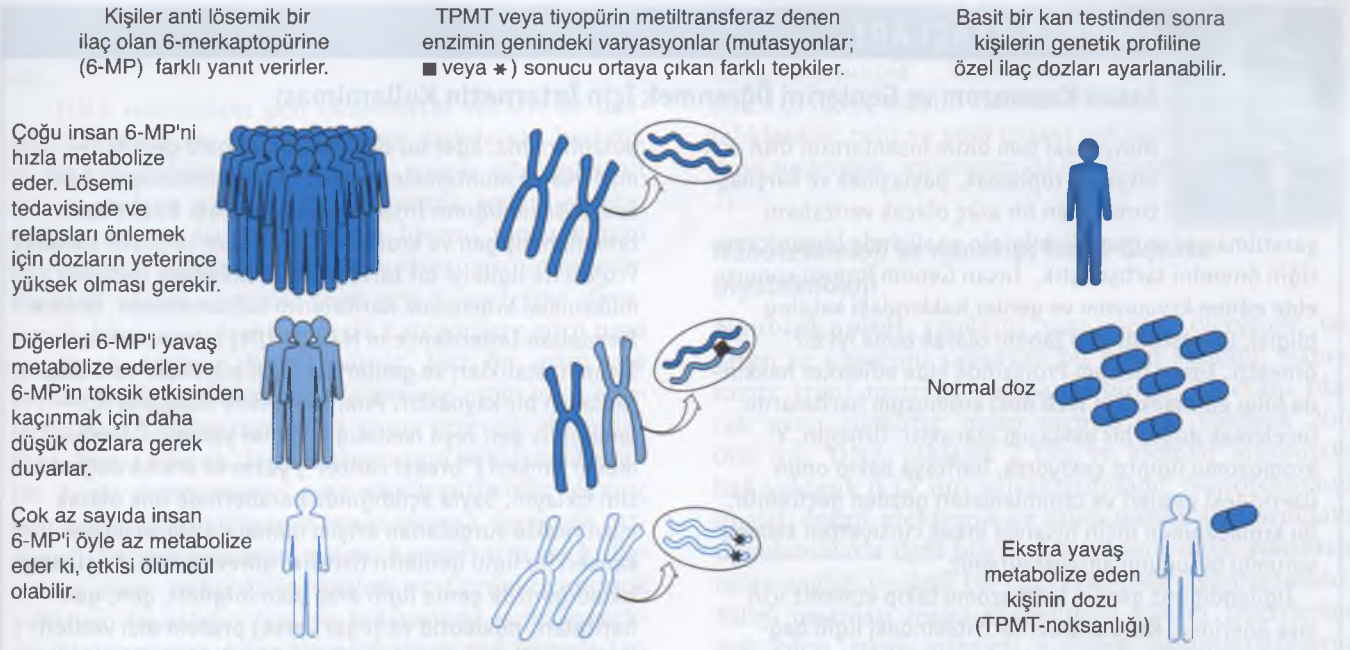
Sonraki kısımda biyoteknolojinin insan hastalıklarının tedavisinde kullanılabilecek yeni ürünleri nasıl oluşturduğunu gözden geçireceğiz.

11.2 Tıbbi Ürünler ve Biyoteknoloji Uygulamaları

Hastalık tedavisinde yeni ilaçların belirlenmesi ve yeni yöntemlerin geliştirilmesi tıbbi biyoteknolojinini başlıca alanlarıdır. Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilen farklı proteinlerin - örneğin insülin, insan büyüme hormonu - insan hastalıklarında nasıl kullanıldığını tartıştık (bakınız Bölüm 4 ve 5). Burada ise, gelecekte daha fazla duyacağınız tıbbi biyoteknolojinin önemli ürünlerini birkaç örnekle gözden geçireceğiz.

Yeni İlaç ve Ecza Ürünleri Arayışı

Amerika Birleşik Devletlerinde kanserin, yakın zamana kadar önde gelen ölüm nedeni olan kardiyovasküler hastalıkları geçeceği tahmin edilmektedir. Fakat ufuktaki pek çok umut verici atılım doktorları, farklı tip kanserlerin tedavisinde yeni stratejiler sağlayarak, güçlendirebilir. Bilim insanları **onkogenler** diye adlandırılan kanser hücrelerinin büyümesini sağlayan pek çok geni araştırmaktadır. Onkogenler, büyüme



ŞEKİL 11.8 Farmakogenomik Aynı hastalığa sahip farklı bireyler, gen ekspresyonlarındaki ince farklar nedeniyle, ilaç tedavisine genellikle farklı yanıtlar verirler. Bir kişide işe yarayan doz, bir başkasına toksik olabilir ki, bu durum geleneksel tıbbın temel sorunudur. Bu örnek, bir kan kanseri tipi olan ALL hastalarını tedavi etmekte uzun zamandan beri kullanılan 6-merkaptopürin (6-MP) adlı ilaca hastaların yanıtlarını göstermektedir. 6-MP-parçalayan tiyopürin metiltransferaz (TPMT) enziminin geninde genetik varyasyonların bulunması nedeniyle, hastaların ilaca nasıl yanıt vereceklerini belirlemek için, hekimler tarafından rutin olarak ilaç vermeden önce hastaların genetik testleri (veya enzim düzeyini ölçen kan testleri) yapılmaktadır.

faktörü ve reseptörleri ile hormonlar için, transkripsiyon faktörü gibi işlev görebilen proteinleri üretirler. Bu proteinler aynı zamanda kansere neden olan hücrelerin büyüme özelliklerini değiştirmeye yardımcı etkisi olan enzimler gibi de davranırlar. Bilim insanları aynı zamanda, kanser oluşumunu kontrol altında tutan proteinler üreten, tümör baskılayıcı genleri de aktif olarak çalışmaktadırlar.

Onkogenler ve tümör baskılayıcı genler bilim insanlarının dikkatini daha çok çekmeye başlamıştır. Çünkü araştırıcılar bu genlerin proteinlerini hedef alarak, proteini veya fonksiyonlarını bloke eden ve onlara bağlanan *küçük moleküler inhibitör* ilaçlar üzerinde çalışmaktadırlar. Benzer şekilde hastalık tedavisinde kullanılmak üzere proteinlere bağlanan ve onları stimule eden "aktivatör" denen ilaçlarla ilgili de çalışılmaktadır. Küçük moleküler ilaçlara ilave olarak, kişiselleştirilmiş tıp ve ilaç dağılımının artırılması üzerinde de birçok çalışma yapılmaktadır.

Kişiselleştirilmiş tıp için farmakogenomik

İnsan Genom Projesi ve SNP keşfi bir bakımdan **farmakogenomik** denen yeni bir alanın oluşumuna yol açmıştır: Farmakogenomik hastanın özgün genetik profiline uygun etkili ilaç ve tedavi stratejilerinin oluşturulduğu özelleştirilmiş tıptır. Farmakogenomik, aynı ilacın farklı kişilerde farklı reaksiyon ve etkinlik göstermesi temeline dayanır. Genetik polimorfizm nedeniyle ilacın etkinliği ve yan etki dereceleri değişkenlik gösterebilir (**Şekil 11.8**). Yalnızca ABD'de her yıl uygun reçete edilen ilaçların yan etkilerine bağlı 100 000'den fazla ölüm meydana gelmektedir. Farmokogenomiğin tıpta düşük maliyetli bir yaklaşım olup olmayacağı tam açıklığa kavuşmamıştır. Bununla birlikte, tıbbi biyoteknolojinin bu ayağı bazı hastalıkların tedavisinde başarılı olmuştur ve büyük bir potansiyele sahiptir.

Günümüzde **kemoterapi**de kullanılmakta olan pek çok ilaç, hızlı bölünen hücreleri hedeflediği için, kanser hücrelerine karşı etkilidir; fakat bu ilaçlar düzenli olarak çoğalan bazı vücut hücrelerini de - örneğin saç, deri ve kemik iliği hücreleri – etkilerler. Sonuç olarak; saç kaybı, kuru cilt, kan hücre sayısındaki değişiklikler ve bulantı kemoterapinin normal hücreleri etkilemesine bağlı olarak görülür. Bilim insanları "sihirli mermi" denen, normal hücreye zarar vermeyip sadece kanser hücrelerini yok eden ilaçlar



TİCARET ARAÇLARI

İnsan Kromozom ve Genlerini Öğrenmek İçin İnternetin Kullanılması

Dünyadaki tüm bilim insanlarının DNA dizi bilgisini toplamak, paylaşmak ve karşılaştırmak için bir araç olacak veritabanı yaratılmasını ve genetik bilginin analizinde biyoinformatiğin önemini tartışmıştık. İnsan Genom Projesi sonucu elde edilen kromozom ve genler hakkındaki katalog bilgisi, ücretsiz bir veri tabanı olarak buna iyi bir örnektir. İnsan Genom Projesinde elde edilenler hakkında bilgi edinmek için Web'deki kromozom haritalarını incelemek doğru bir yaklaşım olacaktır. Örneğin, Y kromozomu ilginizi çekiyorsa, haritaya bakıp onun üzerindeki genleri ve tanımlamaları gözden geçirebilir, bu kromozomun niçin insanda erkek cinsiyetten kısmen sorumlu olduğunu anlayabilirsiniz.

İlgilendiğiniz gen ve kromozomu takip etmeniz için size önerimiz; Rehber İnternet Sitesindeki ilgili bağlantıları birkaç ay boyunca takip etmeniz ve onlarla ilgili ne tür bilgilere ulaşabileceğinizi görmenizdir. Bu siteler insan hastalık genlerini ve kromozom haritalarını öğrenmek için bilinen en iyi sitelerden olup, mükemmel kaynaklardır.

Örneğin, bu yolla bir yakınınızı etkileyen hastalığa yol açan nadir bir gen ile ilgili daha fazla bilgi edinebilirsiniz. Bu sitelerde güncel bilgiler, hatta en son kitapları bulabilirsiniz. Eğer bu sitelerde aradığınız geni bulamadıysanız muhtemelen henüz tanımlanmamıştır! ABD Enerji Bakanlığının İnsan Genom Program Bilgi Sitesi, tanımlanmış gen ve kromozom haritaları ve İnsan Genom Projesi ile ilgili iyi bir tarihçe ve tanımlanmış genlerin mükemmel kromozom haritalarını sağlamaktadır. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) internet sitesi, insan hastalıkları ve genleri ile ilgili büyük bir veri tabanı sağlayan bir kaynaktır. Anahtar kelime kutusuna ilgilendiğiniz gen veya hastalığın ismini yazınız. Örneğin, meme kanseri ("breast cancer") yazın ve arama düğmesini tıklayın. Sayfa açıldığında beraberinde link olarak mavi renkle vurgulanan erişim numaralarını ve meme kanseri ile ilgili genlerin listesini göreceksiniz. Bağlantıyı tıkladığınızda genle ilgili arka plan bilgileri, gen, gen haritaları, nükleotid ve (eğer varsa) protein dizi verileri ile ilgili bilimsel makale bağlantıları gibi bilgi hazinesine ulaşırsınız. Aynı zamanda davranış bozuklukları (örneğin, alkolizm ve depresyon gibi) ile ilgili bulunan genleri de bulabilirsiniz. Biyoteknolojik Bilgi Ulusal Merkezi (NCBI), detaylı kromozom haritalarıyla hastalık genlerine erişim ve Map Viewer aracılığı ile inceleme olanağı sunan, Genomlar ve Haritalar (Genomes and Maps) web sitesine destek sağlamaktadır.

araştırmaktadır. Eğer böyle ilaçlar geliştirilirse, kanserli olmayan dokudaki normal hücreler üzerine hiç veya çok az etki edeceğinden, hastalar daha hızlı iyileşebilirler.

Aşağıdaki örneği gözden geçirelim. Meme kanseri bazı kadınlarda ailesel kalıtım gösterir. Hatalı *BRCA1* ve *BRCA2* genlerini taşıyan kadınlarda meme kanseri gelişme riski yüksektir, ancak diğer meme kanserlerinde net bir kalıtsal geçiş belirlenmemiştir. Bir kadında memedeki kitlenin kanser olduğu düşünüldüğünde, SNP ve mikrodizin analizinde gerekli olan DNA veya RNA'yı izole etmek için dokudan küçük bir parça alınarak, kanser oluşumuna yol açan genlerin analizi yapılabilir. Bu genetik bilginin yardımı ile doktorlar ilaç tedavisini planlayabilirler. Farklı bir genetik profili olan meme kanserli hastaya farklı tedavi uygulanabilir.

1998 yılında FDA'nın onayladığı **Herceptin** adı verilen monoklonal antikor Genentech'de bilim insanları tarafından bu yöntemle çalışılmıştır. Herceptin, meme kanserli olguların yaklaşık %25 - %30'unda aşırı eksprese edilen insan epidermal büyüme faktörü reseptör 2 geninin proteini olan HER-2'ye bağlanır ve onu inhibe eder. HER-2 pozitif olan (HER-2 aşırı eksprese edilen) kadınlarda tipik olarak; metastaz olasılığı daha fazla olan, kötü prognozlu, agresif meme kanseri gelişme olasılığı daha fazladır. Herceptin bazı kadınlarda etkili iken bazı kadınlarda tümör antikora dirençli hale gelir. Benzer problemler kanser tedavisinde kullanılan diğer farmakogenomik ilaçlarda da meydana gelmektedir.

Farmakogenomik olarak üretilen en başarılı ilaçlardan biri **Gleevec**'dir. İlaç Novartis tarafından 2002 yılında kronik miyeloid lösemide (CML) (Şekil 11.4'te açıklanan durum) kullanılması için piyasaya sürülmüştür. Gleevec CML'de görülen, 9. ve 22. kromozomlar arasında DNA'nın karşılıklı değişimi sonucu oluşan, BCR-ABL füzyon proteinini hedefler. Gleevec'in hastalığın tedavisinde etkili olduğu kanıtlanmıştır. Gleevec ve ilişkili ilaçlar CML hastalarının yaşama oranlarını % 30 ilâ % 90 oranında artırmıştır. Gleevec'in etkisini şirketin web sitesinde listele-

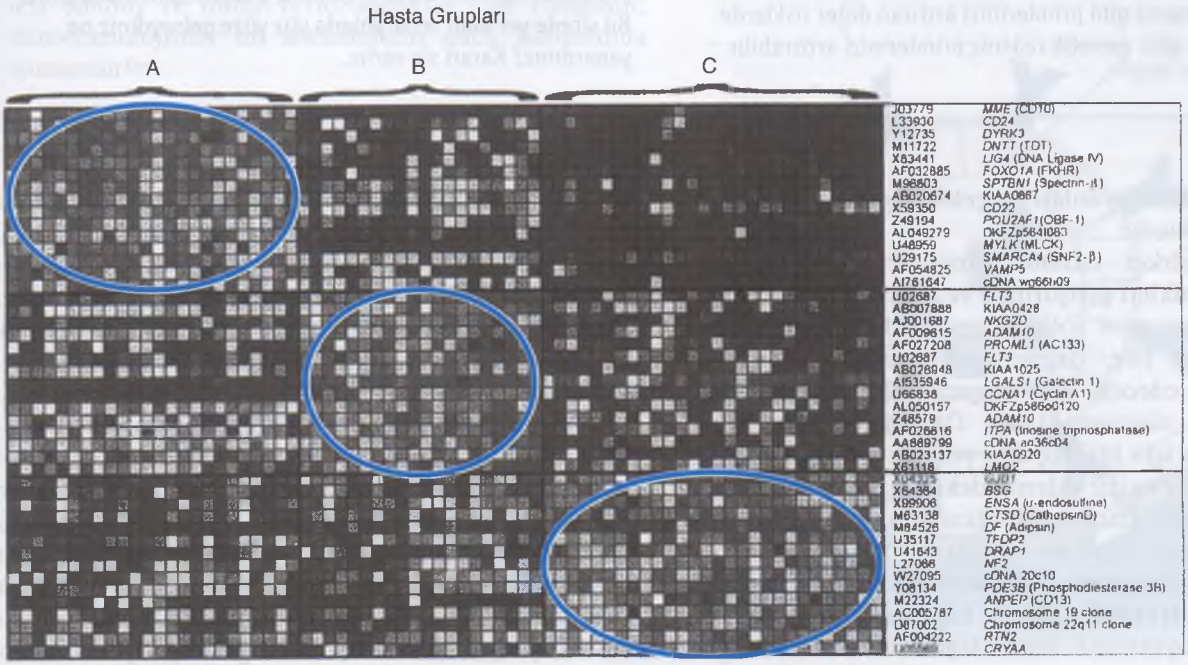
nen Howard Hughes Medical Institute sayfasındaki animasyon linkinden kontrol edip gözlemleyebilirsiniz.

DNA mikrodizin gen ekspresyon verileri ile hastalarda eksprese edilen genlere bakılarak hastalık tanısı konulabilmektedir. Daha sonra, eğer mevcut ise, o genlere göre farmakogenomik tedavi yapılır. **Şekil 11.9**'da farklı formlarda lösemi tanısı konan bireylerdeki mikrodizin veri örnekleri görülmektedir. En aktif olarak eksprese olan gen kümelerine dayanarak, löseminin farklı genetik kategorilere göre nasıl gruplandırıldığına dikkat ediniz. Her bir grup çok sayıda farklı gen ve proteini eksprese ettiği için, bunların aynı kemoterapiye iyi yanıt vereceği düşünülmez. Bunu bilerek, farklı kemoterapi yaklaşımları her bir hasta kategorisine göre özelleştirilebilir. Sonuç olarak hastaların yaşama oranı önemli derecede artmıştır. Benzer yaklaşım meme kanseri için de kullanılmış olup, mikrodizin verileri ve farmakogenomik yaklaşım hastalığın tanı ve tedavisinde rutinleşecektir. Melanom ve diğer birçok kanser tipi için de farmakogenomik tedavilerle ilgili umut vaad eden çalışmalar yapılmaktadır.

Bireylerin genom dizilerinin çıkarılmasına dayalı kişiselleştirilmiş genomik çalışmalarını ve bunların farmakogenomik üzerindeki etkilerini izlemek oldukça ilginç olabilir (Bölüm 3). Benzer şekilde, hastalıklardaki rolü ve yeni tedavi yaklaşımlarını hedeflemesi nedeniyle, epigenom da incelenmektedir (Bölüm 2).

Nanoteknoloji ve nanotıp: Nano-ölçekte biyoteknoloji

Nanoteknoloji yapıların nanometre ölçeğinde tasarım ve yapımını kapsayan bir bilim alanıdır. Nanometre (nm) metrenin milyarda biridir. Referans olarak şunu alabiliriz; insan saçının çapı yaklaşık 200 000 nm, DNA yaklaşık 2 nm ve atomlar arasındaki bağ yaklaşık 0.15 nm uzunluğundadır. Nanoteknoloji imalat, enerji, elektronik ve mühendislik alanlarındaki uygulamalarla ilgili büyük bir iş alanı olup, **nanotıp** insan sağlığı ile ilgili bir nanoteknoloji uygulamasıdır. Bilim insanları insan vücudunda kanser hücrelerini yok eden, tıkalı arterleri açabilen nanopartiküllerin yanı sıra, kan basıncını ölçen, kan oksijen düzeyi ve hormon düzeylerini izleyen nanocihaz sensörler gibi



ŞEKİL 11.9 Gen Ekspresyon Analizi ve Farmakogenomik için Mikrodizinler Burada lösemi hastalarının gen ekspresyon profillerini gösteren mikrodizin sonuçları verilmektedir. Her bir sütun bir hastanın verilerini yansıtmakta, her bir satır ise farklı bir geni temsil etmektedir (şeklin en sağında gen sembol ve isimleri yer almaktadır). Bu siyah-beyaz görüntü renkli görüntüden kopyalandığı için, gri noktalar çokça eksprese olan aktif genleri temsil etmektedir. Mavi oval kümeler aktif olarak eksprese olan genleri (gri ve beyaz noktalar) vurgulamakta, böylece hastalar ekprese olan ve olmayan (koyu noktalar) genlere dayalı olarak farklı gruplara ayrılabilmektedir.



KARARI SİZ VERİN

Genetik Testler: Dikkate Alınacak Konular

Genetik testler yapılmaya başlandığından bu yana, genetik bilginin nasıl kullanılacağı, özel ve kişisel kararların ötesinde nelerin kullanılacağı konusunda endişeler dile getirilmeye başlanmıştır. Bu konulardan bazılarını birlikte düşünelim:

- Günümüzde tedavisi mümkün olmayan genetik bozukluklar için henüz doğmamış çocuk veya erişkinleri test etmeli miyiz?
- Ebeveynlerin henüz doğmamış çocuklarının genetik hatası olduğunu öğrenmesi durumunda, kabul edilebilir kararları neler olabilir?
- Genetik hastalığı olan bir bireyde gen hatalarının saptanmaması veya sağlıklı bir kişide yanlışlıkla hastalık geni olduğunu bildiren hatalı bir sonucun psikolojik etkisi nedir?
- Genetik bilginin mahremiyet ve gizliliğini nasıl sağlarız ve genetik ayrımcılığı nasıl önleyebiliriz? Genetik bilginize kimler ulaşmalı? Genetik yapınız size karşı bir ayrımcılıkta nasıl kullanılabilir? Sağlık sigortası şirketiniz primlerinizi etkileyecek genetik bilginize nasıl ulaşabilir? Kaç yaşında olduğunuz ve araba kullanmanız gibi primlerinizi arttıran diğer risklerde olduğu gibi, genetik riskiniz primlerinizi arttırabilir mi?
- Muhtemel genetik hastalığınızla ilgili, potensiyel eş veya işveren gibi diğer kişileri bilgilendirmek konusunda yükümlülüğünüz nedir?
- Eğer insanların istenmeyen davranışlarının geni keşfedilirse, hukuk mahkemelerinde zanlıların genetikleri nedeniyle suçsuzluklarının ispat edilmesinde genetiğin kullanımı nasıl algılanabilir?
- Toplum genetik hatalı olan bireylerin çocuk sahibi olmalarını önlemek veya caydırmakla ilgili mekanizmalar uygular mı?
- Genetik test hataları trajik sonuçlara yol açabilir. Günümüzde ABD'de genetik testlerin kalite kontrolünde federal standartlar yoktur. Hataları en aza indirmek için zorunlu yeterlilik testleri gerekli olmalı mıdır?

Gördüğünüz gibi, genetik testler kesinlikle sınırsız ve tartışmasız değildir ve bu konularla ilgili kolay cevapların sayısı çok azdır. Genetik testler ve genetik teknolojilerin yarattığı düşündürücü etik ikilemler serisi için Rehber İnternet Sitesinde yer alan "Your Genes, Your Choices" ("Sizin Genleriniz, Sizin Seçiminiz") seçeneğini inceleyiniz. Bu sitede yer alan senaryolarla yüz yüze gelseydiniz ne yapardınız? Kararı siz verin.

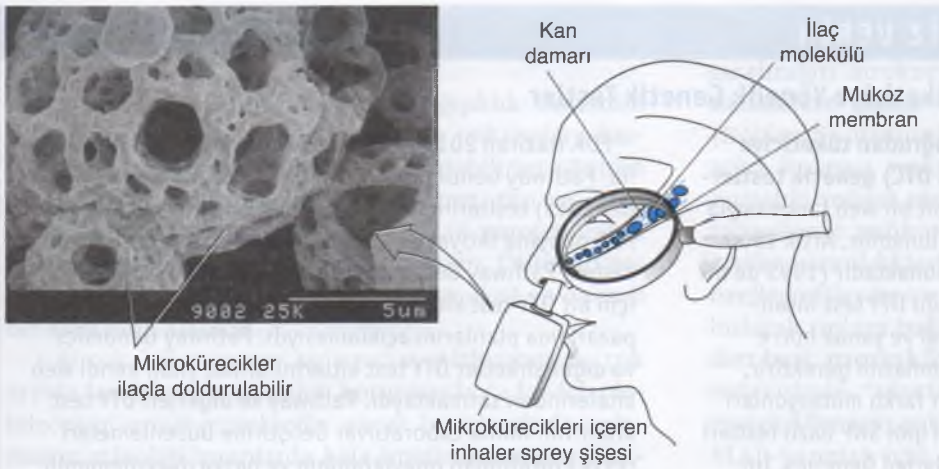
sayısız tıbbi fonksiyonları gerçekleştiren küçük cihazlar öngörmektedir.

Birçok şirket nanoteknolojik yöntemlerle ilaç dağılımı teknikleri geliştirmek ve maksimum etki elde edebilmek için yeni yollar aramaktadır. Bazen ilaçlar iyi tasarlansa bile, dağılım problemleri nedeni ile vücutta etki edeceği yere ulaşamadığından, istendiği kadar etkili olamamaktadır. Örneğin, diz artritini tedavi etmek için bir ilaç ağız yoluyla alındığında çok az kısmı emilir ve diz eklemindeki dokuya yeterli miktarda ulaşamaz. İlacın etkinliğini etkileyen diğer faktörler ise; ilacın vücut sıvılarında çözünürlüğü, parçalanması ve karaciğer ve böbreklerden atılımıdır.

Mikroküreciklер ilaçla kaplı veya dolu olan, 1-100 nm boyutunda, ilacın dağılımının ve etkinliğinin artırılmasında tek yol olabilecek nanopartiküllerdir. Bu partiküller sıklıkla hücre membranındaki fosfolipidlere benzeyen lipit materyalden oluşur. Burun veya ağız aracılığı ile solunum yollarına buğu sprey şeklinde mikroküreciklerin dağılımı, akciğer kanseri ve astım, amfizem, verem ve grip gibi solunum sistemi hastalıklarının tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılmaktadır (**Şekil 11.10**). Kısım 11.3'de lipozom denilen mikroküreciklerin gen terapisinde nasıl kullanıldığı anlatılmaktadır. Bilim insanları ayrıca, büyüyen tümörlerin yakınına antikanser ilaç konmuş mikroküreciklerin transplantasyonu için yöntemler araştırmaktadır. Ayrıca mikroküreciklerle anestezik ilaçların ağrı tedavisinde kullanımı üzerinde de çalışılmaktadır.

FDA 2006'da, Nektar Therapeutics of San Francisco tarafından üretilen ve Pfizer tarafından pazarlanan, inhale (solunumla içe çekilen) insulin içeren Exubera adlı ilacı onaylamıştır. Exubera inhale toz olarak kullanılan insülinin rekombinant formudur ve diyabet hastaları için iğne ile insülin yapımına bir alternatiftir. Fakat daha 1 yıl olmadan Pfizer bu ilacın satışını, düşük satış oranı gerekçesiyle durdurmuştur. Satışın az olmasının nedenleri arasında hekim ve hastaların yeni bir şeyi denemeye isteksiz olmaları, partiküllerin dağılımı için hantal bir inhaler kullanımı ve kötü pazarlama stratejileri sorumlu tutulmuştur.

Günümüzde ABD'de, çoğu kanser tedavisini hedefleyen, nanopartiküllere dayalı ilaçlarla ilgili bir düzineden fazla klinik çalışma yürütülmektedir. Nanotekno-



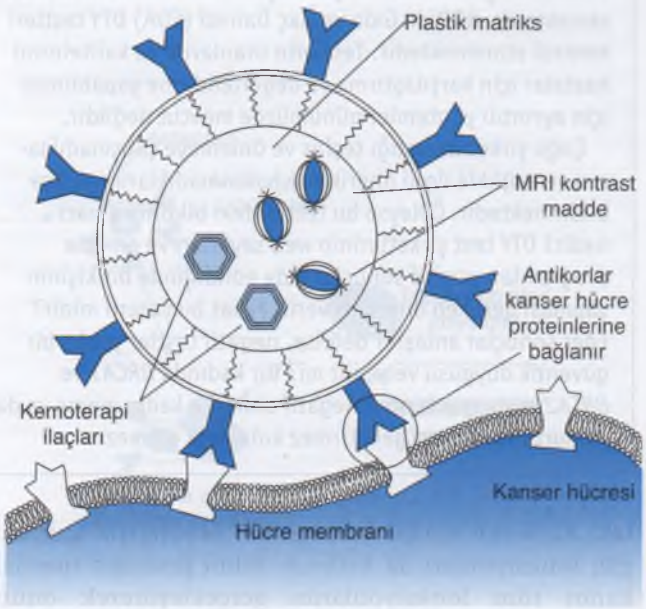
ŞEKİL 11.10 İlaç Uygulamak için Mikrokürecikler İlaçlar vücutta nasıl kullanılacaklarına bağlı olmak üzere, belirli bir bölgeye veya tüm vücuda dağılacak şekilde mikroküreciklerle verilebilir. Bu örnekte ilaç içeren mikrokürecikler buruna sıkılmakta, oradan hızlıca kan dolaşımına ve tüm vücuda dağılmaktadırlar.

loji ile üretilen ilaçlar pazardaki yerini almakta olup, bunların başlıcaları kanser tedavisi ile ilgilidir ve 150'nin üzerinde nanoteknolojik kanser tedavisi geliştirilme aşamasındadır. Bilim insanları, virüs veya altın parçacıkları gibi küçük nanopartiküller aracılığıyla vücuda verildiğinde hedef virüsleri veya kanser hücreleri gibi spesifik hücreleri arayan ve bu hücreleri hızlı, sessiz ve yan etkisiz olarak yok eden akıllı ilaçlar geliştirmişlerdir (**Şekil 11.11**). Bunların bazıları hastalarda test edilmiş ve umut verici sonuçlar elde edilmiştir; nanoteknolojistler bu teknolojinin gücü konusunda iyimserdirler.

Yapay Kan

ABD'de 1930'dan beri kan transfüzyonları rutin ve başarılı şekilde uygulanmaktadır. Transfüzyonlar çoğunlukla, kazaya maruz kalanların tedavisinde, ameliyat sırasında kan desteğinde, hemofili gibi pıhtılaşma bozukluğu olan kişilerin tedavilerinde gereklidir. 1980 yılında, birçok kan ürününde HIV kontaminasyonunun belirlenmesi, daha güvenilir kan ürünlerinin yapımında yeni tekniklerin gelişimine yol açmıştır. Transfüzyon için bağışlanan kan depolanmadan önce HIV, hepatit B ve C virüsleri gibi patojenlerin varlığı açısından test edilir, fakat bağışlanmış kanın raf ömrü sadece birkaç aydır ve buzdolabında muhafaza edilmelidir. Dünyanın pek çok yerinde, özellikle gelişmekte olan ülkelerde, tarama işlemleri çok iyi olmadığından, bakteri ve virüs içermeyen güvenilir kana ciddi bir ihtiyaç vardır. Bunlar ve diğer endişeler, bilim insanlarını yapay kan ve kan yerini alan ürünleri geliştirmek için yöntemler aramaya yöneltmiştir.

Yapay kanın gerçek kana başlıca üstünlükleri; hastalıksız olması, kan sıkıntısı ve acil durumlarda sabit bir kaynak olması ve uzun süre depolanmasıdır. Ayrıca bağışlanmış kanın aksine yapay kan, bağışıklık sistemi tarafından reddedilmeye neden olabilecek, alınm kan grubu ile uyumlu olmak zorunda değildir. Bugüne kadar yapay kan geliştirmenin önündeki en büyük kısıtlama, yapay kanların normal kırmızı kan hücrelerinin ana görevini – yani hemoglobin adı verilen bir protein aracılığıyla vücut hücrelerine oksijen taşınması – yerine getirecek biçimde tasarlanmaları olmuştur. Kırmızı kan hücreleri adeta hemoglobin fabrikasıdır. Fakat normal kırmızı kan hücreleri bundan başka, vücuda demir kaynağı sağlamak ve vücut-



ŞEKİL 11.11 Tümör-Arayan ve Tümör-Öldüren Nanopartiküller Tümör hücrelerini arayıp bulan ve yok eden multifonksiyonel nanopartiküller geliştirilmiş olup, umut vaad etmektedirler. Bu örnekte, kanser hücre proteinlerine karşı antikorlarla kaplanmış ve böylece kanser hücrelerine bağlanan plastik nanopartiküller görülmektedir. Partikülün içinde tümörün X ışınları veya MRI ile görülmesini sağlayan kontrast madde vardır. Nanopartiküller ayrıca tümör hücrelerini yok eden kemoterapi ilaçları da içerebilirler.



KARARI SİZ VERİN

Doğrudan Tüketiciye Yönelik Genetik Testler

Son 10 yılda **doğrudan tüketiciye yönelik -DTY (direct-to-consumer: DTC) genetik testler-** de şaşırtıcı gelişmeler olmuştur. Basit bir web taramasıyla bu tür testler sunan birçok şirket bulunabilir. Artık 1900 hastalıkla ilgili bu tür testler kullanılmaktadır (1993'de bu tür testlerin sayısı yaklaşık 100). Çoğu DTY test insandan alınan tükürük örneği, saç örneği ve yanak hücre sürüntüsünün test şirketine postalanmasını gerektirir. Bir dizi fiyat seçeneği sunan firmalar farklı mutasyonları taramak için çoğunlukla ASO testleri gibi SNP bazlı testleri kullanmaktadır. Örneğin, 2007'de Myriad Genetics, Inc. *BRCA1* ve *BRCA2* testleri için büyük pazarlama kampanyası yürütmüştür. Bu genlerde mutasyon meme ve yumurtalık kanseri oluşma riskini arttırır. DTY test şirketleri mutlak riski yani kişide hastalık görülmesi olasılığını raporlar, fakat hesaplanan bu test sonuçları oldukça değişkenlik gösterir ve belli varsayımlara dayanır.

Bu tür testler birçok nedenle tartışmalıdır. Örneğin, bu testler sonuçların yorumlanması ve uygulanması için hekim veya hemşire ve genetik danışman gibi diğer sağlık personeli olmadan on-line olarak bireysel tüketiciler tarafından satın alınabilir. Bu ürünlerin kalitesi, etkinliği ve doğruluğu hakkında önemli sorular vardır, çünkü DTY test endüstrisi günümüzde büyük ölçüde kendi kendini kontrol etmektedir. ABD'de Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) DTY testleri kontrol etmemektedir. Testlerin oranlarını ve kalitelerini hastalar için karşılaştırma ve değerlendirme yapabilmek için ayrıntılı yöntemler günümüzde mevcut değildir.

Çoğu şirket hastalığı teşhis ve önlemeye çalışmadıklarını ve sağlıkla ilgili önerilerde bulunmadıklarını açıkça bildirmektedir. Öyleyse bu testlerdeki bilginin amacı nedir? DTY test şirketlerinin web sayfaları ve on-line programları pozitif sonuçlar elde edildiğinde bir kişinin yapması gereken önerileri verir. Fakat bu yeterli midir? Eğer sonuçlar anlaşılır değilse, negatif testler yanlış bir güvenlik duygusu verebilir mi? Bir kadında *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonlarının negatif olması o kadın meme ya da yumurtalık kanseri geliştirmez anlamına gelmez.

FDA Haziran 2010'da 5 genetik test üreticisine (Illumina, Pathway Genomics, Navi- Genics, 23andMe, deCODE Genetics) testlerini tüketicilere satabilmeleri için önce FDA onayına ihtiyaçları olduğunu açıkladı. Bu gelişmenin nedeni Pathway Genomics'in "kapsamlı genotipleme" için bir DTY test kitini Wallgreens eczane zincirlerinde pazarlama planlarını açıklamasıydı. Pathway Genomics ve diğer şirketler DTY test kitlerini birkaç yıldır kendi web sitelerinden satmaktaydı. Pathway ve diğerleri DTY test kitlerinin Klinik Laboratuvar Geliştirme Düzenlemeleri (CLIA) tarafından onaylandığını ve başka düzenlemenin gerekmediğini iddia etmişlerdir. CLIA bazı laboratuvar testleri düzenler fakat FDA'nın bir bölümü değildir. Bu gelişme, özellikle FDA'nın DTY genetik testlerini nasıl denetleyeceğinin tartışılmasını sağlamıştır. Bununla beraber, bu baskı yayınlandığında FDA DTY genetik testlerinin denetlenmesi veya düzenlenmesinde herhangi bir kesin plan açıklamamıştır. Düzenleme konusunda değişik görüşler vardır. Bazıları bu konunun FDA'nın işi olmadığı ve tüketicilerin istediği ve gereksinimlerine uygun testleri almalarının serbest olması görüşünü savunmaktadır. Diğerleri ise, FDA'nın tüketicilerin ilgilendiği DTY testleri denetlemesini savunmaktadır.

2010 yılında Ulusal Sağlık Enstitüsü testler ve araştırmalarla ilgi bilginin genel kamu, hastalar, sağlık çalışanları, genetik danışmanlar, sigorta şirketleri ve diğerleri ile şeffaf biçimde serbestçe paylaşımını sağlayan **Genetik Test Kütüğü** (GTR) sisteminin oluşturulacağını açıklamıştır. GTR bireyler ve ailelerin kendi sağlık ve genetik testleri ile igili daha bilinçli kararlar vermelerini sağlamak için temel kaynaklara ulaşmalarına izin vermek amacıyla tasarlanmıştır. Ama DTY test şirketlerinin GTR'ye katılımı henüz zorunlu değildir. Bu durumda, genetik testle uğraşan şirketler katılımcı olacaklar mı? DTY genetik testleri FDA tarafından daha dikkatli biçimde denetlenecek mi? Kararı siz verin.

taki karbondioksidin hemoglobin aracılığıyla atılması gibi fonksiyonları da üstlenir. Bilim insanları normal kanın tüm fonksiyonlarını gerçekleştirerek onun yerini alabilecek ürünleri henüz oluşturamamışlardır; bununla birlikte, umut vaad eden birçok ürün üretilme aşamasındadır.

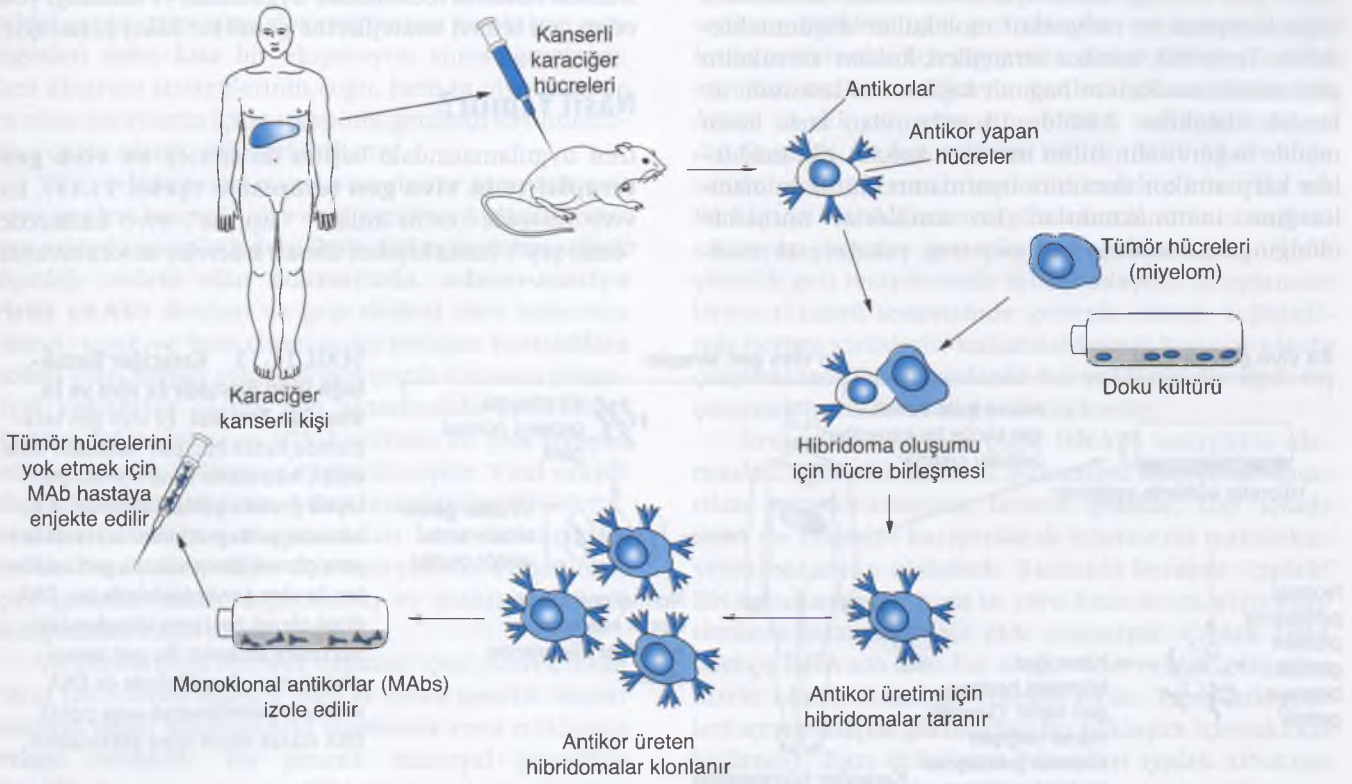
Peki, yapay kan nasıl yapılıyor? Yapay kanlar hücresiz normal hemoglobin gibi oksijeni bağlayan ve taşıyan molekülleri içeren solusyonlardır. Kan yerini alan bazı ürünler sığır hemoglobininden, diğerleri insan hemoglobininde yapılır. Sığır kanı mezbahalarda kesilen sığırlardan toplanır, daha sonra hemoglobin elde edilmesi için işlemden geçirilir. Test edilen yapay kanın pek çok diğer tipi, hemoglobin gibi oksijeni bağlayan ve serbest bırakan florokarbon benzeri kimyasallar kullanılarak üretilir. Sonuçta yapay kan ürünleri gerçek kan transfüzyonuna güvenli alternatif olmalıdırlar. Yapılacak çok iş olmakla birlikte, bu ürünlerin potansiyel yararı; kan yerini alan ürünleri geliştirmek için çok miktarda para ve zaman yatırımı yapan birçok şirkete yol açmasıdır.

Aşılar ve Terapötik Antikorlar

Aşılar antikor üretip vücudun bağışıklık sistemini uyarmak ve enfeksiyon nedeni olan mikroplara karşı korunmasını sağlamak için kullanılabilirler (Bölüm 5). Aşılamanın bizi çocuk felci, tetanoz, tifo ve düzinelerce diğer hastalıkların nedeni olan patojenlerden korumada oldukça etkili olduğu kesindir. Ölümcül patojenlere karşı aşı geliştirmek, oldukça aktif ve önemli bir araştırma alanıdır.

Birçok bilim insanı aşılamanın Alzheimer ve çok sayıda farklı kanser tipinden korunmada da faydalı olabileceğini umut etmektedir, ancak bu amaçlarla aşılamanın etkinliği insanlarda hala ispatlanmamıştır. Kanser aşıları koruyucu olarak değil, kanser hastalığı olan insanları tedavi etmek için tasarlanmıştır ve terapötik tedavi modeli olarak deneysel aşamada kullanılmaktadır. Bu yaklaşımda, mevcut kanser hücrelerine saldırmak için kanser hücre antijenleri enjekte edilerek hastanın bağışıklık sistemi uyarılır. Aslında yeni tip "çıplak DNA" aşılarının uygulanması oldukça heyecan vericidir. Bu aşılarda, antijen üreten genleri kodlayan plazmid DNA'sı direkt olarak dokuya enjekte edilerek, hücrelerin plazmidi aldıktan sonra antijen sentezlemeye başlaması ve bunun sonucunda vücudun antikor üretimininin uyarılması amaçlanır. Diğer DNA aşı tiplerinde bağışıklık yanıtı DNA'nın kendisine karşı oluşur.

Aşılamanın birincil amacı, bağışıklık sistemi tarafından antikor üretimini başlatmak ve yabancı maddelere karşı mücadeleye yardımcı olmaktır (Bölüm 5). Bununla birlikte, antikorlar hastalığa yol açan bulaşıcı mikropları önlemek yerine, mevcut hastalığı tedavi etmek için de kullanılabilirler. Bazı tedavilerde antikorlar şu nedenle de kullanılır; antikorlar üretildikleri patojen ve moleküllere karşı özelleşmişlerdir ve hedeflerini büyük bir doğrulukla bularak onlara bağlanırlar. 1975'de geliştirildiklerinden beri, **monoklonal antikorlar (MAbs)** hastalık tedavisinde "sihirli mermi" olarak düşünülen bazı moleküller için çok özgün saflaştırılmış antikorlardır. MAb yapmak için, bilim insanları saflaştırılmış antijen enjekte edilen fare veya sıçandan antikor elde ederler. **Şekil 11.12**'de karaciğer kanser hücre proteinlerine özgü MAb üretimi gösterilmektedir. Farenin antijene antikor üretmesinden sonraki bu işlem genellikle birkaç hafta alır ve hayvanın dalağı çıkarılır. Dalak çoğunlukla B hücresi olarak adlandırılan antikor üreten B lenfositlerden zengin bir kaynaktır. Kültür çanağında B hücreleri miyelom hücreleri denen sonsuza kadar büyüme ve bölünme özelliği olan kanseroz hücrelerle karıştırılır. Uygun koşullar altında, belirli sayıda B hücreleri ve miyelom hücreleri kaynaşarak **hibridoma** denen hibrit hücreler oluşur.



ŞEKİL 11.12 Monoklonal Antikorların Yapımı

Hibridoma hücreleri sıvı kültür ortamında hızlıca büyürler, çünkü kanser hücresi özelliğindedirler; ayrıca B hücrelerinin antikor üreten genlerini içerirler. Bu hücreler kelimenin tam anlamıyla antikor üreten fabrikalardır. Hibridoma hücreleri, hücreleri çevreleyen sıvı kültür ortamına antikor salgılarlar. Kaynaşmayan fare ve miyelom hücrelerini atmak ve hibridomaları seçmek için kimyasal işlem yapılır, böylece araştırıcılar kaynaşan ve antikor üreten hücrelerden oluşan saf bir populasyon elde eder. Hibridomalar başka bir kültür ortamına aktarılır ve kalıcı bir hücre stoğu için çok düşük ısıda dondurulur. Biyoreaktör kullanarak büyük ölçekli kültürlerde büyütülen hibridoma hücrelerinden çok fazla miktarlarda antikor izole edilebilir.

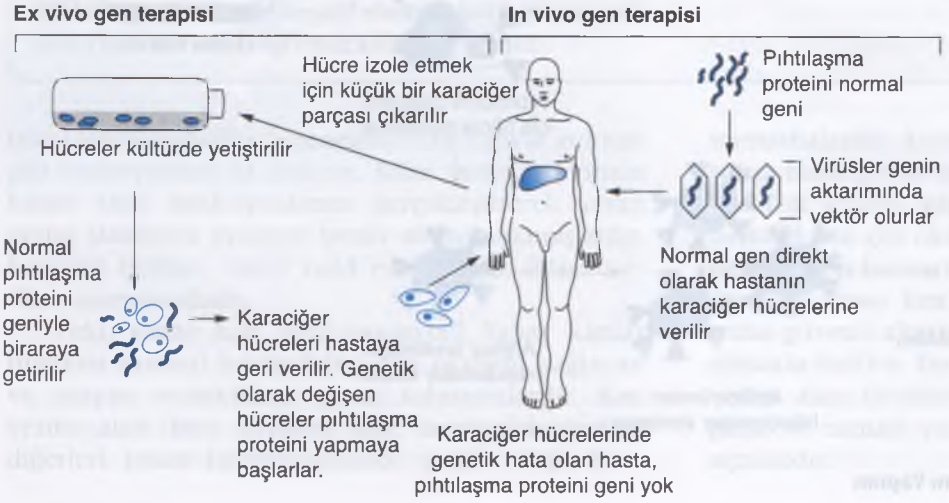
Monoklonal antikorlar, savaşmak üzere geliştirildikleri antijeni bulmaları için hastaya enjekte edilebilirler. Şekil 11.12'de karaciğer kanser hücrelerine bağlanan ve tümörü tahrib eden MAb'ler gösterilmektedir. FDA, nakil organların vücutta reddedildiği durumlarda tedavide kullanmak için geliştirilen ilk monoklonal antikor olan OKT3'ü 1986'da onaylamıştır. 1990'da, meme kanseri (Herceptin) ve lenfoma (Rituxan) tedavisinde kullanılan monoklonal antikorlar geliştirilmiştir. Günümüzde tüm dünyada kanser, kardivasküler hastalıklar, alerji ve diğer hastalıklarda kullanılan bir düzineden fazla monoklonal antikor bulunmaktadır. Bilim insanları bunlardan başka, hasarlı veya kanser hücrelerini hedefleyen veya onları kullanarak bu hücreleri yok edeceği umuduyla monoklonal antikorlara bağlı kimyasal ve radyoaktif moleküller düşünmektedirler. Terapötik antikor stratejileri kokain ve nikotin gibi zararlı maddelere bağımlı kişilerin tedavisinde de faydalı olabilirler. ABD'de 13 milyondan fazla insan madde bağımlısıdır. Bilim insanları kokain gibi maddelere karşı antikor üretimini uyarmanın mümkün olabileceğine inanmaktadırlar. Bu antikorlar antijende olduğu gibi, maddeye bağlanıp onu yakalayarak maddenin beyin hücrelerini etkilemesini engelleyebilirler. Monoklonal antikorlar birçok yıldan beri boğaz streptokoklarının saptanmasında da kullanılmaktadır ve birçok ev gebelik test kitleri gebelik süresince üretilen hormonları saptamada monoklonal antikor kullanmaktadır. Monoklonal antikorların hastalık tedavisinde kullanılmalarına karşı duyulan heyecan ilk çıktıkları zamanki kadar yüksek değildir ve bu alanda bazı sorunlar yaşanmaktadır. Örneğin, Alzheimer hastalarında monoklonal antikor tedavisi birçok hastada insan anti-fare antikor yanıtına bağlı şiddetli yangılara (inflamasyon) neden olmuştur. İnsansılaştırılan antikorlar, monoklonal antikorların neden olduğu bazı problemleri hafifletebilir (Bölüm 4). Giderek görünmektedir ki, 21. yüzyılda da monoklonal antikorlar tıp alanında değerli araçlar olmaya devam edecektir. Gelecek kısımda tıbbi biyoteknolojinin umut verici ve tartışmalı bir konusu olan gen terapisini gözden geçireceğiz.

11.3 Gen Terapisi

Gen terapisi hatalı gen veya genlerin oluşturduğu hastalıkların tedavisinde insan vücuduna terapötik genlerin verilmesidir. Hastalıklı geni tamamlamak ve tedavi etmek için normal gen sağlanması veya hatalı genin normal genle yer değiştirmesi sağlanarak yapılan gen tedavisinin potansiyeli ve gücü hakkında düşünün. Burada hastalık tedavisinde uygulanan ve hastalığı yok eden gen tedavi stratejilerine genel bir bakış sunacağız.

Nasıl Yapılır?

Gen uygulamasındaki başlıca iki strateji **ex vivo gen terapisi** ve **in vivo gen terapisi**dir (Şekil 11.13). Ex vivo terapide (ex'in anlamı "dışında", vivo Latincede "canlı şey") hasta kişiden alınan hücreler laboratuvarda



ŞEKİL 11.13 Karaciğer Bozukluğu Olan Hastada Ex vivo ve İn vivo Gen Terapisi Ex vivo gen terapisinde hatalı hücreler hastadan izole edilir, hücrelerin içine normal pıhtılaşma protein genleri aktarılır ve bu hücreler pıhtı proteinini üretecekleri yere gitmek üzere vücuda geri verilirler. In vivo gen tedavisinde ise, DNA direk olarak hastanın vücudundaki hücrelere aktarılır. Bu gen terapi modellerinin her ikisinde de DNA virüslere paketlenerek veya çıplak DNA olarak hücre içine aktarılabilir.

bakteriyel transformasyona benzeyen tekniklerle tedavi edilir ve sonra tekrar aynı kişiye geri verilir. Teknik olarak DNA'nın hayvan veya bitki hücresine aktarılması **transfeksiyon** olarak adlandırılır. Örneğin, karaciğer hastalığı olan bir bireyin karaciğer hücreleri cerrahi olarak alınır ve kültüre konulur. Vektör veya diğer yaklaşımlar kullanılarak uygun terapötik genlerin daha sonra bu hücrelere verilmesi bir sonraki kısımda tartışılacaktır. Genetik olarak değişen bu karaciğer hücreleri diğer özellikleriyle başlangıçta alınan aynı hücreler olduklarından, organ reddi korkusu olmadan hastaya geri verilir (Şekil 11.13).

İn vivo gen terapisinde hastanın hücreleri cerrahi olarak çıkarılmaz. DNA direkt olarak vücuttaki doku veya hücrelere verilir (Şekil 11.13). İn vivo gen terapisinde görülen bir zorluk, genlerin tüm vücuda değil sadece istenen dokuya verilmesi güçlüğüdür. Bilim insanları gen uygulanmasında başlıca vektör olarak virüslere güvenmektedirler, fakat bazı genler direkt olarak dokuya enjekte edilirler. Şimdiye kadar ex vivo yaklaşımın in vivo'dan daha etkili olduğu kanıtlanmıştır.

Yükü yerine ulaştırmak: Gen iletiminde vektörler

Gen terapisinin hastalık tedavisinde güvenilir bir araç olup olmaması, terapötik genlerin – yani yükün – güvenli ve etkili olarak yerine iletilmesinin sağlanmasına bağlıdır ve bu önemli bir sorundur. Tedavi edilen genetik duruma bağlı olarak bazı tedavi yöntemleri düzeltici genin uzun süre ekspresyonunu gerektirir, oysa diğerleri daha kısa bir ekspresyon süresi gerektirir. Gen aktarımı stratejilerinin çoğu, hem in vivo hem de ex vivo hücrelerin içine terapötik genlerin iletilmesinde, vektör olarak virüsleri kullanır.

Viral vektör insan vücut hücrelerine terapötik gen veya genleri taşımak için viral genomu kullanır, böylece vücuda terapötik geni iletir. Bilim insanları soğuk algınlığı nedeni olan **adenovirüs**, **adeno-asosiye virüs (AAV)** denilen ve grip nedeni olan influenza virüsü, uçuk ve bazı cinsel yolla bulaşan hastalıklara neden olan herpes virüsleri gibi çeşitli virüsleri potansiyel **vektörler** olarak gen aktarımında kullanırlar. Hatta AIDS'e yol açan HIV-1 virüsünün gen terapisi vektörü olarak kullanımı düşünülmüştür. Viral vektör olarak kullanılmak üzere bilim insanları bu virüslerin, hem bir hastalığa yol açmamaları hem de vücudun her tarafına yayılıp diğer dokuları enfekte etmemeleri için, genetik olarak değiştirilmiş ve inaktive edilmiş olduğundan emin olmalıdırlar.

Virüslerin çoğu hücreye bağlanıp içine girerek insan vücut hücrelerini enfekte eder ve sonra genetik materyallerini insan hücresindeki stoplazma veya nükleusta serbest bırakırlar. Bu genetik materyal genellikle DNA'dır, fakat bazı virüsler RNA genomu içerir. Enfekte insan hücresi daha sonra viral genomun üremesi ve viral RNA ve proteinlerin üretilmesi için konak olarak görev alır. Viral proteinler sonunda daha fazla viral partikül oluşturmak için birleşir ve konak hücre parçalanır, virüsler diğer hücreleri enfekte etmek için serbest hale geçer ve yaşam döngüsünü tekrarlar.

Virüslerin insan hastalıklarının tedavi edilmesi için gen taşıyıcı olarak kullanılması tuhaf görünebilir. Bununla beraber, bilim insanları virüslerin genomlarını hücrelere aktarmada oldukça etkili olduklarını, genetikleri değiştirilerek hastalığa neden olmadan ve terapötik genin güvenli bir şekilde aktarımını sağladıklarını açıklamışlardır. Bu bilgilere dayanarak virüsleri faydalı amaçlar için kullanabiliriz. Gen aktarımında virüsler gen tedavi araçları veya vektörleri olarak birçok mükemmel şekilde tasarlanabilirler. Örneğin, adenovirüs – soğuk algınlığına neden olduğu için çocuklarda populasyonun yaklaşık % 80-90'ını enfekte eder – çok çeşitli vücut hücrelerini oldukça etkin olarak enfekte edebilir. **Lentivirüs** gibi retrovirüsler, hatta HIV de dahil, vektör olabilirler; çünkü hücre içine girerek RNA genomlarını DNA'ya kopyalar ve orada sürekli olarak kalırlar. Bu işleme **integrasyon** denir. Gen aktarımında retrovirüslerin kullanılmasının ana nedeni; insan konak hücresinin DNA'sına terapötik genleri integre edebilmeleridir. Genleri hastanın hücrelerindeki kromozomların içine kalıcı olarak sokarak gen terapisinin kalıcı olmasını sağlarlar.

Bazı virüsler sadece belirli vücut hücrelerini enfekte ettikleri için gen terapisi vektörleri olarak kullanımları oldukça yaygındır. Belirli virüsler sadece enfekte ettikleri dokuya genleri aktardıklarından *hedefe yönelik* gen terapisine olanak sağlayabilmişlerdir. Örneğin, herpes virüsün bir ırkı (HSV-1) özellikle santral sinir sistemi hücrelerini enfekte eder. Bu ırk Parkinson ve Alzheimer gibi santral sinir sistemini etkileyen beynin genetik hastalıkları için hedefe yönelik gen terapilerinde iyi bir adaydır. Araştırıcılar beyin tümörü tedavisinde genetik olarak değiştirilmiş herpes virüslerin kullanılabileceği konusunda da çalışmaktadırlar. İnsanlarda bu yaklaşım ile ilgili ön çalışmalar umut verici gözükmektedir.

İnsan hücrelerinin çoğu DNA'yı kolaylıkla alamazlar. Eğer alabilselerdi, bakteriyel hücrelerle başarılan transformasyona benzer şekilde, tüp içinde DNA ile hücreler karıştırılarak hücrelerin transfeksiyonu mümkün olabilirdi. Bununla beraber "çıplak" DNA kullanılarak hem in vivo hem de ex vivo yöntemlerle bazı başarılar elde edilmiştir. Çıplak DNA basitçe DNA'nın kendisi olup, viral vektör olmadan direkt olarak dokulara enjekte edilir. Terapötik genleri içeren küçük plazmidler bu yaklaşım için sıklıkla kullanılır. Bazı dokuların hücreleri çıplak DNA'nın bir kısmını alır ve bu yolla aktarılan genleri eksprese eder.

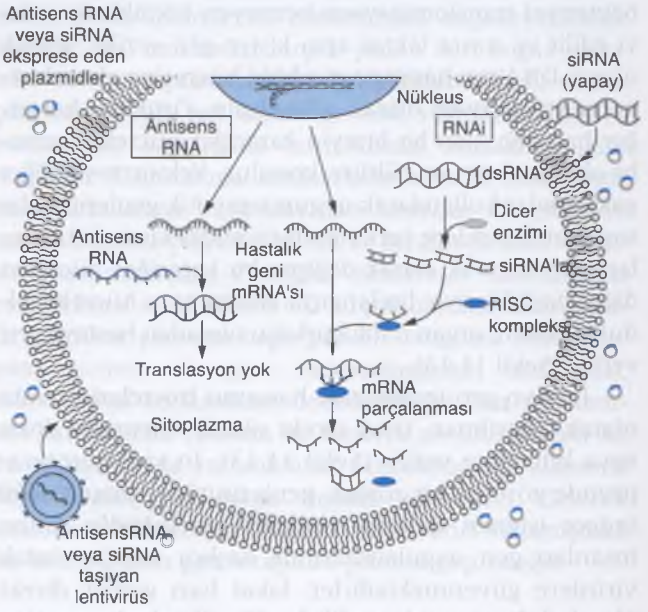
Çıplak DNA'nın aktarılma teknikleri karaciğer ve iskelet kasında bir miktar etkili bulunmuştur. İn vivo transfekte insan hücrelerindeki başlıca problemlerden biri; enjekte edilen DNA'yı daha az miktarda hücrenin alması, terapötik geni eksprese eden hücre sayısı az olduğundan dokudaki gen tedavisinin etkili olmamasıdır. Bilim insanları bu problemlerin üstesinde gelebilmek ve çıplak DNA'nın daha etkili aktarılabilmesi için çalışmalarını sürdürmektedirler. Örneğin, elektroporasyon (Bölüm 5'te plazmidlerin bakteri hücrelerine girişini sağlamak için elektrik stimulasyonun nasıl kullanıldığını tartıştığımızı hatırlayınız) DNA'nın hücre içine girişini uyarmak için kullanılabilir.

Viral vektör olmaksızın DNA aktarımı için bir diğer yaklaşım, lipid moleküllerinden oluşan küçük çaplı içi boş mikrokürecikler olan **lipozomlardır;** bunlar hücre membranındaki yağ moleküllerine benzerler. Lipozomlar genlerle paketlenir ve sonra dokuya enjekte edilir veya üzerine püskürtülür. Benzer bir diğer teknikte ise; DNA ile kaplı küçük altın nanopartiküller, lipozom veya altın parçacıklarını hücreleri öldürmeden hücre membranından geçirerek taşıyan, sıkıştırılmış hava silahına benzer DNA silahıyla hücrelerin içine aktarılır. Biyoparçalanabilen jelatin parçacıkları da gen taşıyan vektörler olarak çalışılmaktadır. "Gen hapları" yoluyla genlerin kısa dönem ekspresyonları da ayrıca çalışılmaktadır. Bu yaklaşımda; haptaki DNA bağırsaklarda intestinal hücreler tarafından absorbe edilir, sonra DNA'nın kodladığı terapötik protein eksprese olur ve bu proteinler kan dolaşımına salınır.

Gen terapisinde antisens RNA teknolojisi ve RNA engelleme

Antisens RNA teknolojisinin, mRNA'nın translasyonunu bloke eden bir yol olarak, gen ekspresyonunu durdurmada kullanılmasını tartışmıştık (Bölüm 3). Bu yaklaşım Flavr Savr domatesin oluşturulmasında kullanılmıştır (bakınız Şekil 6.7). Antisens RNA teknolojisinin temeli, inhibe edilmek istenen mRNA'ya tamamlayıcı baz çifti olarak görev yapacak bir RNA molekülünün tasarlanması, böylece protein sentezinin translasyon aşamasında bloke edilmesidir (**Şekil 11.14**). Bir genin ekspresyonunun durdurulması olan bu yaklaşım, **RNA** veya **gen susturma** olarak adlandırılır. 1970 yılında antisens RNA teknolojisinin gelişmesinden bu yana, bilim insanları RNA susturma yaklaşımını gen terapisinde hastalıklı genlerin devre dışı bırakılması bakımından umut verici bir yöntem olarak düşünmektedirler.

Antisens RNA'lar kültür hücrelerinde gen susturma için etkili olarak kullanılmıştır, fakat hastalık tedavisinde bu teknik henüz umut verici değildir. **RNA interferans (RNAi)** tekniğinin mRNA stabilite ve protein sentezini kontrol etmek için son



ŞEKİL 11.14 Gen Susturma Yoluyla Gen Terapisi için Antisens RNA ve RNAi Yaklaşımları Antisens teknolojisi ve RNAi gen ekspresyonunun durdurulması ve hastalık genlerinin susturulmasında kullanılan iki yöntemdir. Antisens teknolojisinde (solda) antisens RNA molekülü hastalık geninin mRNA'sına bağlanır ve onun proteine translasyonunu engeller. RNAi teknolojisinde çift iplikçikli RNA (dsRNA) molekülleri hücreye verilir. dsRNA'lardan daha sonra Dicer ile kısa interferans RNA'lar (siRNA) oluşur ve bunlar RISC protein kompleksinin yol göstericiliğinde hedef mRNA'ya bağlanarak translasyonu engeller.

zamanlarda yeniden değerlendirilmesi, gen susturma yoluyla gen terapisi yaklaşımlarını yeniden canlandırmıştır (bakınız Şekil 3.19). RNAi ile çift iplikçikli RNA molekülleri hücre içine aktarılır, Dicer enzimi onları 21 nt uzunluğunda **küçük engelleyici RNA'lar (siRNAs**; Şekil 11.14) olarak keser. Daha sonra, siRNA'lar onları hedef mRNA'lara taşıyacak olan **RNA-indüklenmiş susturma kompleksi (RISC)** denen bir enzim kompleksiyle birleşir ve mRNA'lara komplementer olarak bağlanırlar. RISC kompleksi siRNA'nın bağlandığı mRNA'ları parçalar ve böylece protein translasyonu gerçekleşmez. Gen terapisi kullanarak doğal olarak oluşan ve gen ekspresyonunu inhibe eden **mikro RNA'ları** (miRNAs) uyarmak araştırılan bir diğer aktif konudur. Şimdiye kadar RNAi-bazlı tedavilerle ilgili ana sorun; antisens RNA, dsRNA, miRNA veya siRNA terapötiklerinin hedef dokuya in vivo olarak sürekli taşınmasıdır. RNA'lar vücutta hızla parçalanırlar. Ayrıca hücreye penetre olmalarını ve doğru dokuyu hedeflemelerini sağlamak da zordur. Yaygın olan iki taşıma yaklaşımı, antisens RNA veya siRNA'yı direkt olarak ya da hücre tarafından alınan antisens veya

RNAi moleküllerine transkribe olabilen plazmid olarak enjekte etmektir (Şekil 11.14). Lipozomlar, lentivirus aktarma mekanizmaları ve siRNA'ların kolesterol ve yağ asitlerine bağlanması da susturucu RNA'ların taşınması için kullanılmaktadırlar. Diğer bir problem; kompleks hastalıkların büyük çoğunluğu yalnızca bir gen tarafından oluşmaz. Örneğin, bu bölümde daha önce bahsedildiği gibi *BRCA2* geni meme kanser hücrelerinin yaklaşık % 50'sinde aşırı eksprese olur ve antisens RNA teknolojisi in vitro olarak bu geni susturabilir; fakat meme kanseri multigen bir hastalık olup, neden olan tüm genlerin susturulması henüz mümkün görünmemektedir.

RNAi kullanan bir düzineden fazla çalışma devam etmekle birlikte, henüz RNAi ilaçları piyasaya sunulmamıştır. Körlük için ABD'de birkaç antisens ve RNAi klinik çalışması sürmektedir. Makula dejenerasyonuyla (bir tür körlük) mücadele eden bir çalışma *VEGF* geninin ekspresyonunu azaltma ile ilgilidir. *VEGF* tarafından kodlanan protein kan damarlarının gelişmesini artırır. Bu genin aşırı ekspresyonu retinada aşırı miktarda kan damarı oluşumuna yol açar, görmede bozulma ve giderek körlükle sonlanır. 2009'da maküler dejenerasyonla ilgili umut verici RNAi çalışmaları, geç-evre klinik çalışmalar nedeni ile başarısız olmuştur. Tedavisi hedeflenen diğer hastalıklar; çeşitli kanserler, influenza (bilim insanları farelerin akciğerlerinde gribal infeksiyonu bloke etmekte iyi bir başarı göstermişlerdir), diyabet, multipl skleroz, artrit ve nörodejeneratif hastalıkları içerir.

Genetik Hastalıkların Tedavisi: Gen Terapisinde Hedefler

Gen terapisi ile igilenen araştırıcıların çoğu tek gen mutasyonları veya eksikliklerinin yol açtığı genetik bozukluklara odaklanmıştır. Örneğin, orak hücre hastalığı gibi; çünkü bu durumların tedavisi çoklu gen bozukluğuna bağlı oluşan hastalıklardan daha kolay olabilir. Son tahminler tek genin neden olduğu 3000'den fazla genetik bozukluğun mevcut olduğunu belirtmektedir. Tablo 11.1 gen terapisine potansiyel aday olan hastalıkların bazılarını içermektedir.

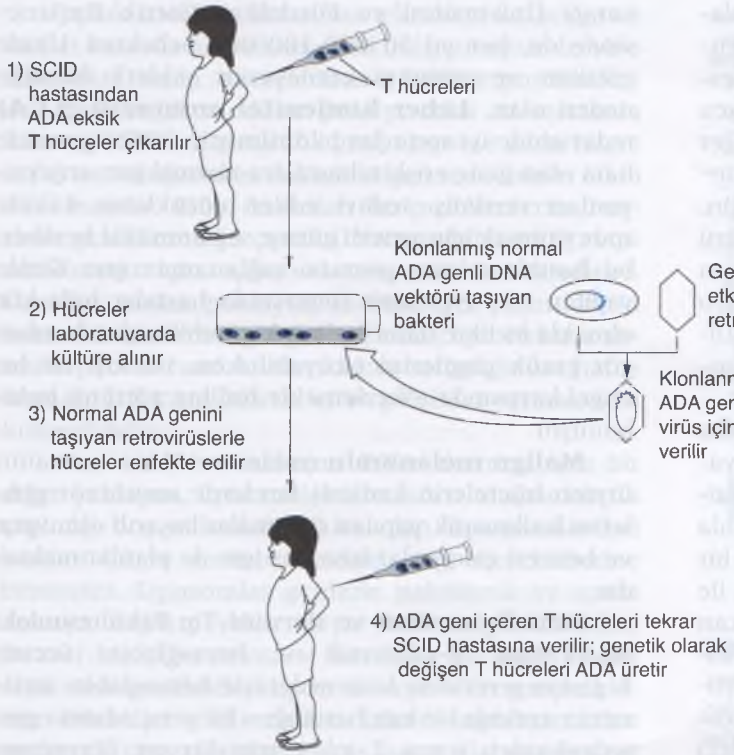
Sağırlık, artrit, melanom, körlük, AIDS, malign beyin tümörleri ve diğer hastalıklarla ilgili yapılan son çalışmalar umut vaat etmektedir. Örneğin, Pensilvanya Üniversitesinde araştırıcılar konjenital **renk körlüğü** olan köpeklerde gündüz görme bozukluğunu gidermek ve retinal koni hücrelerinin fonksiyonlarını düzenlemek için gen terapisini kullanmışlardır. Bu hastalık, retinadaki görme keskinliği ve renkli görme ile ilişkili olan koni hücrelerini etkileyen, 30 000-50 000 insanda bir görülen nadir otozomal resesif bir hastalıktır. Hem genç hem de yaşlı köpekler kalıcı olarak tedavi edilebilmiştir. Pensilvanya Üniversitesi ve Filedelfiya Çocuk Hastanesinde de, her yıl 50 000-100 000 bebekten 1'inde görülen ve retinayı etkileyerek şiddetli körlüğe neden olan, **Leber konjenital amorozisi (LCA)** tedavisinde iyi sonuçlar bildirilmiştir. *RPE65* geninde hata olan genç erişkin hastalara normal gen enjeksiyonları verilmiş, tedavi edilen çocukların 4'ünde spor yapmak için yeterli görme sağlanmakla beraber, bu hastaların tam görmesi sağlanamamıştır. Genle yapılan tek uygulama sonrasında hastalar hala kör olmakla birlikte daha fazla ışık görebilmişler, bazıları göz grafik çizgilerini okuyabilirken, iki kişi ise bir engel karşısında tökezlemekle birlikte yönünü bulabilmiştir.

Malign melanomlu (melanosit denen melanin üreten hücrelerin kanseri) farelerde antitümör genlerini kullanarak yapılan çalışmalar başarılı olmuştur ve benzeri çalışmalar insanlar için de planlanmaktadır.

Paris Üniversitesi ve Harvard Tıp Fakültesindeki araştırıcılar, ß-talasemili – hemoglobin üreten ß-globin genindeki hata nedeniyle hemoglabin üretiminin azaldığı bir kan hastalığı – bir genç adamın gen tedavisinden sonra 2 yıldır transfüzyon ihtiyacının olmadığını ve sağlıklı göründüğünü bildirmişlerdir. Modifiye edilmiş ve hastalık özelliği taşımayan HIV kaynaklı bir lentivirüs, kan kök hücreleri aracılığıyla normal gen kopyasını aktarmak üzere vektör olarak kullanılmıştır. *HMGA2* denen büyüme faktör geninin yakınına integre edilmiş ve böylece onun ekpresyona başlamasına neden olmuş, aşağıda bahsi geçen French X-SCID denemesindekine benzer, bir terapötik genden de bahsedilmektedir. Bu tedavinin güvenli ve etkin olup olmadığını görmek için uzun dönem takipler gereklidir. Burada, iyi çalışılmış, başarılı gen tedavi örneklerini gözden geçireceğiz.

İnsanlardaki ilk gen terapisi

İlk insan gen terapisi W. French Anderson, R. Michael Blaese ve Kenneth Culver tarafından 1990 yılında Bethesda, Maryland'daki Ulusal Sağlık Enstitüsü'ndeki bir grup hekim ve araştırıcı tarafından yapılmıştır. **Şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID)** hastalığı olan 4 yaşındaki Ashanti DaSilva adlı hastanın adenozin deaminaz (*ADA*) geninin hatalı olmasından dolayı immün sistem fonksiyonları yetersizdi. *ADA*, nükleotid deoksiadenozin trifosfat (dATP) metabolizmasına katılan bir enzim üretir. *ADA* gen mutasyonları dATP birikimine yol açar ve dATP'nin yüksek konsantrasyonları bazı T hücrelere toksik olduğundan, bu hücrelerin hemen tamamına yakınının kaybına neden olur. İmmün sistemin antikor üretebilme ve hastalıkla savaşma yeteneğini bozan *ADA* genindeki mutasyonlar nedeniyle, bu durum şiddetli kombine immün yetmezlik olarak adlandırılır. T hücre fonksiyonları olmadan B hücreleri antijen tanıyamaz ve antikor üretemez. Gen terapisin-



ŞEKİL 11.15 İnsanda İlk Gen Terapisi Ex vivo gen terapisi *ADA* geni hatalı olan 4 yaşındaki SCID hastasında kullanılmıştır.

den önce bu hastalar, enfeksiyonlarla mücadele edemedikleri için, gençlik dönemlerine kadar yaşayamazlardı.

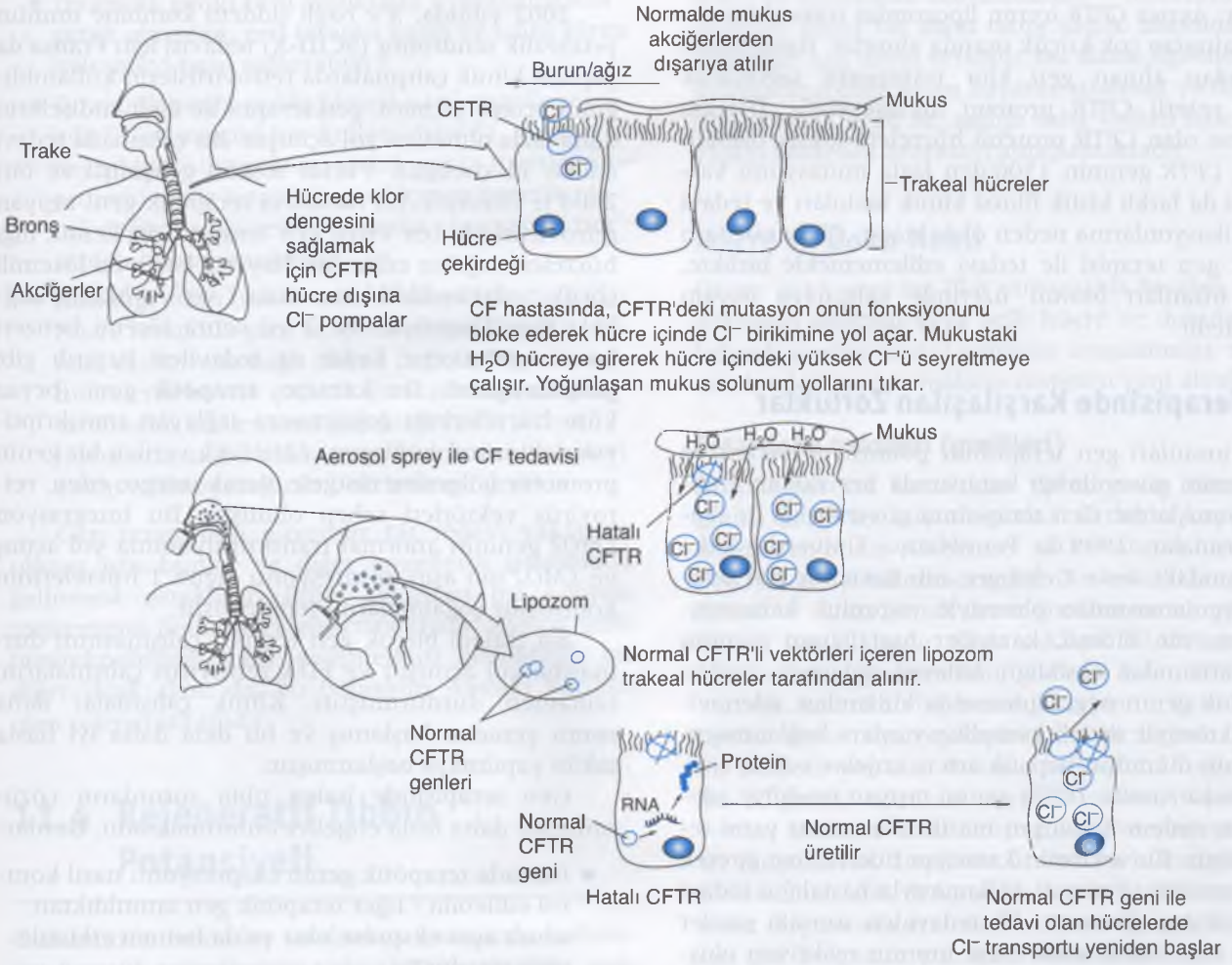
Ashanti'yi tedavi etmek için, normal *ADA* geni bir vektörde klolanlandı ve sonra retroviruse aktarıldı. Ex vivo gen terapi yaklaşımıyla, Ashanti'nin kanından izole edilen ve laboratuvarda kültüre alınan az miktarda T hücresi kullanıldı. Onun T hücreleri *ADA* içeren retrovirüslerle enfekte edildi ve sonra enfekte T hücreler kültüre alındı. Retrovirüsler genomlarını konak hücrenin genomuna entegre ettikleri için, retrovirüsler normal *ADA* geninin kültür işlemi sırasında Ashanti'nin T hücre kromozomlarına entegre oldular. Kültür işleminden kısa bir süre sonra *ADA* içeren bu T hücreler Ashanti'ye geri verildi (**Şekil 11.15**).

Ashanti'ye çok sayıda seansla bu uygulama tekrarlandı. Gen terapisinden birkaç ay sonra, Ashanti'nin T hücreleri artmaya başladı. İki yıl sonra, Ashanti'nin ADA enzimi nispeten yüksekti ve T hücre sayısı normale yakındı. Ashanti şu an sağlıklı yaşıyor. Ashanti'nin tedavisinden sonra SCID'li iki düzineden fazla çocuğun gen terapisi ile immün sistemleri düzeltilmiştir.

Kistik fibroz tedavisi

Kistik fibroz (CF) en yaygın genetik hastalıklardan biridir. ABD'de her yıl yaklaşık 1000 kistik fibrozlu çocuk doğmaktadır ve şu an 30 000'den fazla insan CF hastasıdır. Bu hastalık **kistik fibroz transmembran kondüktans regülâtörü (CFTR)** denilen proteini kodlayan 2 tane hatalı genin varlığında ortaya çıkar. Normal CFTR proteini klor atomunun (iyonunun) hücre dışına atılmasını sağlar. Klor iyonunun hücre içine girişi için birçok hücresel reaksiyona ihtiyaç vardır. CFTR klorun hücre içinde dengede olması için gereklidir. CFTR gen mutasyonları, bu proteinlerin tamamen yokluğu veya hatalı olmasına yol açarak, kistik fibroz hastalığına sebep olur.

CTRF proteini cilt, pankreas, karaciğer, sindirim yolu, erkek üreme sistemi, solunum yolları gibi vücudun birçok hücreleri tarafından yapılır. CTRF yokluğu veya anormal fonksiyonu, klor iyonunun hücrenin dışına pompalanmaması nedeniyle, anormal hücre içi klor dengesizliği oluşturur (**Şekil 11.16**). Klorun trakea gibi organlarda birikmesi aşırı oranda mukus tıkaçlarına yol açar. Bu durum, klorca zengin hücrelere su geçişi olduğu için ortaya çıkar. Normalde trakeadaki mukus toz ve partiküllerin akciğere ulaşmadan vücuttan atılmasına yardımcı olur. Fakat su trakeal hücrelere girdiğinde mukus daha kıvamlı hale gelir. Ayrıca solunum yollarını tıkayarak mikropların çoğalmasına elverişli ortam oluşturur, sonuç olarak kistik fibrozlu hastalarda *Pseudomonas* gibi bakterilerin enfeksiyonları görülür.



ŞEKİL 11.16 Gen Terapisi ile Kistik Fibroz Tedavisi

CF hastalarında başlıca ölüm nedeni, solunum yolu ve akciğer enfeksiyonlarının yol açtığı zatürre ve solunum yetmezliğidir. Vücudun diğer organlarında da benzer etkiler görülür. Erkek üreme organlarındaki iyon transportundaki problemler nedeniyle kısırlığa, hem erkek hem de kadınlarda ter bezlerindeki anormal iyon transportu nedeniyle de aşırı tuzlu tere neden olur. *CFTR* geninin keşfinden önce ter testi tanı için kullanılan standart testti ve bugün de halen kullanılmaktadır.

CF tedavisinde sırta vurma – hastayı baş aşağı pozisyona getirip sırtına vurmak – ve vücudu mukusu boşaltacak pozisyonlara hareket ettirerek akciğerlerdeki mukusu boşaltma, mukusu incelten ilaçlar, enfeksiyon için kullanılan antibiyotikler sayılabilir. Ancak bu hastalık tamamen iyileşmez. Genellikle solunum enfeksiyonları ve solunum yetmezliği nedeni ile erken yaşlarda ölümlere yol açar. Birçok yeni tedavi yöntemi ile bu hastaların erişkin çağa kadar iyi yaşayabilmesi mümkün olmuştur. Ortalama yaşam süresi 1980'lerde 19 yıl iken, günümüzde 37 yılın üzerindedir. 1989'da *CTFR* geni bulunmuş ve 1993'de araştırıcılar normal *CFTR* genini viral vektörlere aktararak gen terapisine başlamışlardır. Bu hastalara bir boru aracılığıyla ağız ve burundan lipozom ve spreyler uygulanarak yapılan çalışmalar da vardır (Şekil 11.16). Trakeal hücre membranındaki lipitlerle birleşen lipozomlar normal *CTFR* genini hücre sitoplazmasına bırakırlar. Normal gen mRNA'ya kopyalanır ve normal protein translasyonu olur. Normal CTFR proteini hücre membranını geçer ve klor iyonunun hücrenin dışına transportunu başlatır; böylece mukus incelir ve semptomlar hafifletilir.

CF gen terapisi henüz güvenilir bir tedavi sağlamamaktadır. Lipozomla taşınan DNA kromozoma entegre olmadığı için, pahalı ve tekrarlayan uygulamalar gerektirir. Trakeal hücreler hızla bölündüğünden, uygulanan genler kaybolur ve daha fazla sprey

gerekir. Ayrıca *CFTR* içeren lipozomlar trakeal hücreler tarafından çok küçük oranda alınırlar. Hatta hücre tarafından alınan gen klor transportu sağlayacak kadar yeterli CFTR proteini üretmeyebilir. Üstelik, eksprese olan CFTR proteini hücrelere toksik olabilir. Ayrıca *CFTR* geninin 1500'den fazla mutasyonu vardır. Bu da farklı kistik fibroz klinik tabloları ve tedavi komplikasyonlarına neden olmaktadır. CF henüz tam olarak gen terapisi ile tedavi edilememekle birlikte, bilim insanları bunun üzerinde çalışmaya devam etmektedir.

Gen Terapisinde Karşılaşılan Zorluklar

Bilim insanları gen terapisinin potansiyel riskleri ve bu işlemin güvenilirliği konusunda her zaman endişe duymuşlardır. Gen terapisinin güvenilirliği ile ilgili tartışmalar, 1999'da Pensilvanya Üniversitesinde, 18 yaşındaki Jesse Gelsinger adlı hastanın gen terapisi uygulamasından ölmesiyle yoğunluk kazanmıştır. Jesse'nin ölümü, karaciğer hastalığının (ornitin transkarbamilaz eksikliği) tedavisi amacıyla verilen terapötik genin uygulanmasında kullanılan, adenovirüs vektörüyle ilişkili komplikasyonlara bağlanmıştır. Jesse'nin ölümünü hepatik artere enjekte edilen *ornitin transkarbamilaz* (*OTC*) genini taşıyan modifiye adenovirüs nedeni ile oluşan masif inflamatuar yanıt tetiklemiştir. Bu vektörün karaciğer hücrelerine girerek OTC proteini üretimini sağlamasıyla hastalığın tedavi edilmesi amaçlanmıştı. İlk tedaviden sonraki saatler içinde tüm vücudunda masif immün reaksiyon oluştu. Yüksek ateş, akciğerlerde sıvı birikimi, çoklu organ yetmezliği ve akut solunum yetmezliğinden hasta 4 gün sonra yaşamını kaybetti.

Bu trajedinin soruşturulması sırasında, klinik çalışmadaki bilim insanlarının gen terapisinin diğer yan etkilerini bildirmedikleri ve bu çalışmada yer alan bazı bilim insanlarının klinik çalışmadan finansal yarar sağlayan özel firmalarla bağlantılı olduğu öğrenildi. Bilgilendirilmiş onay formu tartışması sırasında, hayvan çalışmalarında gözlenen çok ciddi yan etkilerin hastaya açıklanmadığı bulundu. FDA ülkedeki tüm gen terapisi çalışmalarını inceledi, bunların çoğunluğu durduruldu, birkaçı da kapatıldı. Diğer çalışma grupları gen terapisi ile ilgili çalışmalarını gönüllü olarak askıya aldılar. Çoğu ABD'de olmak üzere, tüm dünyada gen terapisi ile ilgili yaklaşık 500 çalışma yapılmaktadır ve 20 ülkede 600'den fazla klinik çalışma sürmektedir. Jesse Gelsinger, gen terapisi ile ilgili kilinik çalışmada ölen ilk kişidir. Ölümü viral vektörlerin kullanımı, non viral vektör geliştirilmesi, gen terapisinin daha fazla irdelenmesi ve daha sıkı kısıtlamaların gerekliliği konusunda daha fazla soruyu ortaya koymuştur.

2002 yılında, X'e bağlı şiddetli kombine immün yetmezlik sendromu (SCID-X) tedavisi için Fransa'da yapılan klinik çalışmalarda retrovirüslerin kullanıldığının ortaya çıkması, gen terapisi ile ilgili endişelerin daha fazla olmasına yol açmıştır. Bu çalışmada tedavi edilen 11 çocuğun 3'ünde lösemi gelişmişti ve biri 2004'te ölmüştü. Bu hastalara terapötik geni taşıyan retrovirüslerle (ex vivo) gen terapisi için kemik iliği hücreleri enjekte edilmişti. Hayatta kalan iki lösemili çocuk, tedavi edildikleri zaman 1 ve 3 aylıktılar, sağlıkla eve dönmüşler ve 2 yıl sonra lösemi benzeri kanser geliştirene kadar da tedavileri başarılı gibi görünmüşlerdi. Bu kansere, terapötik geni (beyaz küre hücrelerinin çoğalmasını sağlayan transkripsiyon faktörünü kodlayan) *LMO2* adı verilen bir genin promotör bölgesine rastgele olarak integre eden, retrovirüs vektörleri sebep olmuştu. Bu integrasyon *LMO2* geninin anormal transkripsiyonuna yol açmış ve *LMO2*'nin aşırı ekspresyonu olgun T hücrelerinin kontrolsüz çoğalmalarını tetiklemiştir.

Bu trajedi birçok gen terapisi çalışmasının durmasına yol açmıştır ve FDA retrovirüs çalışmalarını tamamen durdurmuştur. Klinik çalışmalar daha sonra yeniden başlamış ve bu defa daha iyi hasta takibi yapılmaya başlanmıştır.

Gen terapisinde halen tıbbi sorunların çözümünden daha fazla engeller bulunmaktadır. Bunlar:

- Hastada terapötik genin ekspresyonu nasıl kontrol edilebilir? Eğer terapötik gen tanıtıldıktan sonra aşırı eksprese olur ya da hemen etkisizleşirse ne olur?
- Bilim insanları terapötik genin, vücutta ihtiyaç duymayan diğer hücreleri etkilemeden, ihtiyacı olan hücrelere güvenli ve etkili şekilde ulaşmasını hedefleyebilir mi?
- Gen terapisi, Fransızların çalışmasında görülen rastgele integrasyon problemlerine yol açmadan veya verilen DNA'nın stabilliği bozulmadan, genomun belli bir bölgesini nasıl hedefler? Umut vaad eden aktif araştırmalardan biri, **çinko parmak nükleazlar (ZFNs)** adı verilen proteinleri kullanarak hedeflenen genomu düzenler. Bu nükleazlar DNA-dilimleyen genom makasları gibi belirli DNA parçalarını keser, örneğin hatalı geni. ZFN'ler diziyi kesip başkasıyla yer değiştirmek için kullanılabilir Gen terapisinde, hatalı geni "çıkarıp" yenilenmesini düzenleyen, ZFN kodlayan plazmidler yoğun olarak araştırılmaktadırlar. ZFN-tabanlı işlem, HIV'li hastalarda virüsün yayılımını engellemesi umud edilen ilk gen terapisi çalışmasıdır ve virüsün hücreye girişini sağlayan proteini kodlayan *CCR5* geninin işlevini durdurmaya dayanır.

- Terapötik genin belli aralıklarla uygulanmasına gerek olmadan, gen terapisi kalıcı ve uzun süren iyileşmeyi nasıl sağlayabilir?
- Terapötik genin reddedilmesi nasıl engellenebilir? Gen terapisi her kullanıldığında, alıcının bağışıklık sisteminin terapötik genin ürettiği proteini ya da terapötik geni içeren genetik olarak değişmiş hücreleri reddedip etmeyeceği her zaman bilinmemektedir.
- Hastalığı etkin olarak tedavi etmek için ne kadar hücre terapötik geni eksprese etmelidir? Bu hastalık durumuna bağlı olarak değişir, fakat hasta hücrelerin büyük çoğunluğunun terapötik gen tarafından etkilenmesi gerektiği ya da sadece hücrelerin az bir miktarının düzelmesi ile tedavi edilip edilmeyeceğinin belirlenmesi gerekir.

Gen terapisinin güvenilir bir tedavi yaklaşımı olması için bunlar ve diğer engellerin üstesinden gelinmesi gereklidir. Bilim insanları bu konuda mükemmel ilerlemeler göstermektedir. Ayrıca, tıbbi biyoteknolojinin hızlı gelişmelerin görüldüğü bir diğer sıcak alanı da, bu bölümün sonraki konusu olan rejeneratif tıpdır.

11.4 Rejeneratif Tıbbın Potansiyeli

Günümüzde hekimler tarafından insanlarda kullanılan hastalık tedavilerinin çoğu cerrahi teknikler, radyasyon tedavileri ve ilaç tedavisi gibi yaklaşımlarla sınırlıdır. Bu tedavi yaklaşımları hastalıkların tedavisinde kulanılmakla beraber, bunlar hasarlı organın fonksiyonlarının eski haline gelmesi veya dokunun yenilenmesini sağlayamazlar. Örneğin, kalp krizi veya felç geçiren bir kişide sıklıkla doku hasarı oluşur. Organ hasarlandığında fonksiyonlarını eski haline getirmenin tek yolu, hasarlı dokuyu yenisi ile değiştirmektir; ancak bunun beyin veya kalp dokusunda doğal olarak oluşması zordur.

Embriyoda organların gelişimi sırasında genlerin ekspresyonundaki değişikler belirlenmiş sırayla olmalıdır. Hücrede oluşan istenmeyen değişiklikleri ilaçlar bile düzeltemeyebilir; bir organda şiddetli bir hasar oluştuğunda yeni dokunun tamir ve büyümesinin uyarılmasını hiçbir ilaç sağlayamaz. İnsan Genom Projesinden edinilen bilgilerle bile, bir veya birkaç ilaçla, organ fonksiyonlarının eski haline getirilmesi ve doku yenilenmesi için gereken uygun zamanda gen ekspresyonlarındaki yüzlerce değişikliğin uyarılarak kullanılması son derece düşüktür.

Rejeneratif tıp – hasarlı doku ve organların tamiri ve yenisi ile değiştirilmesi için kullanılabilen doku ve hücrelerin oluşturulması – biyoteknolojinin heyecan verici bir alanı olup, sağlık alanında köklü değişikler için umut vericidir. Bu alanla ilgilenen bilim insanlarının çoğu insan hayatını uzatmak ya da ölümsüzleştirmek değil de, sağlığı daha kaliteli hale getirip yaşam kalitesini artırmayı amaçlamaktadır.

Hücre ve Doku Nakli

Organ nakli yeni bir fikir olmamakla beraber, hasarlı dokunun onarımı veya belli hücre ve dokuları naklederek yenilenmesini sağlayan uygulamalar, tıbbi biyoteknolojik araştırmaların nispeten yeni alanlarıdır.

Fetal doku nakilleri (greftleri)

Nörodejeneratif hastalıklar yavaş yavaş oluşan, zamanla beyin fonksiyonlarındaki ilerleyici kaybın başlıca nedenleridir. Alzheimer ve Parkinson hastalıkları belki iki en iyi bilinen örnektir. Bu hastalıklar sırasıyla birinci ve ikinci olmak üzere görülen en sık nörodejeneratif hastalıklardır. Yılda yaklaşık 50 000 yeni Parkinson hastalığı tanısı konmakta ve halen 500 000 civarında Amerikalı bu hastalığa sahiptir. Hastalık *substansiya nigra* (siyah çekirdek) denen beynin içindeki bir bölgede yer alan hücrelerin kaybına bağlı oluşur. Bu bölgedeki nöronlar (sinir hücreleri) *dopamin* adı verilen hücreler arası iletişimi sağlayan nörotransmiter oluştururlar. Dopamin üreten bu hücrelerin kaybı titreme, halsizlik, dengesizlik, beceri kaybı, kas sertliği, koku duyusunda azalma, yutma ve konuşma zorlukları gibi bulgulara yol açar. Tedavilerin çoğu beyinde dopamin üretiminin artırılmasına yöneliktir, ancak 4 ilâ 10 yıl içinde hastalık ilerler; hastanın yaşam kalitesini giderek bozar ve kişiler hastalığa bağlı komplikasyonlardan kaybedilirler.

Bölünebilen fetal nöronların aksine, erişkin nöron hücrelerinin çoğu hasarlandığında kendi kendilerini tamir edemezler ve bölünemezler. Bilim insanları Parkinson hastalığı ve diğer nörolojik hastalıkların tedavisinde fetal nöronların nakli ile uzun zamandan beri ilgilenmektedirler. Temel strateji, bu hücrelerin nakledildikten sonra diğer nöronlarla bağlantı kurmasını sağlayıp bunlar aracılığıyla hasarlı beyin hücrelerinin yenilenmesi ve beyin fonksiyonlarının yeniden kazanılması üzerine kurulmuştur. Kemirgenlerde gösterilen başarıdan sonra, fetal doku nakli 1980'lerin sonlarından beri kullanılmaktadır ve 100'den fazla hastaya benzeri nakiller uygulanmıştır. İnsan fetal dokusu çoğunlukla kaza kurbanlarından ve yasal olarak yapılan kürtaj sonrası elde edilen embriyo ve fetüslerden elde edilir. Fetal nakil yapılan hastalarda değişik derecelerde düzelmeler görülmüştür; hastaların % 40'ından fazlasında Parkinson benzeri semptomlarda düzelme ve bazı vakalarda birkaç yıl sonra semptom-

ların çoğunun kaybolduğu görülmüş, ancak fetal nakiller ile tam bir iyileşme sağlanamamıştır.

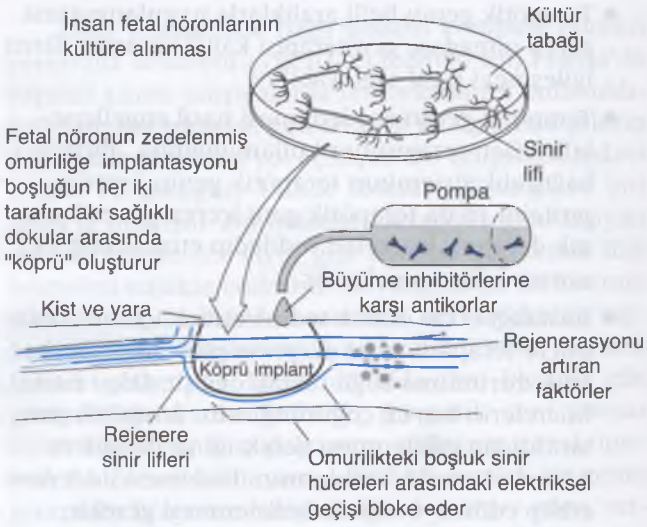
Bugün dünyada omurilik travmasına bağlı olarak 250 000'den fazla felçli ve omurilik hasarı ile yaşayan yaklaşık 2 milyon insan vardır. Her yıl tüm dünyada yaklaşık 85 000 kişi, ABD'deki yaklaşık 10 000 hastayı da içeren, omurilik hasarından muzdariptir. Omurilik ezildiğinde veya sinir lifleri kesildiğinde hasar oluşabilir. Omuriliğin kısmen veya tamamen kesilmesi, hasarın olduğa yere bağlı olarak, parapleji denen vücudun belden aşağı kısmında felce veya tetrapleji denen boyundan aşağı tüm vücutta felce yol açabilir. Parapleji tedavisinde birçok strateji kullanılmıştır. Bunlardan biri, fetal veya erişkin nöronlardan elde edilen sinir liflerinin omuriliğin hasarlı kısmında kesilen parçalar arasına köprü oluşturmak için nakil yapılmasıdır (**Şekil 11.17**). Bu tip köprü implantları köpek ve farelerde başarılı olmuştur. Bilim insanları sinir gelişmesini engelleyen ya da onu uyaran inflamatuar kimyasallar hakkında daha fazla bilgi edindikçe; daha az yaralı doku oluşumu, glial hücre denen destek hücrelerindeki yaralı dokuların yol açtığı hasarın azaltılması, büyüme engelleyici moleküllerin bloke edilmesi ve aynı zamanda nöronların yenilenmesini uyarmak mümkün olacaktır.

Organ nakli

Organ nakli yaşam kurtarabilir ve kurtarmaktadır. ABD'de her yıl yaklaşık 8 milyon organ yetmezliği ve doku hasarı ile ilgili cerrahi yapılmaktadır, fakat her yıl yaklaşık 4000 civarında insan organ nakli için beklerken ölmektedir. En az 100 000 kişi ise daha bekleme listelerine giremeden ölmektedir. ABD'de organ hasarı ve doku ilişkili olarak 400 milyar doların üzerinde sağlık harcaması yapılmaktadır. Bu rakam yaklaşık olarak tüm ulusun sağlık harcamalarının yarısını yansıtmaktadır.

Otogreft – yani kişinin kendi dokusunun vücudunun bir bölgesinden başka bir bölgesine nakli – bazı nakil sorunlarını hafifletebilir. Örneğin, koroner arter bypass; hastanın bacağından çıkarılan damarın kalpteki artere, tıkalı damarın etrafını by pass yaparak, cerrahi olarak bağlanmasıyla yapılır. Fakat, eğer hastanın kalp veya karaciğer nakline ihtiyacı varsa, alıcıya bağışlanacak organ için başka bir kişinin bulunması gerekir. İnsana tam anlamı ile uyumlu bir donör bulunsa bile, organ reddi başlıca problemdir. Alıcının bağışıklık sistemi donör organı yabancı olarak algılarsa red reaksiyonu oluşur. Transplantasyonda organ uyumu için doku tiplerinin donör organın alıcı ile uyumluluğu açısından kontrol edilmesi, doku tiplemesinin yapılması gerekir.

Doku tiplemesi vücuttaki her hücrenin yüzeyinde bulunan işaretleyici proteinlere dayanır. Doku



ŞEKİL 11.17 Boşluğun Köprüyle Kapatılması Pek çok omurilik zedelenmelerinde, hasarlı omurilikte bir boşluk oluşur. Bu da sinir uyarılarının elektriksel geçişini bloke ederek felç ve vücudun dokunma, ağrı, ısı gibi duyularının kaybı ile sonuçlanabilir. Deneysel uygulama olarak, omurilik yaralanmalarının tamirinde fetal nöronlar zedelenmiş bölgeye implante edilerek normal nöronlarla aralarında köprü oluşması sağlanır. Bilim insanları bu uygulamayı omurilik onarımını inhibe eden kimyasalları bloke eden antikorlarla kombine ederek ve nöron rejenerasyonunu uyaran büyüme faktörlerini uygulayarak, omurilik hasarlarında oluşan boşluğu köprü kurarak kapatmaya çalışmaktadırlar.

tipleme proteinleri **major histokompatibilite kompleksi (MHC)** denilen – *histo* "doku "anlamına geldiği için böyle adlandırılır – 70'den fazla genin bulunduğu büyük bir grubun parçasıdır ve uyumlu bir organ nakli için MHC molekülleri donör ve alıcı arasında uyumlu olmalıdır. MHC proteinleri pek çok farklı tiptedir. İnsan lökosit antijenleri olarak adlandırılan (HLA'lar, çünkü ilk olarak alyuvar hücrelerinde bulunmuşlardır) ortak bir grup hemen hemen tüm vücut hücrelerinde bulunur. B ve T hücreleri gibi bağışıklık sistemi hücreleri vücutta doğumdan beri varolan "kendi" (aynı kişiye ait) vücut hücrelerindeki HLA'ları tanır, oysa diğer "kendi-olmayan" ya da yabancı hücreler bağışıklık sistemi tarafından saldırılıp yok edilirler. Bazı ortak HLA'lar insan dokularının çoğunda bulunur, diğerleri ise kişiye özel tek tiptir. Başarılı bir organ nakli için donör organ ve alıcının hücreleri arasında çeşitli HLA tiplerinin tam eşleşmesi gerekir; aksi halde alıcı nakledilen organı reddeder.

1963'deki ilk karaciğer naklinden beri, cerrahlar organ reddini azaltmak için alıcının immün sistemini zayıflan immünosüpresif ilaçlar kullanmaktadırlar.

Çoğu transplant alıcısı yaşamlarının geri kalan kısmında immünosüpresif ilaçları kullanmak durumundadırlar. Bu uygulama nedeni ile immünosupresif ilaçlara bağlı olarak hayatı tehdit eden enfeksiyonlar oluşur. Organ donörlerinin yetersizliği, nakil reddi gibi sorunlar nedeni ile donör organ sağlayacak başka yöntemler bilim insanları tarafından araştırılmaktadır.

Ksenotransplantasyon — farklı türlerden organ transferi— bir gün insandan insana organ nakline uygulanabilir bir alternatif olabilir, böylece insan donör organına olan muazzam ihtiyacın azalmasına yardımcı olabilir. Habeş maymunları bir zamanlar insanlara organ sağlayan hayvan seçeneği olarak kabul edilmişti. Hayvandan insana ilk organ transplantasyonu, 1984 yılında Kaliforniya'da Loma Linda Üniversitesi Tıp Merkezinde bir çocuğa yapılmıştır. Bir Habeş maymununun kalbi 12 günlük kız bebek Fae'ye nakledilmiştir. Bebek Fae, organ reddi ile ilişkili komplikasyonlardan ölmeden önce, maymun kalbi ile 3 hafta yaşadı. Benzer nakiller çok başarılı olmaksızın yapılmaya devam edildi. Habeş maymunları ve diğer primatlar hala organ sağlayan adaylar olmakla birlikte, birçok araştırma grubu organ kaynağı olarak domuzlar üzerinde çalışmaktadır. Domuzlar iyi bir seçenek olabilirler, çünkü boldurlar, üremeleri kolaydır ve nispeten ucuzdurlar. Domuzların birçok organı fonksiyon ve ölçü bakımından da insan organlarına benzemektedir. Domuz organlarının insana nakli ile ilgili uygulamalar virüslerin domuzlardan insana geçerek transplante organın reddine ve diğer sağlık sorunlarına neden olabileceği düşüncesiyle yavaşlamıştır.

Transplantasyonla ilgilenen bilim insanları, organ reddi ve viral hastalıkların bulaşması ile ilgili güncel korkuların üstesinden gelmeye yardımcı olabilecek klonlanmış domuzlar üretmek için moleküler teknikleri ve transplantasyon teknolojilerini birleştirmişlerdir. Missouri Üniversitesi'ndeki bilim insanları, *GGTA1* (ß-1, 3-galaktosil- transferaz) denen kilit bir geni eksik olan, klonlanmış domuz ürettiler. *GGTA1* domuz dokularının yüzeyinde şeker üretir, insana organ nakledildiğinde yabancı antijen olarak algılanıp antikor üretimi ve organ reddine yol açar. *GGTA1* nakavt domuzlar Bölüm 7'de anlatılmış olan nüklear transfer klonlama teknikleri kullanılarak klonlanmışlardır. *GGTA1* nakavt domuzların oluşturulması belki de insan immün sisteminin yabancı olarak tanımadığı ve transplantasyon için kullanılabilecek organları üretebilen domuzların oluşturulmasında iyi bir yol olabilir (**Şekil 11.18**).

Ksenotransplantasyon, bir sonraki alt bölümde öğreneceğiniz gibi, her zaman bütün bir organın naklini kapsamaz. Bilim insanları hücre ve doku transplantasyonunda teknik olarak küçük hücre kümelerinin uygulanmasını sağlayan yeni yöntemler üzerinde oldukça sıkı çalışmaktadırlar.

Hücresel terapötikler

Hücresel terapötikler, hasarlı dokuyu değiştirmek veya önemli biyolojik molekülleri yerine ulaştırmak için tüm doku ve organların kullanılması yerine hücrelerin kullanımını kapsar. Organ nakli reddinden kaçınmada bir alternatif yöntem, **biyokapsül** veya mikrokapsül denilen küçük plastik boncuk ya da tüplerin içine yerleştirilmiş canlı hücreleri kullanmaktır. Biyokapsüller, rekombinant proteinler gibi terapötik molekülleri üretmek üzere tasarlanmış olan genetiği değiştirilmiş hücreler de içerebilirler.

Biyokapsüllerin duvarlarında besin alışverişi için geçirgen olmalarını sağlayan, kapsüllü hücreler tarafından üretilen moleküllerin kapsülden çıkıp kan dolaşımı veya etraftaki dokulara geçişini sağlayan küçük delikleri vardır (**Şekil 11.19**). Örneğin, pankreastaki insülin üreten hücreleri (beta hücreleri) içeren kapsüller tip 1 diyabetli hastalara implante edilir, hücreler tarafından üretilen insülin kapsülden çıkarak kan dolaşımına oradan insülin ihtiyacı olan tüm organlara ulaşır. Biyokapsüllerin bir diğer önemli özelliği, içerdeki molekülü alıcının immün sisteminden koruyarak antikor ve immün hücreler tarafından tahribini engellemesidir. Kalıcı bir iyileştirme olmamakla beraber, biyokapsüller moleküllerin vücuda sürekli salımını sağlayabilir. Böyle bir yaklaşım birkaç ayda bir biyokapsüllerin değiştirilmesini gerektirir; yine de, diyabet vakaları için bu yöntem günlük insülin enjeksiyonuna daha iyi bir alternatif olabilir.



ŞEKİL 11.18 Domuzlar Transplantasyon için Bekleyen Hastaların Potansiyel Kurtarıcıları Olabilirler Potansiyel olarak red edilmeyen domuz organları sağlamak için, domuz organlarının insanda reddine yol açan şeker-üreten genden yoksun domuz yavruları tasarlanmıştır.



ŞEKİL 11.19 Biyokapsüller Kapsüllenmiş hücreler terapötik moleküllerin taşınmasında değerli yollar sağlayabilirler. Biyokapsüldeki hücreler konağın antikorları ve immün hücrelerinin saldırısından korunmaktadırlar. Aynı zamanda, biyokapsüller hücrelerin ürettiği moleküllerin kapsülden salınımıyla konağa terapötik yarar da sunmaktalar. Bu şekil, insülin üreten hücrelerin şeker hastalarına insülin kaynağı sağlamak için nasıl kullanıldığını göstermektedir.

Doku Mühendisliği

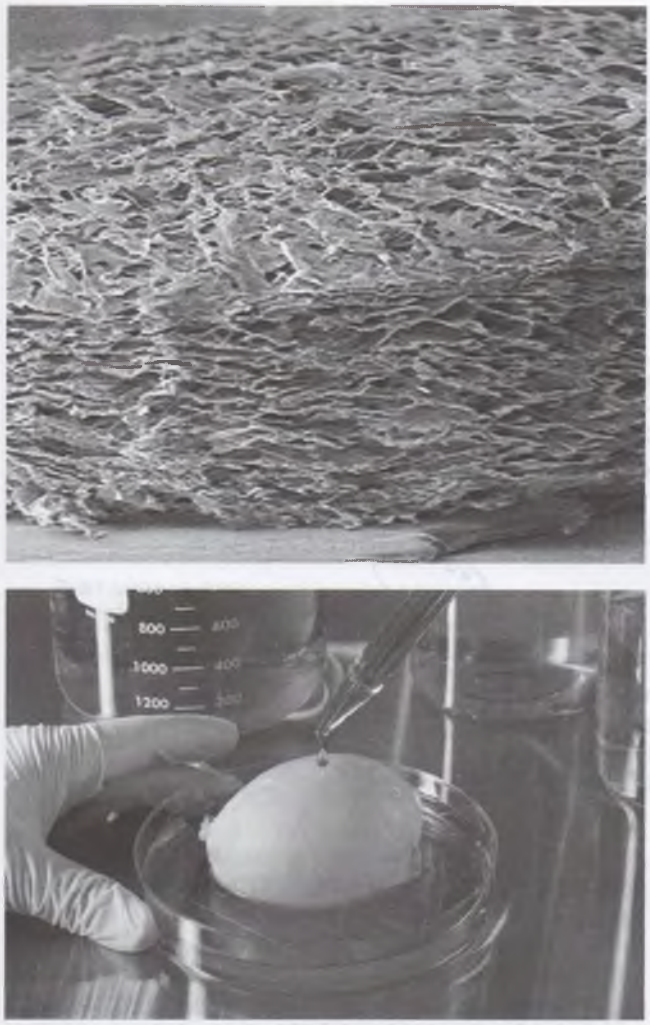
İlk arabanıza, 300 veya 30 000 dolar, ne öderseniz ödeyin kesin bir şey var ki, zamanla parçaları yıpranacak ve bozulacaktır. Tamirciye kısa bir yolculuk arabanın bazı parçalarının yenilenmesini ve onarılmasını sağlayabilir, ancak eninde sonunda araba geriye dönüşümsüz olarak bozulur ve başka bir araba satın alma zamanı gelir. Vücut parçalarının zamanla yıpranması da performansı olumsuz etkiler. Organlar zamanla olması gerektiği gibi çalışamazlar, bazı olgularda organ fonksiyonları tamamen durur. Hatta bir kişi göreceli sağlıklı olarak yaşamış olsa bile, yaşlanmaya bağlı yıpranma veya kalp krizi ve felç gibi ani olaylar organ fonksiyonlarında azalma ve organ yetmezliğine sebep olabilir. Ancak, vücudumuz arabalar gibi değildir; vücudumuzun eskiyen parçalarını yenilemek için tamirciye gidemeyiz.

Bununla beraber, gelecekte **doku mühendisliği** bilimi hasarlı veya hastalıklı dokuların yenilenmesinde kullanılabilecek olan doku ve organların üretimini sağlayabilir. Bu küçük fakat büyüyen endüstri – sadece ABD'de doku mühendisliği ile ilgili 60'dan fazla biyoteknoloji şirketi vardır ve uzmanlara göre gelecek on yılda bu alanın % 50 büyüyeceği tahmin edilmektedir – aktif olarak yıpranmış ve eskimiş dokuların yenilenmesi gibi doku ve organ mühendisliği araştırmalarına katılmaktadır. Organlarımızın fonksiyonel becerilerinin sona erdiği zamandan daha uzun yaşayabiliriz. Gelişmiş ülkelerde 65 yaş üstünde insanların kabaca % 20'sinin hayatları boyunca doku mühendisliği uygulamalarından faydalandığı tahmin edilmektedir. Doku mühendisliği ve rejeneratif tıp uygulamalarının, konjestif kalp yetmezliği ve diyabet gibi kronik hastalıkların bakımı için gerekli harcamaların bir hayli azalmasını sağlayacağı da tahmin edilmektedir. Konjestif kalp yetmezliği olgusunda, eğer rejenere kalp dokusu bireylerin küçük bir yüzdesinin bile kardiak fonksiyonlarını eski haline getirebilse, tüm dünyada yıllık birkaç milyar dolarlık maliyet tasarrufu sağlayacaktır.

Doku mühendisliği bilim insanları çoğunlukla kalsiyum, kollajen, alginat denen polisakkaritler gibi biyolojik maddeler veya biyolojik olarak paraçalanabilen materyallerden biyomateryal çerçeve veya iskelet tasarlar veya yaparlar (**Şekil 11.20a**). İskelet, yapılacak olan organ veya dokunun kalıbı gibi şekillendirilir ve buradaki amaç, hücrelerin üzerine yerleştirileceği 3 boyutlu bir çerçeve yaratmaktır. İskelet üzerinde hücrelerin büyümesi tohumlama olarak adlandırılır, çünkü hücreler iskelet üzerinde daha fazla hücre oluşması için tam anlamıyla tohum gibi hareket ederler. Hücrelerle dolu olan iskelet besinden zengin ortama konur ve zamanla iskeletin şeklini andıran hücre tabakaları oluşur. Mühendislik ürünü insan derisi tabakalarının, derisinin oldukça fazla bir kısmını kaybetmiş olan şiddetli yanık olgularının tedavisinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Doku mühendisliğinin geliştirdiği deri greft tabakalarının da başarılı organlar olduğu kanıtlanmıştır. Ayrıca, kemik yapıların mühendisliği kemik kırık tedavisinde oldukça faydalı olmuştur. Diş ve kan damarları için iskelet yapımı da umut vericidir. Doku mühendisliği ürünlerinin çoğu FDA tarafından onaylanmış olup, hasta tedavisinde veya klinik çalışmalarda kullanılmaktadır.

1990'lı yıllarda, doku mühendisliğinin öncüleri Charles Vacanti ve arkadaşları, sırtında mühendislik ürünü kulak olan bir fare ile tüm dünyada manşetlerde yer almışlardı. Bu örnekte, dış kulak şeklinde biyolojik olarak parçalanabilir bir iskeleti fareye tutturmuşlar ve ardından inekten elde edilen kıkırdak hücreleri ekmişlerdi. İskelete yapışan kıkırdak hücreleri çoğalarak kıkırdak üretmişler ve iskelet parçalandıktan sonra da kendilerini destekler duruma gelmişlerdi. İnsan kulağı görünümlü bu doku insanlara asla nakledilmemiştir. Çünkü, bu kulak inek hücrelerinden yapıldığından, insan immün sistemi tarafından reddedilebilirdi. Ayrıca bu kulak sadece dış kulaktan oluşmaktaydı, sesleri algılayan kısmı yani iç kulak yoktu, fakat doku mühendisliğinin işe yarayabileceği konusunda güçlü bir kanıt sağlamıştı.

Karaciğer, kalp ve böbrek gibi büyük ve kompleks organların yapılmasının çok daha zor olduğu kanıtlansa da, fetal doku kullanılarak sıçanlarda idrar benzeri sıvı üretebilen rudimenter böbrek oluşturulmuştur. İnsan idrar kesesi oluşturmak için en az iki adet Faz II çalışma sürmekte olup, hastanın idrar kesesinden biyopsiyle alı-



ŞEKİL 11.20 Doku Mühendisliği (a) Doku mühendisliğinde kullanılan kollajen iskeleye bir örnek. (b) Kök hücrelerden oluşturulan idrar kesesi.

nan doku iskelete ekilerek yeni idrar keseleri oluşturulmaya çalışılmaktadır (Şekil 11.20b). Doku mühendisliği emekleme aşamasındadır. Fakat, bir sonraki alt bölümde tartışılacağı gibi, inanılmaz hızda ilerlemeler göstermekte; kök hücre uygulamaları bu ilerlemeye katkı sağlamakta ve mühendislik organları üretmenin gerçekleşeceğini ummak için her türlü neden bulunmaktadır.

Telomer hikâyesi

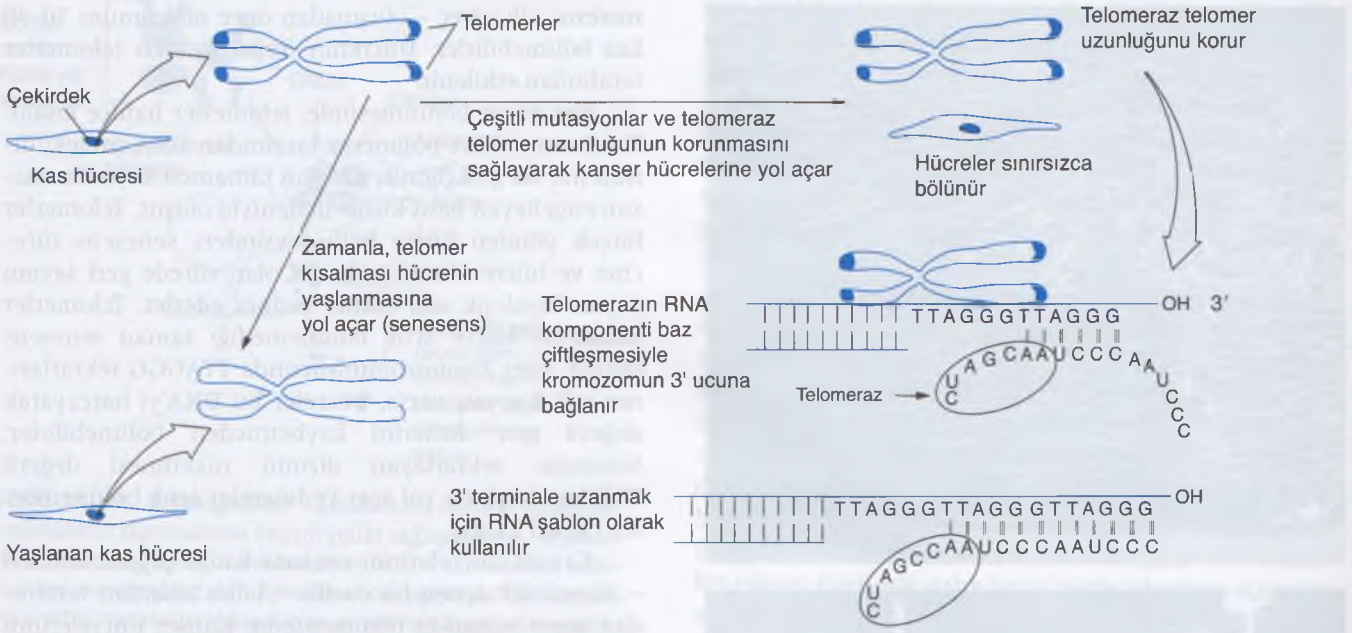
Normal insan hücresindeki kromozomların ucunda **telomer** adı verilen DNA nükleotid dizileri vardır. Telomerler tekrarlayan 5'-TTAGGG-3' dizilerinden oluşan, genellikle 8 000- 12 000 bp ünitelik yapılardır. Bunları ayakkabı bağlarının ucunda bağcıkların çözülmesini engelleyen plastik başlıklar, yani bir çeşit kromozom şapkası, gibi düşününüz. Normal hücrelerin çoğalmak için kısıtlı yetenekleri vardır. İnsan vücudundaki hücrelerin çoğu yaşlanma bulguları – sonunda ölüme yol açan **senesens** adlı süreç – oluşmadan önce maksimum 50-90 kez bölünebilirler. Hücrenin ömrü kısmen telomerler tarafından etkilenir.

Her hücre bölünmesinde, telomerler hafifçe kısalır. Bu durum, DNA polimeraz tarafından DNA molekülünün her iki iplikçiğinin ucunun tamamen kopyalanmasını engelleyen basit kusur nedeniyle oluşur. Telomerler birçok yönden hücre bölünmesinden, senesens sürecine ve hücre ölümüne kadar olan sürede geri sayımı yapan biyolojik saat olarak hizmet ederler. Telomerler kısalır ve hücre artık bölünemediği zaman senesens oluşur. Eğer kromozomun ucunda TTAGGG tekrarlarının çok kopyası varsa, hücreler bu DNA'yı harcayarak değerli gen dizilerini kaybetmeden bölünebilirler. Sonunda, tekrarlayan dizinin tükenmesi değerli DNA'nın kaybına yol açar ve hücreler artık bölünemezler (**Şekil 11.21**).

Kanser hücrelerinin sonsuza kadar çoğalabilmeleri – *ölümsüzlük* denen bir özellik – bilim insanları tarafından uzun zamandır bilinmektedir. Kanser hücrelerinin ölümsüzlüğü başarmalarının bir yolu da, **telomeraz** denen enzimin etkisiyle olur. Telomeraz, her hücre bölünmesi sonrasında telomer uzunluğundaki bir DNA parçasını kromozomun ucuna yeni telomer başlığı oluşturmak için ekleyerek telomer uzunluğunu onarır. Telomeraz normal hücrelerde aktif değildir, fakat kanserlerin % 90'nında aktiftir. Telomeraz aktivitesi, telomer kısalmasını önleyerek, kanser hücrelerinin sınırsız çoğalmalarının başlıca nedenidir. Gerçekten biyologlar kanser hücrelerini, sonsuza kadar yaşlanmaktan kaçınabildikleri için, ölümsüz kabul etmektedirler.

Telomer kısalması yaşlanma süreciyle ilişkilidir – ağrı, sızı, kırışıklık, saç beyazlığı ve diğer birçok belirti insanlarda yaşlandıkça oluşur. Telomeraz yaşlılığın belirtilerini iyileştiren bir "gençlik çeşmesi" değildir. Yaşlanma ve kanser, yalnızca telomerazların değil, diğer birçok proteinin de katıldığı çok daha karmaşık süreçlerdir. Hemen hemen her insan kanser hücresinde yüksek oranda bulunmasına rağmen, telomerazın kendisi kansere *neden* olmaz. Telomeraz, hücre bölünmesini kontrol eden genlerdeki mutasyonlarla birlikte, senesensi önleyen ölümsüz hücreler yaratabilir. Telomerazın aşırı üretimi çoğunlukla tümörlerin agresif büyümeleri ile ilişkilidir. Bilim insanları telomerazı inhibe eden ve bölünen kanser hücrelerini durduran telomeraz peptit aşıları gibi kanser tedavi stratejileri üzerinde çalışmaktadırlar. Ayrıca, son zamanlarda iki şirket tarafından sağlık durumunun göstergesi olarak kişinin telomer uzunluğunu ölçen testler geliştirilmiştir. Ancak, bu testlerin tanısal ve tahmin değerleri tartışılmaktadır.

Bilim insanları, doku mühendisliği yaklaşımıyla, telomeraz genlerinin kültüre alınmış insan hücrelerine aktarılmasıyla, onların ölümsüzlük özelliği taşıyan normal insan hücrelerine döndürülmesi üzerinde çalışmaktadırlar. Eğer bu çaba başarılı olursa, ölümsüz insan



ŞEKİL 11.21 Telomer Kısalması Hücre Yaşlanmasına Yol Açar Her DNA replikasyon turunda telomerler kısalır. Sonunda telomer kısalması hücre senesensi ve ölümüne yol açar. Farklı genlerin fonksiyonunu ve telomeraz enziminin ekspresyonunu etkileyen mutasyonlar nedeniyle, kanser hücreleri süresiz bölünebilir ve yaşlanmaktan kaçınabilirler. Telomeraz, hücre bölünmesi sırasında kısalmayı önlemek için telomer dizilerini sürekli doldurarak bu süreçte önemli bir rol oynar.

hücreleri artrit ve nörodejeneratif hastalıklar gibi yaşlanmaya bağlı hastalıkları olan bireylerin tedavisinde değerli olabilirler. Böyle hücreler, ülser ve yatak yaralarının iyileşmesinde deri hücreleri sağlayarak, geç başlangıçlı körlük ve müsküler distrofi gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılabilirler. Gelecekte, teknolojik olarak belki kişinin yaşlı hücrelerinin çıkarılıp telomeraz genlerinin bu hücrelere tanıtılıp ve tekrar hastaya geri verilmesi ile hastanın ömrünün uzatılabilmesi mümkün olacaktır. Bu işlerden bazıları kök hücre ile kombine edilerek yapılabilmiştir; bu araştırmalar, belki bugün tıbbi biyoteknolojinin en sıcak, en tartışmalı konularıdır.

Kök Hücreler

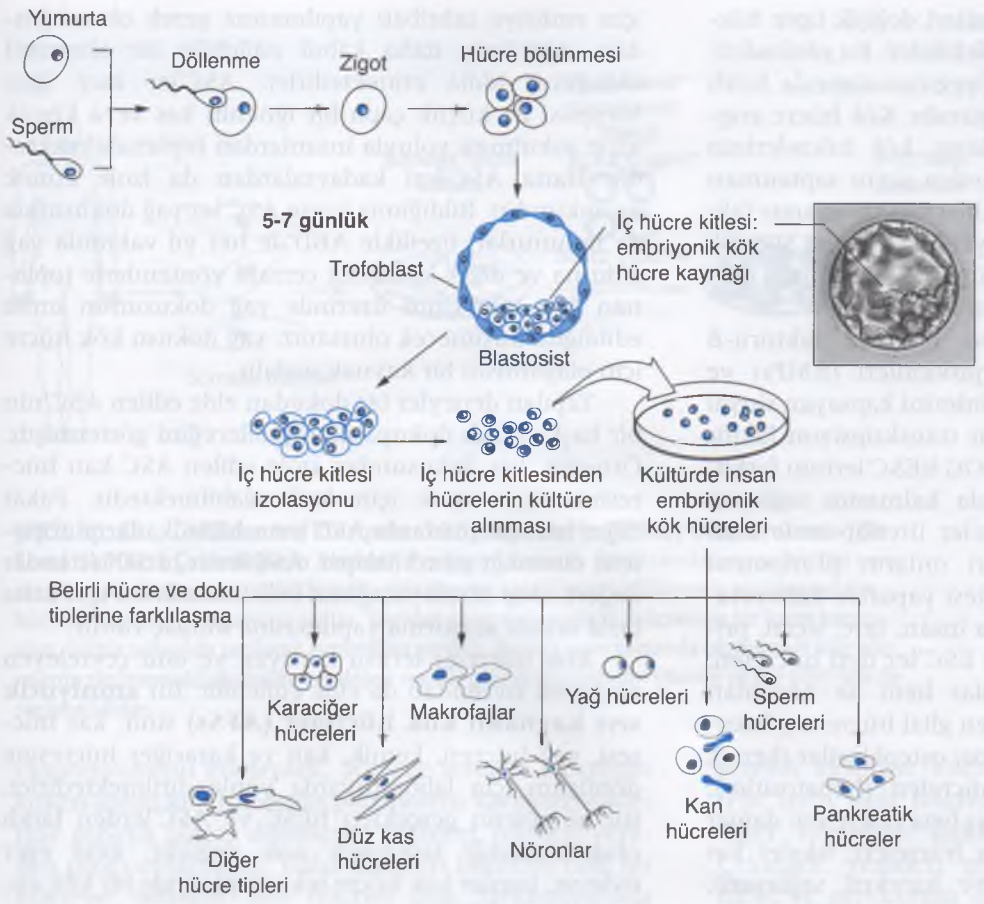
Kök hücreyle ilgili muazzam umut ve tartışmalar, kök hücre araştırmaları ve ilgili konuların gazetelerin ön sayfa ve televizyonun ana haberleri olmalarına yol açmıştır. Kök hücreler bilim insanları, din adamları, politikacılar ve kamuoyunda duygusal ve tartışmalı tepkiler oluşturmaktadır. Bazı insanlar arasında, bu hücrelerin izolasyonu ve kullanımı heyecan, korku, öfke gibi bir dizi duyguya neden olmaktadır.

Kök hücre nedir?

Yakında öğreneceğiniz gibi, **kök hücrelerin** çok farklı türleri vardır; ama genel olarak tüm kök hücreleri diğer hücre türlerinden ayıran iki temel özellik vardır; **kendini yenileme** ve belirli bir hücre tipine **farklılaşma:**

- Kendini yenileme: Kök hücreler özdeş kök hücre popülasyonları oluşturmak için büyür ve mitoz yoluyla süresiz olarak bölünür (çoğalır).
- Farklılaşma: Bu, aktif ve sessiz birçok genin katıldığı karmaşık bir süreçtir ve onları değiştirmeye yardımcı olan diğer hücrelerden salınan büyüme faktörleri ve hormonlar gibi kimyasal sinyallerle farklılaşma sağlanır. Kök hücreler özeldir, çünkü insan vücudunu oluşturmak için 200'den fazla tipte hücreye farklılaşabilirler. Kök hücreler **pluripotent** olarak adlandırılırlar, çünkü birçok farklı tip geliştirebilecek potansiyelleri vardır.

Kök hücrenin ne olduğunu anlamak için, kısaca insan embriyosunun gelişimine bakmalıyız. Bunu **in vitro fertilizasyonun (IVF)** nasıl gerçekleştiğini düşünerek yapabiliriz. IVF ilk olarak 1978 yılında Louise Brown adındaki ilk test tüp bebeği doğduğunda kamuoyunun dikkatini çekmişti. IVF ile çocuk yapmak için, donör ana babanın sperm ve yumurtaları kültür kabında embriyo oluşturmak için karıştırılır. Birkaç günlük bölünmeden sonra embriyo genellikle yumurta donörü olan ve implantasyona rahmi hazırlamak için hormon tedavisi verilen kadının rahmine cerrahi olarak implante edilir. Çift IVF sürecini



ŞEKİL 11.22 İnsan Embriyonik Kök Hücreleri (hESC)) İnsan embriyosunun iç hücre kitlesinden elde edilen hücreler hESC kaynağı olarak kültür ortamında yetiştirilebilir. Uygun büyüme koşulları altında, hESC'ler vücutta hemen her hücre tipine farklılaşmaları için uyarılabilir.

kabul ettiğinde, genellikle birkaç embriyo oluşturulur, fakat sadece biri her bir işlem sırasında implante edilir. Geriye kalan embriyolar gelecekte kullanılmak üzere dondurulur. Potansiyel olarak, geride kalan embriyolar **insan embriyonik kök hücreleri (hESC)** için iyi bir kaynak olmakla beraber, büyük bir tartışmanın da kaynağıdırlar.

Embriyo öngörülebilir bir seri gelişim evresinden geçer (**Şekil 11.22**). Bir yumurta hücresi döllendikten sonra **zigot** adını alır. Zigot hızla bölünür ve 3-5 gün sonra, önce "küçük dut" anlamına gelen ve **morula** adı verilen kompakt top oluşur. Döllenmeden 5-7 gün sonra embriyo; **blastosist** adı verilen, yaklaşık 100 hücreden oluşan, küçük, ortası boş bir hücre kümesidir. Blastosistlerin çapı milimetrenin yaklaşık 7'de biri kadardır. Dış tabakayı oluşturan tek hücre dizisine trofoblast denir, bu tabaka embriyoyu besleyen plasentayı oluşturur. Kök hücre biyologlarının ilgilendiği başlıca hücre grubu blastosistin içinde yer alan 30 hücreden oluşan hücre kümesidir. **İç hücre kitlesi** olarak bilinen bu yapı hESC'lerin kaynağıdır (Şekil 11.22).

İç hücre kitlesinin hücreleri embriyonun kendisini oluştururlar. İç hücre kitlesindeki kök hücrelerin farklılaşma yeteneği vardır. İnsan blastosistlerinden ilk hESC kültürü ve başarılı izolasyonu 1998'de, bu tarihten 2 yıl önce de rhesus maymunlarından hESC kültürü yapan, Madison, Wisconsin Üniversitesinden James Thomson tarafından bildirilmiştir. Aynı zamanda 1998'de John Hopkins Üniversitesinde John Gearhart ve arkadaşları insan fetal dokusundan embriyonik germ hücreleri ve gamet hücrelerine – sperm ve yumurta hücreleri – farklılaşan primitif hücreler izole etmişler; bu hücrelerin farklı hücre tiplerine dönüşebildiklerini de göstermişlerdir. Bu buluşları fare, domuz, tavşan ve koyunlardan kök hücre izole eden diğer bilim insanlarının çalışmaları izlemiştir. Aslında, kök hücre araştırıcılarının hESC hakkında bu gün bildikleri pek çok şey, 1980'li yıllarda farelerde yapılan çalışmaların öncülüğü ile gerçekleşmiş olup, bütün bunlar bilimin ilerlemesine model organizmaların nasıl büyük oranda katkı sağladıklarının diğer örnekleridir.

İnsan ESC'leri çok yüksek oranda telomeraz eksprese ettikleri için yaşlılık belirtisi göstermezler ve senesensten uzaktırlar. Çeşitli gruplar kök hücreleri belirgin bir sorun olmadan 600'den fazla bölünme turu ve 3 yıldan uzun süre muhafaza etmişlerdir. Bunun gibi başarılı şekilde çoğaltılan ve korunabilen kültür hücreleri **hücre serileri** olarak adlandırılırlar. Kök hücreler aynı zamanda çok hızlı büyürler ve özellikleri değişmeden uzun yıllar dondurularak saklanabilirler. Uygun koşullarda, **büyüme faktörleri** denen madde ve hormanları kapsayan farklı moleküllerle

uyarıldıklarında, kök hücre serileri değişik tipte hücrelere farklılaşmaya yönlendirilebilirler. Bu *yönlendirilmiş farklılaşma* rejeneratif tıp uygulamalarında farklı tipte doku oluşumlarının anahtarıdır. Kök hücre araştırmalarının başlıca odak noktası, kök hücrelerinin pluripotent özelliğini kontrol eden şeyin saptanması ve değişik hücre tiplerine farklılaşmasını uyaran faktörlerin belirlenmesidir. Bu uyarılar, dokuya spesifik olarak farklılaşma sağlayan büyüme hormonu, hormonlar, peptidler gibi maddeleri kapsar.

Örneğin, transforme edici büyüme faktörü-ß (TGF-ß), kemik morfojenik proteinleri (BMPs) ve diğer büyüme farklılaşma faktörlerini kapsayan sinyal sistemleri *Nanog* adı verilen bir transkripsiyon faktör geni üzerine etki ederler. NANOG hESC'lerinin farklılaşmamış pluripotent durumda kalmasını sağlayan anahtar proteindir. Kök hücreler üretilip izole edildikten sonra, bilim insanları onların pluripotent durumunu belirleyen bir dizi test yaparlar. Laboratuvarda uygun kültür ortamında insan, fare, sıçan, primat ve diğer türlerden alınan ESC'ler deri hücreleri; beyin hücreleri (hem nöronlar hem de nöronları koruyup destekleyerek besleyen glial hücreler); kıkırdak (kondrositler); spermatozoa; osteoblastlar (kemik yapan hücreler); karaciğer hücreleri (hepatositler); insülin salınımı yapan pankreas beta hücreleri; damar çeperlerini oluşturan düz kas hücreleri; iskelet kas hücreleri (iskelete tutunan ve hareketi sağlayan); kalp duvarını oluşturan kalp kası hücreleri (miyozitler) gibi çok sayıdaki hücre tiplerine farklılaşabilirler. Bilim insanları hESC'yi nasıl elde ederler? Araştırma amaçlı hESC'ler, IVF için artık kullanılmayacak olan embriyo blastosistlerinden veya araştırma amacıyla embriyo elde etmek için bağışlanan sperm ve yumurta hücrelerinden IVF yoluyla oluşturulan insan embriyolarından sağlanırlar. Tipik olarak IVF'da artan blastosistler tahrip edilir ya da süresiz olarak dondurulur; ancak yumurta ve sperm sağlayan çiftin rızasıyla, Şekil 11.22 de gösterildiği gibi hESC elde etmek için de kullanılabilirler. ABD'de yalnızca kısırlık kliniklerinde, yıllık olarak yaklaşık 400 000 dondurulmuş kullanılmayan embriyo ve binlerce yumurta imha edilmektedir.

Diğer Kök Hücre Kaynakları

hESC'lerle yapılan araştırmalar kaynakları – erken embriyo – nedeniyle çok tartışmalıdır. Bilim insanları olgun yetişkin dokularında bulunan ve kültüre alınıp diğer hücre tiplerinin üretimi için farklılaştırılabilen **yetişkin kaynaklı kök hücreler (ASCs)** keşfetmişlerdir. ASC'ler çok az sayıda olup kalp, beyin, ince bağırsak, yağ, meme dokusu, diş, kas ve kandan izole edilmekle birlikte, henüz vücut hücrelerinin tümünde keşfedilmemiştir.

hESC araştırmaları karşıtları, izole edilebilmeleri için embriyo tahribatı yapılmasına gerek olmadığından, ASC'lerin daha kabul edilebilir bir alternatif olduğunu iddia etmektedirler. ASC'ler ince iğne biyopsisi ile küçük çaplı bir iğnenin kas veya kemik içine sokulması yoluyla insanlardan toplanabilmektedir. Hatta ASC'leri kadavralardan da izole etmek mümkündür. Bildiğimiz üzere ASC'ler yağ dokusunda da bulunurlar; özellikle ABD'de her yıl vakumla yağ aldırma ve diğer kozmetik cerrahi yöntemlerle toplanan 500 000 L'nin üzerinde yağ dokusunun imha edildiğini düşünecek olursanız, yağ dokusu kök hücre için olağanüstü bir kaynak olabilir.

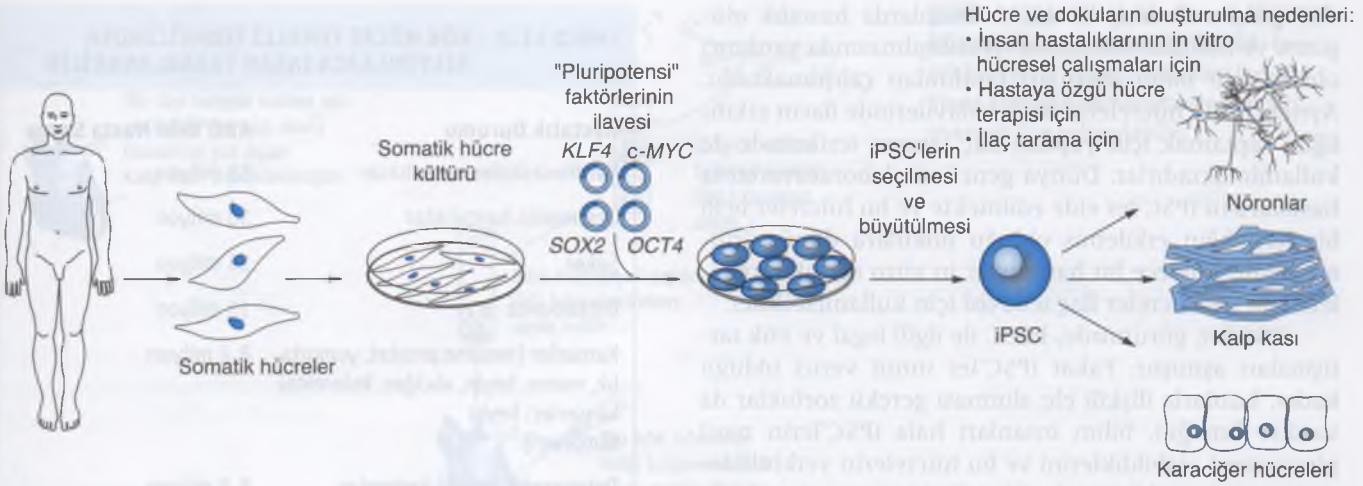
Yapılan deneyler bir dokudan elde edilen ASC'nin bir başka farklı dokuya dönüşebileceğini göstermiştir. Örneğin, kas dokusundan izole edilen ASC kan hücresini oluşturmak için kullanılabilmektedir. Fakat diğer bazı çalışmalarda ASC'lerin hESC kadar pluripotent olmadığı gösterilmiştir. ASC'lerin hESC'ler kadar değerli olup olamayacağının belirlenebilmesi için daha fazla sayıda araştırma yapılmasına ihtiyaç vardır.

Kök hücreler fetusu koruyan ve onu çevreleyen amniyon sıvısından da elde edilebilir. Bu **amniyotik sıvı kaynaklı kök hücreler (AFSs)** sinir, kas hücresi, yağ hücresi, kemik, kan ve karaciğer hücresine dönüşüm için laboratuvarda yönlendirilmektedirler. Bu hücrelerin gerçekten hESC ve ASC'lerden farklı olup olmadığı tamamen açık değildir; ama eğer öyleyse, bunlar kök hücre teknolojilerinde bir kilit atılım oluşturabilirler.

Kanser kök hücrelerinin **(CSCs)** (tümör başlatıcı hücreler de denir) kanserin gelişimi, tümörün ilerlemesi, tümör metastazı ve nüks durumlarıyla ilişkili oldukları belirlenmiştir. Normal kök hücreler gibi, köken aldıkları dokuyu oluşturmak için CSC'ler kendini yenileyebilir ve farklılaşabilirler. Bazı CSC'ler doku içinde niş veya kümeler halinde yavaş büyürler. CSC'lerin tümör oluşturma kabiliyetlerinin dışında ne özellikleri olduğu tam olarak açık değildir. Araştırıcılar aynı zamanda CSC'lerin normal hücrelerden köken alıp almadığından veya tümörün kemoterapiye direnç geliştirmesini sağlayıp sağlamadıklarından emin değillerdir, fakat bu hücreler kanser tedavilerinde potansiyel terapötik tedavi ve yoğun araştırmalar için bir odaktırlar.

Somatik hücre çekirdeklerinin yeniden programlanmasıyla kök hücre oluşturulması

Kök hücre biyolojisi araştırmaları son derece aktif bir alandır. Embriyoyu tahrip etmeden pluripotent kök hücrelerin üretimi için alternatif yaklaşımlar oluşturmak, devam eden çalışmaların başlıca odak noktasıdır. Bununla ilgili en umut verici yeni yaklaşımlardan biri **somatik hücre çekirdeğinin yeniden programlanması** tekniğidir. Bu yaklaşımda temel amaç; hücre gelişimine katılan genleri kullanarak somatik hücreyi gelişiminin erken dönemlerine döndürmek ve gen



ŞEKİL 11.23 İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücrelerin (iPSCs) Oluşturulması için Somatik Hücre Çekirdeğinin Yeniden Programlanması Dört transkripsiyon faktörü geninin (*Oct3/4, Sox2, c-myc, Klf4*) fare fibroblastlarına aktarılması indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSCs) oluşumunu sağlar. Yeniden programlamada bu hücrelerin bir kısmı hatalı olup, kültür sırasında seçilerek ayrılmaları gerekir. Bunlar, aynı zamanda pluripotent kök hücrelerde eksprese olduğu bilinen endojen markör gen ekspresyonları (*Nanog* ve *Oct* gibi) için de seçilmelidirler.

ekspresyonunu etkilemek, böylece somatik hücrenin köken aldığı kök hücrenin pluripotent karakteristiklerine genetik olarak dönmesini sağlayıp, hücreyi yeniden programlamaktır. Daha önceleri hücreler belli bir hücreye, örneğin deri hücresi gibi, farklılaştığında bunun geri dönüşümsüz olduğu düşünülmekteydi. Fakat bugün durumun böyle olmadığını biliyoruz. İlk başarılı yeniden programlama tekniklerinden biri *fibroblast* denilen deri hücrelerinin hESC'lerle birleştirilme işlemidir. Bu hibrid hücreler in vitro ve in vivo olarak hESC'lerin çeşitli özelliklerini göstermektedirler.

Kök hücre araştırmalarında bir devrim olarak lanse edilen çekirdek yeniden programlama konusunda farklı yaklaşımlar vardır. Bunlardan biri 4 transgenin – *OCT3/4, SOX2, c-MYC* ve *KLF4* – retrovirüsler kullanılarak fibroblastlara taşınmasıdır (**Şekil 11.23**). Hücre gelişimine katılan transkripsiyon faktörlerini kodlayan bu 4 genin ekspresyonu fibroblastı farklılaşmanın erken evrelerine geri götürür, yani "yeniden programlar". Bu yeniden programlanan hücrelere **indüklenmiş pluripotent kök hücreler (iPSCs)** denir. iPSC'ler kendi kendini yenileyebilme ve pluripotensi gibi hESC'lerin birçok özelliğini taşırlar ve hESC'lerden ayırt edilemezler. iPSC'ler insan, fare, sıçan, domuz ve maymun hücrelerinden elde edilmişlerdir. Daha sonra bu 4 genin RNA moleküllerinden oluşturulan karışım, somatik hücrelerden iPSC elde etmek için kullanılmıştır. Ayrıca, insan sinir hücreleri yalnızca *OCT4* aktarılarak iPSC'ye yeniden programlanmıştır.

Bu iPSC'ler, farklılaşmamış hESC'lerde eksprese olduğu bilinen *Nanog* ve *Oct* gibi karakteristik markör genleri eksprese ederler. Ayrıca, bazı denemelerde iPSC'lerin sinir hücreleri ve kalp kası hücreleri gibi diğer hücrelere farklılaşabileceği de gösterilmiştir. Çekirdek yeniden programlama, bir embriyo ve hESC'ye gereksinim olmadan, hastaya özgü iPSC'ler oluşturmak için bir yöntem olabilir. İnsan deri hücrelerinden köken alan iPSC'ler yeniden programlama ile başarılı bir şekilde elde edilmişlerdir. Otuz altı yaşındaki bir kadının yüzünden alınan deri hücreleri, 69 yaşındaki yaşlı bir erkeğin ekleminden alınan bağ doku hücreleri ve yenidoğan bebeğin alnından alınan deri hücreleri yeniden programlanan hücrelere örnektirler. Ayrıca, iPSC'ler *c-myc* geni kullanılmadan da üretilmiştir. Bu çok önemli bir ilerlemedir, çünkü *c-myc* bir onkogendir.

Bu şekilde üretilen kök hücreler hastaya özel hücre tedavileri için kullanılabilirler. Ayrıca, teorik olarak iPSC teknolojileri ile hasta kişiler için hastalığa-özgü kök hücre oluşturmak mümkündür. Belirli bir hastalığı olan bir kişinin örneğin deri gibi bir dokusundan biyopsiyle hücreler alınıp, daha sonra bu hücreler yeniden kök hücre formuna programlanarak o hastalığa karşı mücadele eden hücrelerin oluşturulmasında kullanılabilir. Hastaya-özgü olan iPSC'ler, immün reddi riski olmaksızın, hücre bazlı tedavilerde kullanılabilir. Fakat en iyimser iPSC araştırıcıları bile hücre tedavilerinin enaz bir on yıl veya daha fazla hazır olmayacağına inanmaktadırlar.

Bilim insanları ayrıca hastadan alınan yeniden programlanmış hücrelerin "petri kabındaki hastalık" çalışmalarında nasıl kullanılacağı konusunda heyecan duymaktadırlar. Hastadan alınıp kültürü yapılan yeni-

den programlanmış hücreler, insanlarda hastalık oluşumu ve ilerlemesinin daha iyi anlaşılmasında yardımcı olması için bilim insanları tarafından çalışılmaktadır. Ayrıca, hasta hücrelerin ilaçlı tedavilerinde ilacın etkinliğini saptamak için yapılan ilaç tarama testlerinde de kullanılmaktadırlar. Dünya genelinde laboratuvarlarda hastalardan iPSC'ler elde edilmekte ve bu hücreler belli bir hastalığın etkilemiş olduğu dokulara dönüştürülmektedir; böylece bu hastalıklar in vitro olarak modellenebilir ve hücreler ilaç tedavisi için kullanılabilirler.

iPSC'ler, görünürde, hESC ile ilgili legal ve etik tartışmaları aşmıştır. Fakat iPSC'ler umut verici olduğu kadar, bunlarla ilişkili ele alınması gerekli zorluklar da vardır. Örneğin, bilim insanları hala iPSC'lerin nasıl pluripotent olabildiklerini ve bu hücrelerin yetkinliklerinin en iyi nasıl kontrol edileceğini tam olarak anlayamamışlardır. Ayıca iPSC'lerin:

- Üretilmeleri nispeten verimsizdir (yeniden programlanmayla 1000 somatik hücreden sadece 1 tanesi iPSC'e dönüşür)
- Canlı hücre serilerinin devamlılığı için sürekli beslenmeleri gerekir
- Donmuş olarak saklandıklarında diğer hücre tiplerine göre canlılıkları oldukça düşüktür
- Tümör oluşturmaya eğilimleri olabilir
- Kültüre alındıklarında zaman zaman olgun hücre tiplerine spontan farklılaşma eğilimi vardır
- Bazen belirli bir hücre tipine farklılaşmasına yönlendirmek için kullanımları zor olabilir

Bilim insanları bu hücrelerin kapasitelerini ve özelliklerini daha iyi anlamak için çalıştıkça iPSC'ler ile ilgili araştırmalar şaşırtıcı ve heyecan verici bir hızda ilerlemektedir. Bu konudaki umut verici sonuçlar çekirdek yeniden programlamanın, embriyoya ihtiyaç olmadan, kişiye-özgü kök hücre oluşturmak için uygun bir yol olduğunu göstermektedir. Önümüzdeki birkaç yıl içinde iPSC ve çekirdek yeniden programlama ile ilgili heyecan verici yeni gelişmeleri bekleyiniz.

Potansiyel kök hücre uygulamaları

CDC İnsan İstatistikleri Ulusal Merkezi her gün yaklaşık 3 000 Amerikalının kök hücre teknolojileri ile tedavi edilebilecek hastalıklar nedeniyle öldüğünü bildirmektedir. Gelecekte, kök hücre araştırmaları tüm dünyadaki milyonlarca insanın yaşamını etkileyebilir.

Kök hücrelerin potansiyel uygulamaları arasında – sağlıklı dokular geliştirmekten, doğum hatalarının anlaşılması ve tedavisine, gen terapisi yaklaşımlarında kullanılan genlerin aktarılması sırasındaki genetik manüplasyonlara, laboratuvarda doku mühendisliği kullanılarak dokunun tümünün oluşturulmasına kadar bir çok örnek sayılabilir. Bilim insanlarının çoğu

TABLO 11.2 KÖK HÜCRE TEMELLİ TEDAVİLERDEN MİLYONLARCA İNSAN YARARLANABİLİR

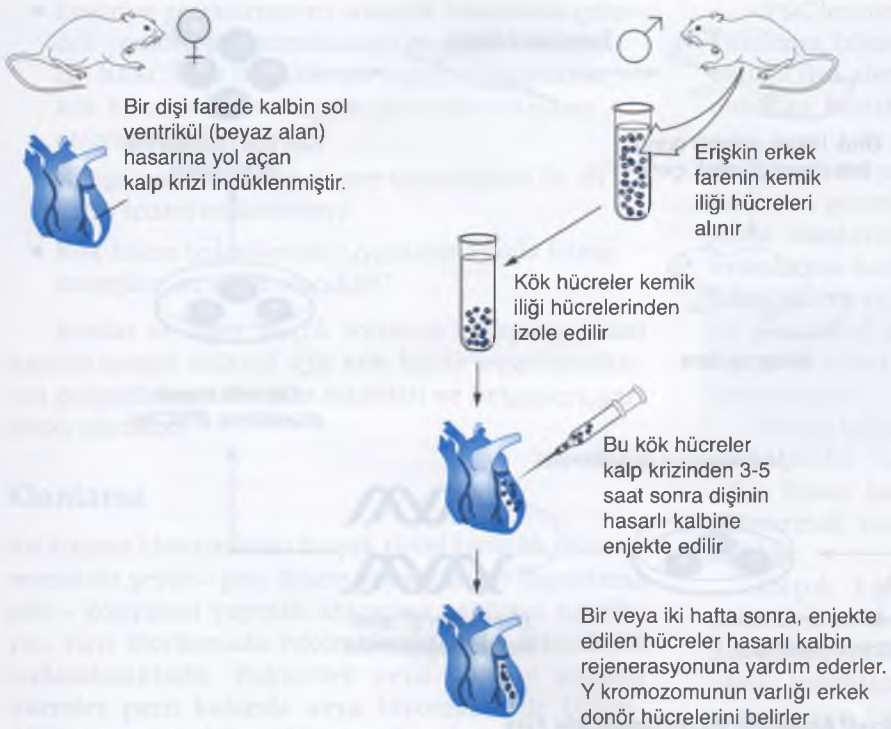
Hastalık Durumu	ABD'deki Hasta Sayısı
Kardiovasküler hastalıklar	58 milyon
Otoimmün hastalıklar	30 milyon
Şeker	16 milyon
Osteoporoz	10 milyon
Kanserler (mesane,prostat, yumurtalık, meme, beyin, akciğer, kolorektal kanserler; beyin tümörleri)	8.2 milyon
Dejeneratif retinal kanserler	5.5 milyon
Fenilketonüri (PKU)	5.5 milyon
Şiddetli kombine immün yetmezlik (SCID)	0.3 milyon
Orak hücre hastalığı	0.25 milyon
Nörodejeneratif hastalıklar (Alzheimer ve Parkinson hastalıkları)	0.15 milyon

Kaynak: Stem Cells and the Future of Regenerative Medicine'den uyarlanmıştır. www.nap.edu/catalog/10195.html.

inme, kalp hastalıkları, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı, Lou Gehrig hastalığı, diyabet ve diğer hastalıkların tedavisinde kök hücre teknolojilerinin anahtar rol oynayacağını düşünmektedir (bakınız Tablo 11.2).

Potansiyel ve *umut* sözcükleri kök hücre uygulamaları tartışıldığında sıklıkla kullanılırlar, fakat hastalıkların tedavisinde bu hücrelerin kullanılması çoğunlukla hala kanıtlanmamıştır. Şimdi, günümüze kadar en umut verici olan bazı kök hücre uygulamalarını gözden geçirelim. Lösemi hastalarında hatalı akyuvarların (lökositler) yok edilmesi için kemoterapi veya radyasyon tedavisine sıklıkla ihtiyaç duyulur. Sonunda hastanın bağışıklık sistemi çok zayıflar. Lösemi tedavisinde, kemoterapinin harap ettiği alyuvarların (eritrositler) ve akyuvarların yenilenmesi için, kan transfüzyonları yapılması da gerekebilir. Akyuvar yapmak için kök hücre kullanımı lösemi tedavisinde şimdiden etkili bir yol olmuştur. Göbek kordon kanından elde edilen kök hücreler, orak hücre ve diğer kan hastalıklarına sahip hastalar için alyuvar hücreleri sağlamada kullanılmaktadır. ABD'de birçok eyalette göbek kanından kök hücre izolasyonu çok popüler hale gelmiştir; ebeveynler ödeme yaparak, gelecekte çocuklarının ihtiyacı olduğunda kullanılmak üzere kordon kanı hücrelerini dondurarak sonsuza kadar saklanması tercihinde bulunabilmektedirler.

Şimdiye kadar, doku hasarlarının giderilmesinde kök hücre kullanılması ile ilgili insan klinik çalışmaları



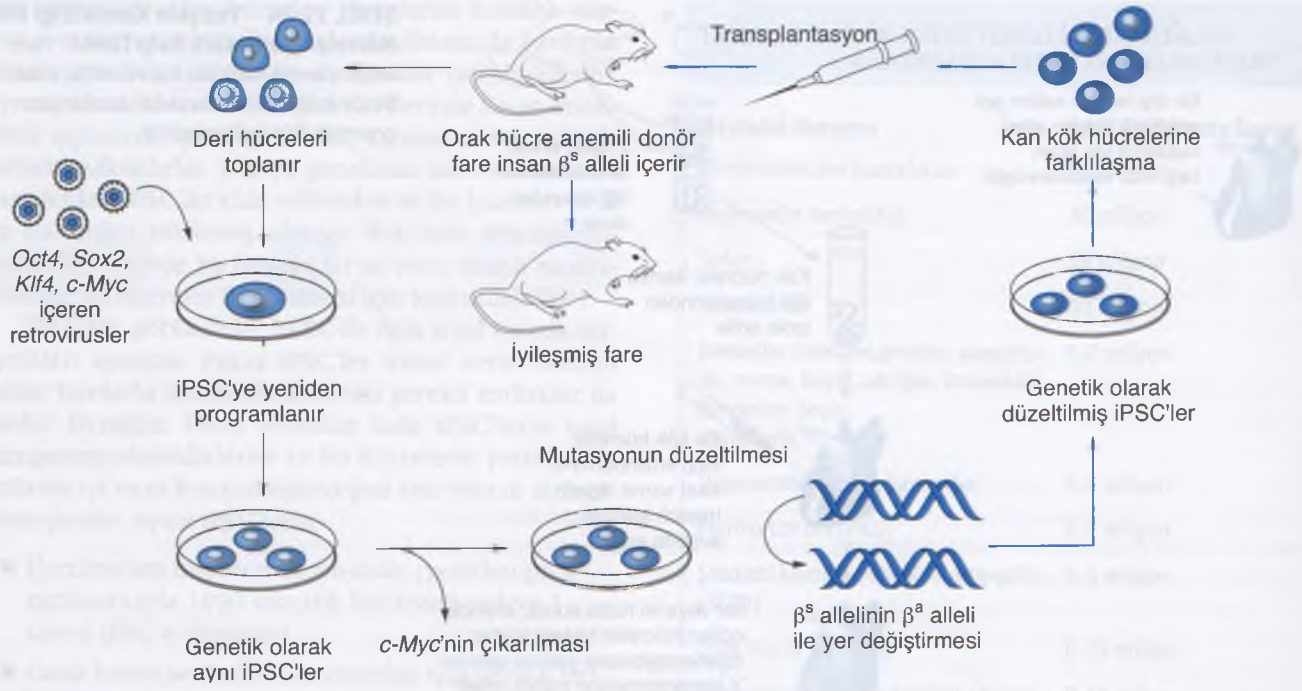
ŞEKİL 11.24 Yetişkin Kemik İliği Kök Hücreleriyle Hasarlı Kalp Tamiri Fare erişkin kemik iliği kök hücreleri fare kalbinde kalp krizi ile hasarlanan alanları onarmak için kullanılabilir.

kadar, hayvan modellerinde de umut verici sonuçlar elde edilmiştir. Örneğin, yağdan elde edilen kök hücreler insan kafatasında kemik oluşumu için kullanılmıştır. Kalp dokusunun onarımı çok güçlü bir potansiyel göstermiştir. Kalp krizi gibi travma sonrası ölen hücrelerin yenilenmesinde kök hücreler kullanılabilir. Her yıl yaklaşık yarım milyon insanın ölmesine neden olan kalp krizi, ABD'de başlıca ölüm nedenidir. Kalp kası hücrelerinin ölümü kalbi zayıflatmakta ve normal kan akımının sağlanması için yeterli güçte kasılmasını engellemektedir. Erişkin kalp kası hücreleri kendi kendilerini iyi onaramazlar. Çeşitli araştırma grupları farklı kaynaklardan elde ettikleri yetişkin kök hücrelerini fare kalbindeki hasarlı bölgeye enjekte etmişlerdir (**Şekil 11.24**). Bu kök hücreleri, kalp kası hücrelerine dönüşerek, sağlıklı kalp kası hücresi ile elektriksel bağlantı yapabilir ve kalp fonksiyonlarını % 35'in üzerinde artırabilir. Araştırıcılar tedaviden en az bir yıl sonra kalbin pompalama verimliliğinde düzelme olduğunu bildirmiştir. Benzer bir uygulama, hESC'nin domuzlarda ve insanlarda hasarlı ventrikül duvarına uygulandığı klinik çalışmalarda da yapılmıştır. Her iki örnekte de transplante kök hücreler kalp kası oluşturmak için farklılaşmış ve hasarlı alanın kasılma ve elektriksel aktivitesinde önemli derecede düzelme görülmüştür. Bir başka çalışmada da insan göbek kordonundan elde edilen kök hücreler sıçanlarda kalp fonksiyonlarını düzeltmek için kullanılmıştır.

Bilim insanları bu uygulamanın bir gün insanlarda çalışabileceği konusunda oldukça umutludurlar. Şunun gerçekleşeceğini düşünün; gelecekte bir cerrah, tıpkı cerrahi girişim sırasında transfüzyon için kan bankasından rutin olarak istenen kan gibi, rejeneratif tıp laboratuvarından kalp krizi geçiren hastasına transplante etmek için birkaç gram kalp kası hücresi sipariş edebilir.

Farelerde orak hücre anemisini düzeltmek için umut verici ve yenilikçi bir potansiyel tedavi olarak iPSC kullanımı gösterilmektedir (**Şekil 11.25**). Bu çalışmada, iPSC'ler insan orak hücre hemoglobin geninin mutasyona uğramış versiyonunu eksprese eden ve orak hücre hastalığı olan transgenik farenin deri hücrelerinden elde edilmiştir. Bu iPSC'ler hemoglobin gen mutasyonunu düzeltmek için genetik olarak değiştirilirler. iPSC'ler önce kan kök hücresi oluşturmak için uyarılırlar, sonra da fonksiyonel alyuvar hücrelerini üretmek ve hastalığı düzeltmek için orak hücreli donör fareye transfer edilirler. Bu inanılmaz heyecan verici sonuç, hem kök hücre hem de gen terapisi kombinasyonlarının bir sonucudur.

Daha önce bu bölümde omurilik yaralanmalarından muzdarip olan hastaların karşılaştığı sorunları tartışmıştık. Son yıllarda araştırıcılar, insan beyni ve omuriliğinin yeni nöronlar geliştiremeyeceğine dair, uzun süredir varolan bir inancı çürütmüşlerdir. İnsan beyninden yetişkin kök hücreler izole edilmiş ve kültür ortamında nöronlar oluşturulmuştur; bilim insanları ESC'lerin nöron oluşturmak için farklılaşabileceğini ve bunların fare ve sıçanlara enjekte edilerek omurilik yaralanmalarında nöral fonksiyonları düzeltebileceğini göstermişlerdir. Johns Hopkins Üniversitesindeki araş-



ŞEKİL 11.25 iPSC'leri Kullanarak Orak Hücreli Aneminin Düzeltilmesi için Fare Modeli

tırıcılar, insan kök hücre transplantasyonuyla arka ayakları felçli bir farenin yürüyebildiğini göstermişlerdir. Bu çalışmalar çocuk felci hastalığına yol açan polimiyelit virüsüne benzer bir virüsle enfekte olduktan sonra felç olan fareler üzerinde yapılmıştır. Son zamanlarda Kaliforniya'daki bir biyoteknoloji şirketi Geron Corporation'da yapılan, omurilik yaralanmaları olan bireylerde tedavi amacı ile hESC'nin kullanıldığı ilk klinik çalışma FDA onayını almıştır. Omurilik onarım ve yenilenmesi alanında hala yapılması gereken çok iş olmakla birlikte, araştırıcılar önümüzdeki 3-5 yıl içinde yetişkin nöral kök hücre transplantasyonlarının insan klinik çalışmaları için hazır hale geleceği konusunda oldukça iyimserler ve omurilik yaralanmasından etkilenen birçok kişiye umut vermekteler.

Kök hücre teknolojilerinin uygulanabilir tedavi stratejileri olmadan önce cevaplanması gereken temel sorular vardır. Günümüzdeki mevcut çalışmalarda, herhangi bir kaynaktan pluripotent kök hücre elde edilerek bunların insan veya hayvanlara uygulanması birçok sorunu da beraberinde getirmiştir. Sizce buradaki temel sorun nedir? Temel sorun, pluripotent hücrenin istenen dokuya farklılaşmasının kontrolünün nasıl sağlanacağıdır. Örneğin, kök hücre dokuya enjekte edilirse, diyelim ki iskelet kasına, bunların farklılaşma belirtilerine nasıl yanıt vereceklerini in vivo olarak kontrol etmek zordur. Sonuçta bu hücreler sıklıkla amaçlanan tip yerine birçok farklı ve istenmeyen hücre ve doku tiplerine dönüşmektedirler.

Farklılaşmış yetişkin dokular yerine kök hücreler enjekte edildiğinde, bilim insanları bu hücrelerin vücudun diğer alanlarına yayılmasını ve ayrıca amaçlanan dokunun dışındaki dokulara da farklılaşmasını tam olarak kontrol edemezler. Enjekte edilen hESC'ler tümör oluştururlar; örneğin diş, kemik ve saç gibi dokuların tümünün bir karışımı şeklindeki *teratom* adı verilen tümör tipleri ortaya çıkar. Kök hücreler farklılaştığında ortaya çıktığı gözlenen kromozom anormallikleri de kaçınılması gereken bir diğer problemdir. Örneğin, kromozom sayısında değişikliklere (trizomi 12, trizomi 17 ve diğerleri) farklılaşma sırasında oldukça sık rastlanır. Çin, Tayland, Kore, Romanya ve diğer ülkelerdeki denetimsiz kök hücre kliniklerinde, hastalar kök hücre naklinden sonra ortaya çıkan komplikasyonların sonucunda ölmüşlerdir.

Gelecekte en etkin ve güvenilir kök hücre tedavilerinin, onları direk olarak hastaya enjekte etmek yerine, kök hücrenin in vitro olarak arzu edilen hücre veya dokuya farklılaştırılması ve sonra bu hücrelerin hastaya nakledilmesi şeklinde yapılması gerektiği bilinmelidir. Cevaplanması gereken diğer önemli sorular da şunlardır:

- Kök hücreler niçin kendilerini yenileyebilir ve farklılaşmamış durumlarını koruyabilirler?
- Kök hücrelerin bölünmesini hangi faktörler tetikler?
- Kök hücrelerin farklılaşmasını etkileyen büyüme sinyalleri (kimyasal, genetik, çevresel) nelerdir?
- Mevcut organların içine yeni doku ve hücrelerin entegrasyonunu hangi faktörler etkiler?

- Embriyo gerektirmeyen somatik hücrelerin çekirdek yeniden programlanması ve diğer yaklaşımlar, hESC'lerin özelliklerini taşıyan pluripotent kök hücrelerin üretiminde güvenilir teknikler olabilirler mi?
- Hangi hastalıklar kök hücre teknolojileri ile en etkin tedavi edilebilirler?
- Kök hücre tedavilerinin uygulanmasında hangi stratejiler en etkili olacaktır?

Bunlar ve diğer birçok sorunun cevapları, insan hastalıklarının tedavisi için kök hücre uygulamalarının geliştirilmesinde bilim insanları ve hekimlere yardımcı olacaktır.

Klonlama

Bu kitapta klonlamanın birçok tipini tartıştık. *Klonlama*nın bir şeyin – gen, hücre veya tüm bir organizma gibi – kopyasını yapmak anlamına geldiğini hatırlayın. Gen klonlamada rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır. Bakteriler veya kültüre alınmış hücreler petri kabında veya biyoreaktörde bölündükleri zaman, hücre klonları üretilmiş olur. Fakat klonlamanın hiçbir yönü hayvan klonlamada olduğu kadar tartışmalı değildir. 1997'de Dolly adlı koyunun klonlandığının duyurulmasıyla, dünya, insan klonlanmasma yol açabilecek biyoteknolojik ilerlemelerle yüzyüze geldi. Dolly'nin yaratılması kamuoyu farkındalığında büyük artışa ve klonlama ile ilgili ek tartışmalara yol açmıştır. Bu kısımda, insan klonlama uygulamalarının bilimsel etkilerini gözden geçireceğiz.

Terapötik Klonlama ve Reprodüktif Klonlama

Klonlamada başlıca iki yöntem vardır: **reprodüktif klonlama** ve **terapötik klonlama** (Tablo 11.3). Reprodüktif klonlamanın amacı bebek oluşturmaktır. Dolly reprodüktif klonlama ile üretilen birçok memelinin ilkidir. Reprodüktif klonlamanın tersine, terapötik klonlama transplantasyon ihtiyacı olan hastaya genetik olarak uygun kök hücreyi sağlar. Terapötik klonlamada; hasta hücresinden (örneğin deri hücreleri) alınan kromozomlar enüklea yumurtaya (nükleusu çıkartılmış yumurta) enjekte edilir, daha sonra bu yumurta embriyo oluşturmak üzere kültür ortamında bölünmesi için uyarılır (**Şekil 11.26**). Oluşan embriyo, çocuk oluşturmak için kullanılmaz, onun yerine blastosist evresine gelene kadar birkaç gün büyümesi sağlanır ve sonra kök hücre elde etmek için kullanılır. Bu embriyodan elde edilen kök hücreler kültür ortamında büyütülebilir ve sonra donör olan hastaya verilir (Şekil 11.26).

iPSC'lerinin geliştirilmesinden önce, terapötik klonlama, hücrelerin orijinal kaynağı hastanın kendisi olduğu için alıcıda herhangi bir immün reddi korkusu olmadan hastalık tedavisinde kullanılmak üzere hastaya–özgü kök hücre sağlayan, potansiyel bir yöntem olarak görülüyordu. Teorik olarak, bir hastanın kök hücreleri genetik hastalığı olan insanların hücre serilerini oluşturmak için kullanılabilir, böylece bilim insanlarına hastalık hakkında daha fazla bilgi edinebilmeleri ve o hastalığı çalışabilmeleri için benzersiz bir potansiyel sağlar. "Teorik olarak" diyoruz, çünkü terapötik klonlamanın insanlarda çalışabilirliği kanıtlanmamıştır.

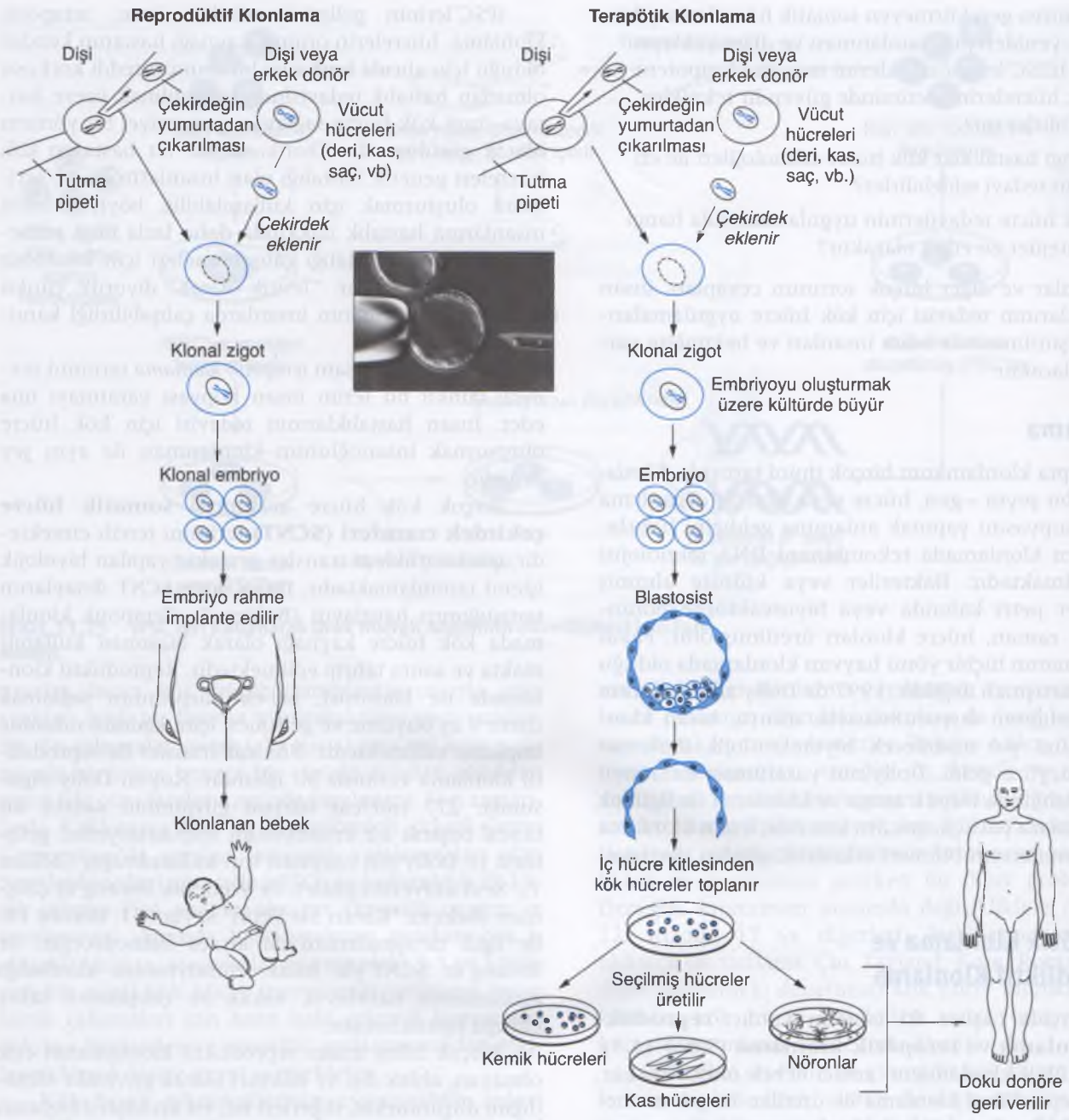
Birçok bilim insanı *terapötik klonlama* terimini sevmez, çünkü bu terim insan kopyası yaratmayı ima eder. İnsan hastalıklarının tedavisi için kök hücre oluşturmak insanoğlunun klonlanması ile aynı şey değildir.

Birçok kök hücre araştırıcısı **somatik hücre çekirdek transferi (SCNT)** terimini tercih etmektedir, çünkü nüklear transfer gerçekte yapılan biyolojik işlemi tanımlamaktadır. Daha önce SCNT detaylarını tartıştığımızı hatırlayın (Bölüm 7). Terapötik klonlamada kök hücre kaynağı olarak blastosist kullanılmakta ve sonra tahrip edilmektedir. Reprodüktif klonlamada ise blastosist, bebek oluşumunu sağlamak üzere 9 ay büyüme ve gelişmesi için, kadının rahmine implante edilmektedir. Nüklear transfer ile reprodüktif klonlama verimsiz bir işlemdir. Koyun Dolly olgusunda, 277 nüklear füzyon girişiminin sadece bir tanesi başarılı bir embriyonun implantasyonu, gelişmesi ve Dolly'nin oluşması için kullanılmıştır (Bölüm 7). Seul üniversitesinden Dr Woo Suk Hwang'ın çalışması (bakınız "Kararı Siz Verin" sayfa 331; Bölüm 13) ile ilgili tartışmalardan da kısaca bahsedeceğiz. Dr Hwang'ın SCNT'yle insan embriyosunu klonladığı açıklamasını hatırlayın, ancak bu çalışmanın sahte olduğu ispatlanmıştır.

Birçok bilim insanı reprodüktif klonlamanın etik olmayan, ahlak dışı ve bilimsel olarak güvenilir olmadığını düşünmekte, diğerleri ise, en azından dünyanın bazı yerlerinde, kaçınılmaz olduğunu düşünmektedirler. Bir kaç özel grup reprodüktif klonlama ile insan üretme planları olduğunu birkaç kez kamuoyuna duyurdular. Bu iddialar çok tartışma yarattı ve bilimsel toplulukların çoğu tarafından kınandı ve onaylanmadı. Bu kitabın basıldığı zamana kadar insan klonlandığına dair kesin bir kanıt mevcut değildir.

Amerika Birleşik Devletleri'nde Embriyonik Kök Hücre ve Terapötik Klonlama ile İlgili Düzenlemeler

Kök hücrelerin etik kullanımı üzerine uluslararası kılavuzlar olmasına rağmen, günümüzde kök hücre



ŞEKİL 11.26 Reprodüktif Klonlama ve Terapötik Klonlama Reprodüktif klonlamanın amacı klonlanmış bebek üretmektir. Terapötik klonlama, bir hastadan alınan hücrelerle genetik olarak özdeş olan kök hücrelerin üretilmesi ve hastaya-özgü kök hücre tedavisinin yapılmasıdır. Bu fotoğrafta çekirdek bir cam mikropipet (sağda) ile çıkartılırken, yumurtanın tutma pipeti (yumurtanın sol tarafı) ile tutulması gösterilmektedir.

kullanımını düzenleyen uluslarası bir politika yoktur. Amerika Birleşik Devletleri'nde kök hücrelerin saflığı ve onların klinik çalışmalarda kullanımı ve tıbbi ürünler konusunda FDA tarafından konmuş kurallar vardır. ABD'de hESC'ler ilk izole edildikten kısa bir süre sonra, Ulusal Biyoetik Danışma Komitesi ve Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) hESC araştırmaları ile ilgili kılavuzlar üzerinde çalışmaya başladı. 9 Ağustos 2001 tarihinde, Başkan George W. Bush ESC'lerin izolasyonu amacıyla embriyolar oluşturmak için kullandırılan federal fonların kullanımını yasakladığını duyurdu. Bu yasak, bu tarihten önce NIH aracılığıyla kurulmuş ve sürdürülmekte olan mevcut 78 hücre serisi üzerindeki araştırmaları kapsamadı.

TABLO 11.3 KÖK HÜCRE, TERAPÖTİK KLONLAMA VE REPRODÜKTİF KLONLAMANIN KARŞILAŞTIRILMASI

	Embriyonik Kök Hücreler (ESC'ler)	Yetişkin Kök Hücreler (ASC'ler)	İndüklenmiş Pluripotent Kök Hücreler (iPSCs)	Terapötik Klonloma (Somatik Hücre Çekirdek Transferi)	Reprodüktif Klonlama
Final veya "son" ürün	Kültürde büyüyen farklılaşmamış kök hücreler (blastosist evresindeki bir embriyo gibi fetal veya embriyonik dokulardan izole edilen)	Kültür tabağında büyüyen farklılaşmamış kök hücreler (kemik iliği hücresi gibi erişkin dokulardan izole edilir)	Somatik hücrelerden yaratılan farklılaşmamış kök hücreler; hastaya-özgü olabilirler	Kültür tabağında üreyen farklılaşmamış kök hücreler (bu hücrelerin aynı zamanda alıcısı olan kişilerden elde edilir	"Klonlanmış" insan
Amaç/uygulama	Hastalıklı veya yaralı dokunun yenilenmesi gibi insan hastalık durumlarının tedavisi ve araştırılmasında kök hücre kaynağı	Hastalıklı veya yaralı dokunun yenilenmesi gibi insan hastalık durumlarının tedavisi ve araştırılması için kök hücre kaynağı	İnsan hastalıklarının tedavisi ve araştırılmasında hastaya özgü potansiyel kök hücre kaynağı	Hasta veya hasarlı dokuların yenilenmesi gibi hastalık durumlarında, alıcıyla genetik olarak uyumlu kök hücre kaynağı	Çocuk doğumuna varabilecek embriyo üretilmesiyle; bir insanın yaratılması, kopyalanması veya yerine yenisinin yapılması
Embriyo gerekir	Evet	Hayır	Hayır	Evet	Evet
Taşıyıcı anne gerekir	Hayır	Hayır	Hayır	Hayır	Evet
İnsan yaratılır	Embriyo ve nasıl tanımlandığına bağlıdır	Hayır	Hayır	Embriyo ve nasıl tanımlandığına bağlıdır	Evet
Gerekli zaman	Kültürde birkaç haftalık büyüme	Kültürde birkaç haftalık büyüme	Haftalar veya aylar	Kültürde birkaç haftalık büyüme	9 ay, normal biyolojik gebelik süresi (kültürde embriyo geliştikten sonra)

Ancak, bu serilerin yalnızca 21'i araştırma için kullanılabildi, diğerlerinin başlangıçta düşünüldüklerinden çok daha az değerli olduğu görüldü. Bu serilerin bazılarının farklılaşma gerçekleşmeden gelişmeleri durdu. Diğerleri kromozom sayısında anormallikler nedeniyle genetik olarak uygunsuzluk gösterdi. Bazı seriler fare besleyici hücreler (genellikle ESC çalışmasının erken dönemlerinde büyüyen kök hücrelere temel besinleri sağlamak için kullanılan hücreler) ile kontamine oldular. Birçok bilim insanı ve kök hücre savunması yapan grup yeni hESC dizileri oluşturulması için federal fonlar üzerindeki yasağın kaldırılması için çok uğraştılar.

Federal fonlar üzerindeki yasağı kaldırmak için hazırlanan bir yasa tasarısı 2006 yılında Senatodan geçmiş, ancak sonradan Başkan Bush tarafından veto edilmiştir. Kongre 2007 yılında yeni bir tasarı denemiş, fakat takiben Başkan Bush tarafından tekrar veto edilmiştir. Mart 2009 yılında ABD Başkanı Barack Obama yasağı kaldırdı ve NIH'i 4 ay içinde ESC çalışmalarına başlaması için federal fon yönetimi konusunda kurallar geliştirmek üzere bir kanun hükmünde kararnameyle görevlendirdi. NIH federal fonun hESC çalışmaları için kullanımına izin veren taslak kılavuzları Nisan 2009'da açıkladı (fakat hESC eldesi için federal fon kullanılmasını değil).

2010 yılının sonlarında, Başkan Obama'nın ESC fonlarının genişletilmesi ile ilgili emrini, Columbia bölgesinden bir federal yargıç embriyoyu tahrip eden araştırmalara federal fon verilmesini yasaklayan bir önceki kanuna aykırı olduğu gerekçesiyle geçici olarak engelledi. Bu karar çalışmalarını federal fonlarla



KARARI SİZ VERİN

Kök Hücre ve Klonlama Tartışmaları

Bilim ve tıp yenilikçi icatlar ürettiğinde, toplum genellikle bu yeni teknolojinin sonuçlarına hazır değildir. 1850'de anestezinin gelişimi çok tartışmalı olmuştur. Birçok kişi anestezinin beklenmeyen yan etkileri hakkında endişelenmiş ve dini gruplar ağrısız çocuk doğurmayı, kutsal kitapta Havva'nın ağrılı çocuk doğurmak için cennet bahçesinden ayrıldığı inancına dayanarak, protesto etmişlerdir. 150 yıl sonra dâhi, bazı insanlar anestezinin kompleks cerrahilerde ve hatta yirmilik dişin rutin çekiminde kullanımına bile itiraz etmektedirler.

Rekombinant DNA teknolojisi ilk geliştirildiği zaman, bu tür deneylerden ne sonuçlar alınacağı konusunda büyük korku ve spekülasyonlar vardı (bu çalışmaların tehlikelerinin tartışıldığı Asilomar Konferansını Bölüm 3'den hatırlayın). Rekombinant DNA teknolojisi, tüm dünyada 250 milyondan fazla kişinin tedavisinde kullanılan birçok yenilikçi ve güvenli ürünlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Anestezi ve rekombinant DNA tartışmalarınından farklı olmayarak; günümüzde din adamları, politikacılar, araştırıcılar ve genel kamu kök hücreleri ve klonlamayı tartışmaktadırlar. Bu tartışmaların temelinde insan kök hücrelerinin kaynağı ve özellikle hESC ve bunların potansiyel kullanımları ve suiistimalleri vardır. hESC'nin tartışmalı olması büyük oranda kaynağı – erken dönem insan embriyosu – nedeniyledir. hESC'nin birçok yıkıcı hastalığın kür ve tedavisinde büyük bir potansiyel olduğunu, insanlara daha sağlıklı ve daha uzun yaşamaları için bir fırsat sağladığını bilerek, onların kullanımı hakkında ne düşünüyorsunuz? ESC'ler bugüne kadar halk ve politikacılar tarafından tartışılan belki de en tartışmalı bilimsel konudur. Kök hücreler ve klonlamayı kapsayan sorular sayıca sonsuz gibi gözükmektedir.

- Sadece başka kullanımlar amacıyla tahrip etmek üzere bir insan embriyosu yaratmak kabul edilebilir mi?
- Kök hücre ve klonlama teknolojileri ile ilgili araştırmaları desteklemek için insan yumurtasına büyük oranda ihtiyaç duyulacağı korkusu vardır. Cerrahi yöntemle yumurtaları toplanan kadına para ödenmesi kabul edilebilir mi?
- Terapötik klonlamayla oluşturulan erken embriyonun ahlâki durumu nedir?
- Bağışlanan hücrelerden geliştirilen teknoloji ve kök hücre serileri üzerinde hücre donörünün ne gibi hakları olabilir? Doku donörleri, hücrelerinden oluşturulan hücre serilerine ait ticari potansiyeli ve parasal ödülleri paylaşmalı mıdır?

Bazı insanlar bir yumurta döllendiği anda bir kişinin oluştuğuna inanırlar, o nedenle terapötik klonlamanın başka bir kişinin çıkarı için bilinçli olarak çocuk öldürmek olduğunu düşünürler. Diğerleri, erken embriyonun bir insan oluşturma potansiyeli olan canlı hücre kümesi olduğunu, fakat bir insan olmadığını düşünürler.

- In vitro fertilizasyon uygulamalarıyla geliştirilen embriyoların imhasını gerekçelendirmeli miyiz?
- Bu embriyoları diğer insanlardaki ağrı ve acıyı azaltmak amacıyla niçin kullanmayalım?

Bilim insanları yaşamı birçok şekilde tanımlarlar. Biyologlar blastosist denen hücre kümelerinin hücresel düzeyde canlı oldukları konusunda hemfikirdirler. Tüm hayat formları saygıyı haketmekle beraber, blastosist bir kişi değildir, çünkü uzuvlara, sinir sistemine, organ veya insanın diğer fiziksel özelliklerine sahip değildir. Tartışmanın ana kaynağı, insan embriyosuna ahlâki bir konum verilip verilmemesi ve eğer verilecekse bunun hangi aşamada yapılması gerektiği konularındadır.

- Embriyonun ahlâki değeri geliştikçe artar mı? Veya ahlâki değeri bir bebek veya erişkine eşit midir? Eğer bir erken embriyo yaşayan birey olarak kabul edilirse, o zaman diğer yaşayan kişilerin bütün haklarına sahiptir. Dolayısıyla bir embriyonun kasıtlı olarak tahrib edilmesi ahlâksızlıktır. Vergi veren vatandaşlar paralarının nasıl harcanacağına ve inandıkları şeyin etik, sorumlu ve güvenli bir araştırma olup olmadığına karar verebilmelidirler. Vatandaşların ESC ve klonlama gibi konularda iyi aydınlatılmış kararlar almalarını sağlamak için, bilimsel kurumların ellerindeki bilgileri paylaşmaları gerekir.

İnsan klonlama Amerika Birleşik Devletleri'nde yasaklanmıştır, fakat diğer birçok ülkede daha az kısıtlayıcı politikalar vardır. Kök hücre ve klonlama ile ilgili şiddetli kısıtlamaların, bu alandaki en yetenekli bilim insanlarının klonlamanın yasal olduğu diğer ülkelere "beyin göçü"ne yol açabileceği endişesi vardır. ABD biyoteknoloji endüstrisi bunun sonucunda zarar görebilir. Birçok özel şirket kök hücre araştırmalarına önderlik etmekte, özel fonlar kullanmakta, araştırmalarını sürdürmek için kök hücre araştırmalarının daha çok desteklendiği ülke veya eyaletlere taşınmaktadırlar.

Terapötik klonlama eninde sonunda ABD'de onaylanmış olsa bile, onun kabul edilmesi kişilerin reprodüktif klonlanmayı kabul etme olasılıklarını artıracak mıdır? Muhtemelen hayır. Terapötik klonlamanın hastalıkların tedavisinde kullanılması amaçlanmıştır, yeni bir insan oluşturmak tamamen farklı bir konudur. Eğer iPSC'ler kök hücre yaratmak için uygun bir yol olabilirse,

Devam

terapötik klonlama ve hESC kullanımı hakkında etik ve bilimsel tartışmalar anlamsızlaşır, çünkü kök hücre bir yumurta veya embriyo olmadan yaratılmış olur.

Çeşitli kamuoyu yoklamalarında, hESC kullanımı hakkında Amerikalıların karışık tepkileri olduğu bildirilmiştir. Son anketler, hESC kullanımı ahlâken kabul edilebilir diye düşünen Amerikalıların yüzdesinin son 8 yılda yaklaşık % 50'den % 65'e yükseldiğini göstermektedir. Amerikalılar genellikle dünyada sağlık bakımından en yüksek düzeyi beklemektedirler. Başka bir ülkedeki bilim insanları, Parkinson hastalığı, Alzheimer hastalığı ve diğerlerini tedavi etmek için terapötik klonlamayı kullanırlarsa, Amerikan halkı böyle teknolojilere erişememek durumunda ne hissedecektir? Hatta bazıları reprodüktif klonlanmanın ABD'de yaşayan insanların temel bir hakkı olduğunu iddia etmektedirler. Reprodüktif klonlamanın dışında herhangi bir yöntemle biyolojik olarak çocuk sahibi olamayan infertil bir çift olsaydınız ne hissederdiniz? Erken embriyo ve onun kök hücrelerinin kullanıldığı uygun ve etik açıdan kabul edilebilir uygulamalar var mıdır? Aynı şey klonlama için söylenebilir mi?

Kararı siz verin.

yürüten kök hücre araştırıcılarında büyük bir telaş yarattı ve hESC çalışmaları için federal fon kullanımını yasaklayan bir emirle sonuçlandı; ancak daha önce izin almış olanlar çalışmalarına devam ettiler. Kök hücre araştırması yapan ABD bazlı şirketler üzerinde bu kararın etkisi, kararın ilanından sonra bu şirketlerin hisse senedi fiyatlarının % 8 oranında düşmesi şeklinde görüldü. NIH, araştırıcılarına hESC araştırmalarını acilen kapatma emri vermeye mecbur kaldı. 2011 baharında ABD temyiz mahkemesi 2010 yılındaki bu emri kaldırdı, ancak büyük ihtimalle bu mesele yüksek mahkemeye gidecektir. Rehber İnternet Sitesinde listelenen NIH web bağlantılarından kök hücreleri, mevcut güncel düzenlemeler ve diğer kaynakları kontrol ediniz.

Birçok özel vakıf kök hücre araştırıcıları için milyonlarca dolar sağlamakta ve birçok eyalet kök hücre araştırma enstitüleri oluşturmak ve ESC araştırmalarına devlet desteği sağlamak için mevzuat düzenlemeleri üzerinde çalışmaktadır. Daha aktif eyaletlerden bazıları California (2004 yılında yaklaşık 300 milyon dolar tahvil ve toplam 3 milyar doların üzerinde bir bütçeyi onaylayan Yönerge 71 kabul edildi), Connecticut, Illinois, Maryland ve Wisconsin'dir. Dünyanın her yerinde, terapötik klonlama politikaları ve yeni hESC serileri üretilmesi ile ilgili yönetmelikler farklıdır. Örneğin, yeni serilerin üretimi ve terapötik klonlama İngiltere, İsrail, Güney Kore, Çin ve Singapur'da yasaldır. Terapötik klonlama Brezilya, Avustralya ve Avrupa Birliği'nde (izin veren üye ülkelerde hESC'ler in vitro fertilizasyon prosedürlerinden arta kalan embriyolardan elde edilebilmektedir) yasaktır.

Meşru kök hücre araştırma merkezleri tüm dünyada büyük güç kabul edilen ülkelerin yanı sıra, nispeten daha küçük diğer birçok ülkede de (Belçika, İsveç, Türkiye, İsrail, İsviçre, vb) kurulmuştur. Fakat daha önce belirtildiği gibi, tüm dünyada birçok kök hücre tedavisi yapan klinik açılmış olup bunlar, asılsız bilgi ve yan etkiye rağmen, çoğunlukla başarılıymış gibi lanse edilen kök hücre tabanlı tedaviler için ümitsiz hastaların diğer ülkelere seyahat etmelerine neden olmaktadır. "Kök hücre turistleri" denen çaresiz hastalar, kanıtlanmamış kök hücre tedavileri için dünya etrafında seyahat etmekte ve bu "turizm"e katılan bireylerin sayısı korkutucu bir hızda büyümektedir. Avrupa Birliğinde kök hücre kullanımı üzerine ABD'deki FDA yönetmeliklerine benzer yasalar vardır. Ama kök hücrelerin güvenli uygulanmalarını sağlayan ve onların uygunsuz ve etik olmayan kullanımından kaynaklanan hileli ve trajik durumlardan kaçınmak için uluslararası düzenlemelerin oluşturulmasının gerektiği açıktır. Böyle ihlaller ve oluşan trajediler sadece ilerlemeyi engellemekle kalmaz, ayrıca geliştirilmekte olan meşru tedavilere olan güveni de zedeler.

BİR FARK YARATMAK

1968 yılında, hESC'nin izole edilmesinden yaklaşık 40 yıl önce, doktorlar ilk başarılı kemik iliği naklini yapmışlardı. Kemik iliği ASC'ler içermektedir, özellikle kanda mevcut olan tüm farklı hücreleri üretebilen hemapoetik kök hücreler. Bu ilk transplantasyondan sonra kemik iliği nakli rutin hale gelmiş; birçok kan ve kemik iliği hastalığı, lösemi gibi kan kanserleri, kan pıhtılaşma bozuklukları ve bağışıklık sistemi bozukluklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmıştır. Kemik iliği transplantasyonunun ilk günlerinde bu hastalıkların birçoğunun çaresiz olduğu düşünülmekteydi, birçok kuşku ve üstesinden gelinmesi gereken birçok zorluk vardı. hESC ve iPSC araştırmaları bazı yönlerden benzer zorluklarla yüzyüzedir ve gelecekte bu teknolojilerin başarısını yakalayacaktır. Sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde yaklaşık 10 000 hasta her yıl kemik iliği nakli ile tedavi edilmekte ve bu tedavilerin başarısı birçok hasta ve ailesi için "bir fark yaratmaktadır".



KARİYER PROFİLİ

Tıbbi Biyoteknolojide Kariyer Seçenekleri

Tıbbi biyoteknoloji, başta biyoteknoloji ve ilaç şirketleri olmak üzere, heyecan verici bir yelpazede potansiyel kariyer seçenekleri sunmaktadır. Kimya, hücre biyolojisi, moleküler biyoloji, biyokimya ve bioinformatik kursları önemlidir; ancak sektör uzmanları tıbbi biyoteknoloji alanında kariyer yapmak isteyen öğrencilere ilgi alanlarını belirlemelerini ve şirketin ihtiyaçlarına uygun olmalarına yardımcı olacak olan hayat ve iş tecrübesi kazanmalarını tavsiye etmektedirler. Özellikle, yerel bir kimya, ilaç ya da biyoteknoloji şirketinde staj veya yaz araştırma deneyimi kesinlikle tavsiye edilmektedir.

Eğer mümkünse, bir üniversite öğrencisi iken, bir profesör ile bir araştırma projesi içinde yer alın. Lisans araştırmaları bir araştırma projesini planlama, deneyler yürütme ve sorunları giderme ile verileri yorumlamayı öğrenme konularında çok değerli olanaklar sağlayabilir. Bu tür araştırmalar bölgesel veya ulusal toplantılarda bir sunum – diğer bilim insanları ile biraraya gelmek için harika bir yoldur – veya hatta yayın bile olabilir. Danışman profesörünüz aynı zamanda ilk işe alınmanızda gerekli referansı da sağlayabilir.

İnsan kaynakları, öğrencilere, onlara hitap eden şirketin boyutlarını veya işin tipi hakkında fikir sahibi olmalarını sağlamak için, farklı büyüklükteki şirketlerde çalışmalarını tavsiye etmektedirler. Ne yapmak istediğinizi düşünün, sonra beceri ve ilginize uygun şirketleri seçin. İlaç icadı ve geliştirme, rejeneratif tıp, kök hücre teknolojisi, gen terapisi, kanser araştırması, yaşlanma araştırması, cerrahi materyaller, genomik ve çocukluk çağı hastalıklarının giderilmesi ile mi ilgileniyorsunuz? Büyük bir şirket mi, yoksa daha küçük daha kişiselleşmiş bir şirket mi veya yeni başlayan biyoteknoloji şirketi mi seçmek istersiniz?

Buna karar vermek, online bilgi zenginliği ile her zamankinden daha kolay. Biyoteknoloji şirketlerinin hepsinin web sitesi vardır ve bu sitelerdeki mükemmel bağlantılar Bölüm 1'de sunulmaktadır. Bir iş görüşmesi, istediğiniz işe alınmanız için şirketle gerçekten ilgilendiğinizi ve biraz da arka plan bilginizi göstermeye yardımcı olur.

Tıbbi biyoteknolojide önlisans ve lisanslı kişiler için birçok farklı pozisyonlarda iş olanağı vardır. Bir çoğu laboratuvar teknisyeni olarak işe başlar. Bazı şirketlerde bu pozisyon, solüsyonları hazırlamak ve deney için materyalleri ayarlamak gibi rutin işleri kapsamaktadır, fakat girişimciliklerini göstermek isteyen bireylere genellikle araştırma projelerinde sorumluluk isteyen kararlarda yer almak için daha fazla özgürlükler verilir. Uygulamadaki bilim insanları yeni ürünler ve prosedürler geliştirirler, genellikle araştırmayı yapmak için direkt laboratuvarda çalışırlar. Bazı şirketlerde, uygulamadaki bilim insanları ürün tanıtımları yapar ve müşterilerine teknik seminerler verirler. Ayrıca, genellikle müşteri ilişkileri konusunda ürünün müşteriye nasıl öğretileceği, data yorumları gibi konularda da görev alırlar. Klinik bilim insanları yeni bir ilaç veya tıbbi ürünün test edilmesi için klinik araştırmaların yapılmasında hekimler ve araştırıcı bilim insanları ile beraber çalışırlar. Tıbbi biyoteknoloji şirketleri aynı zamanda ürün satış pozisyonları ve pazarlama aracılığıyla iş yeteneklerini bilim ile kombine etmek isteyen insanlara da iş olanağı sağlar.

Biyoteknoloji şirketlerinin çoğunda görüşme aşaması çok titiz geçer. Şirketler, detaylar konusunda dikkatli, sistematik ve son derece organize olan kişileri isterler. Tıbbi biyoteknoloji araştırmaları bir ekip işidir. İyi yazma ve iletişim becerileri esastır, çünkü diğer insanlarla yazılı ve sözlü olarak rutin iletişimde olacaksınız. Ayrıca hemen hemen her biyoteknoloji şirketi ve ilaç firması bilgisayar becerileri olan, model moleküler yapılar, hipotez testi, verilerin saklanması ve yönetilmesinde yeni yazılım modelleri geliştirmek için yazılım mühendisleri ve bilgi teknolojisi uzman ekipleriyle birlikte çalışabilecek olan insanları aramaktadır.

Endüstrinin içindeki kişiler şirketlerin potansiyel çalışanları için sürekli olarak çoşku, problem çözümünde yeni yaklaşımlar uygulayabilme becerisi, profesyonel büyümeye istekli olma özelliklerini aradıklarını vurgulamaktadır. Problem çözümünde takım çalışması içinde becerilerini uygulamak için heyecanlı ve istekli olanlar tercih edilirler. Kişinin eğitim geçmişi istenen pozisyon için uygun olmasa bile, ki bu sıklıkla böyledir, öğrenmeye istekli ve çoskulu olması başvuran kişinin işe alınmasını belirleyebilir. Biyoteknoloji şirketleri fark yaratmak isteyen insanları ararlar, eğer bilimi kullanarak insan sağlığının geliştirilmesine yardımcı olmak arzusuyla yanıp tutuşuyorsanız tıbbi biyoteknolojide sizin için bir kariyer bulunabilir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Moleküler biyoloji teknikleri fetus veya erişkin insanda genetik hastalık durumlarını belirlemek için nasıl kullanılabilir? İki örnek veriniz.
2. Gen terapisi nedir? Ex vivo ve in vivo gen terapisi arasındaki farklılıkları açıklayın ve her bir yaklaşımla tedavi edilen insan genetik hastalıklarına birer örnek veriniz. Terapötik genlerin hücrelere nasıl aktarılacağı ile ilgili iki örnek veriniz ve gen terapisi ile insan genetik hastalıklarını tedavi etmek için etkili bir tekniği uygularken bilim insanlarının karşılaştıkları zorlukları tartışınız.
3. Embriyonik kök hücre, yetişkin kök hücre, amniyon kök hücre, indüklenmiş pluripotent kök hücre gibi farklı tip kök hücreleri karşılaştırınız. Her bir kök hücrenin nereden ve nasıl izole edildiğini belirtiniz. Hastalıkların tedavisinde kök hücrelerin kullanımı ile ilgili iki örnek veriniz.
4. Terapötik ve reprodüktif klonlamayı karşılaştırınız, her bir teknolojinin lehte ve aleyhte olduğu durumları listeleyiniz.
5. Farmakogenomiği tanımlayınız, gelecekte sağlık hizmetlerini nasıl değiştireceğini açıklayınız.
6. İnsan Genom Projesinin tıbbi biyoteknolojideki ilerlemelere nasıl önderlik ettiğini kısaca açıklayınız.
7. Clinical Trials.gov sitesini inceleyiniz ve MAb tedavisi ile ilgili mevcut klinik çalışmaları araştırınız. American Society for Gene Therapy sitesini ziyaret ediniz ve günümüzde gen terapisi ile ilgili yapılmakta olan çalışmaları araştırınız.
8. Embriyonik kök hücre araştırmalarında federal fon kullanımı çok tartışmalıdır. Bu araştırmalarda vergi için ödenen paralar kullanılmalı mıdır? Federal fonlar tarafından desteklenen araştırmalarda kısıtlama olmalı mıdır? ABD Temsilciler Meclisindeki eyalet temsilcilerinizin embriyonik kök hücre araştırmaları için federal fon kullanımını destekleyip desteklemediklerini biliyor musunuz? (bakınız http://www.house.gov/internet)
9. Gen-susturma tekniklerine iki örnek veriniz ve gen terapisinde nasıl kullanıldıklarını açıklayınız?
10. Rejeneratif tıp nedir? Doku mühendisliğinin hastalık tedavisinde kullanımı ile ilgili potansiyel yollar nelerdir?
11. SNP nedir? SNP'ler insan genetik hastalıklarının tanısında nasıl kullanılabilir?
12. Tek gen hatalarının tanısında hangi genetik testler kullanılmaktadır? Kromozom sayısı ve yapısındaki anormallikler gibi kromozom hatalarını saptamak için hangi teknikleri kullanmalısınız?

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

12

Biyoteknoloji Mevzuatı

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Servisi (APHIS) ve ABD Tarım Bakanlığı'nın uyguladığı izin süreçlerini, biyomühendislikle geliştirilen bitkilerin kazara çevreye salımını önleyecek tedbirlerle birlikte tanımlayabilmelisiniz.
- APHIS tüzüğüne göre bir bitkinin "bildirim" için elverişli olmasını sağlayacak altı kriteri sıralayabilmelisiniz.
- Çevre Koruma Dairesinin (EPA) biyoteknoloji ürünlerini denetlemedeki rolünü tanımlayabilmelisiniz.
- Biyoteknolojiyle üretilen gıda ve gıda katkılarının denetlenmesinde ABD Gıda ve İlaç Dairesi'nin (FDA) rolünü tanımlayabilmelisiniz.
- Ecza ürünlerinin, aşamalı testleri de içerecek şekilde, denetlenmesinde FDA'nın rolünü tanımlayabilmelisiniz.
- Gereken durumlarda denetleyici kurumların nasıl hızlı bir şekilde karşılık verdiklerini örneklerle gösterebilmelisiniz.
- Bilimde patentlerin durumu ve yeni buluşları nasıl teşvik ettiklerini tanımlayabilmelisiniz.
- DNA dizilerinin patentlenebilir olduğu durumları tanımlayabilmelisiniz.



FDA İnspektörü iş başında. FDA, biyoteknoloji ürünlerinin güvenliğinin denetlenmesinden sorumlu devlet kurumlarından biridir.

Yanlış etiketlenmiş bir ilaç veya bozulmuş gıda ölüme neden olabilir. Ecza ve gıda devlet tarafından denetlenir. Bu denetlemelerin biyoteknoloji endüstrisi üzerinde, özellikle ABD'de, büyük etkisi vardır. Yeni bir ilacın etkinliği ve güvenliğinin test edilmesi yıllar alabilir; bu geçen zamanda ilacın kurtarabileceği hayatlar kaybedilebilir de. Eğer bir yiyeceğin çöpe atılması gerekiyorsa bunun bir maliyeti vardır, tıpkı toksik etkisi olabilecek herbisitler kullanılmadığında tarımsal üretimin düşmesi gibi. Gerekli güvenliği sağlamak ve maliyeti azaltmak arasında açıkça görülen bir çelişki vardır. Tıp ve tarımdaki yeni ve yaratıcı biyoteknoloji ürünleri vaat ettikleri yararlar yanında bazı riskler de taşırlar. ABD eski başkanlarından Bill Clinton ve İngiltere eski başbakanı Tony Blair, İnsan Genom Projesi'nde çalışan araştırıcıların elde ettikleri bilgilerin (diğer konularla birlikte) paylaşılacağı ve bunun sonucunda gen dizilerinin patentlenmesine sınırlama getirileceği sözünü verdiklerinde, biyoteknoloji endüstrisi panik yaşadı. Gen dizilerinin patentlenmesini ahlaki olarak kabul edilmez bulan birçok kişi bu sınırlama kararını alkışladı. Bu tartışmanın odağı, bir şeyin "patentlenebilir" olmasının ne anlama geldiğidir. Koruma ve patentler hakkında bu bölümde okuduklarınızdan sonra, sizin bu konudaki düşünceleriniz de değişebilir.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Biyoteknoloji öncülerinden Craig Venter (ilk insan genom dizileme çalışmasının ana katılımcısı), endüstrideki yapay genomlarla ilgili biyoetik düzenlemelerin oluşturulmasında başrolü oynamıştır. 1970'lerde ilk gen transferi deneyleri yapıldığında toplumda oluşan "genetik canavarlar" yaratılacağı korkusu, koruyucu önlemler alınıncaya kadar bu tür deneylerin gönüllü olarak ertelenmesiyle sonuçlandı. Bu koruyucu önlemleri Venter 1990'larda, kendi ekibi yapay bir genomu bir bakteri genomuna tranfer etmeden önce, resmen istedi. Venter ve diğer biyoteknologlar bu tür koruyucu önlemler olmadan, toplumun genetik mühendisliğine duyduğu korku nedeniyle, kendi deneylerinin de geciktirilebileceğini biliyorlardı. Venter'in koruyucu önlem ve düzenlemeleri getirme konusundaki bu çabaları nedeniyledir ki, ilk deneylerinin bulguları biyoteknolojide gelecek için kritik çalışmalarda temel olarak kullanılıyor. Örneğin; CO_2'ten yeni hidrokarbonlar üretebilecek ve rafinerilerde kullanılabilecek tasarlanmış bir suyosunu, aşı üretiminin hızlandırılması, kirli suların temizlenmesi ve yeni gıda kimyasalları. Şüphesiz bu deneyler yeni koruma ve kanunları da beraberinde getirecektir; ancak koruyucu önlemlerle bağdaşık deneysel çalışmaların altyapısı 1970'lerde oluşturulmuştur.

12.1 Yasal Çerçeve

Amerika'da ondokuzuncu yüzyılda satıcılar "patentli" ecza ürünlerini serbestçe tanıtabiliyorlardı. Bu kişilerin temel kaygıları çoğunlukla yerel yetkililere yakalanmadan, satıştan elde ettikleri kazançla ortadan kaybolmaktı. Çünkü ilaç diye sattıkları ürünlerin birçoğu sahteydi. Aynı zamanda, birçok büyük şirket de çevreye zehir saçmaktaydı – çoğunlukla yaptıklarının uzun-vadeli sonuçları hakkında hiçbir fikirleri olmadan. En sonunda devlet halk sağlığını tehdit eden, küçük veya büyük işletmelerin yol açtığı bu uygulamaları daha fazla göz ardı edemedi; koruma kurumları oluşturdu. Bu yeni devlet kurumları gıda ve ilaç güvenliğini denetlemek ve çevreyi kirleticilerden korumakla görevlendirildi. Bu kurumlar bugün aynı endüstriyi denetlemektedirler.

Biyoteknoloji bir araştırma alanı olarak ortaya çıktığında, endüstriyi denetleyen bir düzenleyici sistem zaten vardı. 1974 Asilomar Konferansı, araştırıcıların gönüllü olarak bu alanda kuralları belirlemek üzere gerçekleştirdikleri bir toplantı oldu. Çünkü gen transferi çalışmaları yapan araştırıcılar koruyucu önlemler olmadan hastalık genlerinin yayılma olasılığı olduğunu görmüşlerdi. ABD-Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) biyoteknoloji üzerinde denetleme sorumluluğu üstlenen ilk devlet kurumu oldu. Diğer görevlerine ek olarak, NIH rekombinant DNA teknikleri için araştırma kılavuzları da yayınladı. NIH'in Rekombinant DNA Danışma Kurulu'nun, laboratuvarda rekombinant DNA ve rekombinant canlılarla çalışma kurallarını belirlediğini de anımsayalım (Bölüm 3). NIH tüm DNA çalışmalarının inceleme ve denetimlerini 1984'e kadar sürdürdü. Bu aşamaya gelindiğinde, farklı bir denetleme sistemine gerek olduğu anlaşıldı.

1986'da hükümet, biyoteknoloji çalışmalarında NIH, USDA ve EPA'nın ortak sorumluluğunu duyuran "Biyoteknolojinin Denetlenmesi için Koordine Sistem" adlı raporu yayınladı. Burada, modern biyoteknolojiyi kullanarak geliştirilen ürünlerin değerlendirilmesinde kullanılacak ulusal sistem tanıtılmaktadır. Bu önemli rapor biyoteknoloji ürünlerinin geleneksel ürünlerle aynı denetleme sistemine tabi olmalarını önermekteydi. Örneğin, biyomühendislikle geliştirilen bitkiler diğer bitkileri denetleyen kurumlarca incelenecek; biyomühendisliğin geliştirdiği ilaçlar diğer bütün ilaçlara uygulanan kurallara göre işlem görecektir. Bu rapor aslında biyoteknoloji ürünlerinin özünde geleneksel ürünlerden farklı yasal veya bilimsel sorunlar doğurmayacağını ileri sürmekteydi. Rapordaki yaklaşım ABD'de biyoteknoloji düzenlemelerindeki anlayışın temelini oluşturur. Sistem, belli bir ürün grubundaki sorunları gidermek için geliştirilmiş sağlık ve güvenlik yasalarına dayanmaktadır.

ABD'de biyoteknoloji ürünlerinin birçoğunun denetlenmesinden sorumlu üç kurum vardır: Tarım Bakanlığı (USDA), Çevre Koruma Dairesi (EPA), Gıda ve İlaç Dairesi (FDA). USDA ele alınan canlının yetiştirilmesinin güvenli olmasını sağlama alır, EPA çevre

TABLO 12.1 ABD'DEKİ BAŞLICA DEVLET DENETLEME KURUMLARI

Biyoteknoloji Ürünleri Denetleme Kurumu	Denetlenen Ürün
Tarım Bakanlığı	Bitkiler, bitki zararlıları (mikroorganizmalar dahil), hayvan aşıları
Çevre Koruma Dairesi	Bitki koruma ilaçları, diğer toksit maddeler, mikroorganizmalar, toksik madde üreten hayvanlar
Gıda ve İlaç Dairesi	Gıda, yem, gıda katkıları, insan ve hayvan ilaçları, insan aşıları, tıbbi cihazlar, transgenik hayvanlar, kozmetik

Devlet Kurumlarına Biyoteknolojiyi Denetleme Yetkisi Veren Temel Yasalar

Yasa	Kurum
Bitki Koruma Yasası	USDA
Et Denetim Yasası	USDA
Kanatlı Ürünleri Denetim Yasası	USDA
Yumurta Ürünleri Denetim Yasası	USDA
Virüs Serum Toksin Yasası	USDA
Federal İnsektisit, Fungusit ve Rodentisit Yasası	EPA
Toksik Maddeler Kontrol Yasası	EPA
Gıda, İlaç ve Kozmetik Yasası	FDA, EPA
Kamu Sağlık Hizmetleri Yasası	FDA
Besin Desteği Sağlık ve Eğitim Yasası	FDA
Ulusal Çevre Koruma Yasası	USDA, EPA, FDA

Kaynak: www.fda.gov.

için güvenli olmasını garanti eder ve FDA tüketilmesinin güvenli olup olmayacağını belirler (bakınız Tablo 12.1). Bu üç kurum amaçlarına ulaşmada birlikte hareket ederler ve genellikle tek bir biyoteknoloji ürününün gözetim ve denetlenmesinde her üçü de yer alır. Her ne kadar bürokrasinin yavaş işlediği söylense de, hem geleneksel hem de biyoteknoloji ürünlerinin güvenli olduklarından emin olmak için, bu düzenleme süreçlerinin sürekli düzeltildiğini bilmemiz önemlidir.

12.2 ABD Tarım Bakanlığı

1862'de kurulan USDA, bitki zararlılarının denetlenmesi, bitkiler ve veterinerlikle ilgili biyolojik ürünler gibi tarımdaki gelişme ve yürütmeyle ilgili birçok faaliyet göstermektedir. **Biyolojik ürün,** genel bir tanımla, canlılardan veya onların ürettiklerinden hazırlanan herhangi bir tıbbi preparata verilen isimdir. Örneğin insülin ve aşılar.

Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Hizmetleri

Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Servisi (APHIS) USDA'nın ABD tarımını zararlı ve hastalıklardan korumakla sorumlu bir birimidir. Genetiği değiştirilmiş bitkiler istilacı olarak değerlendirildiklerinden, Bitki Koruma Yasası uyarınca bitki zararlısı olarak değerlendirilir. Genetiği değiştirilmiş bitkilerin geliştirilmesi ve tarla denemeleri için APHIS'ten izin almak gerekir. Eğer deneyleri yapılacak canlının varolan tarım sistemi için bir tehdit olasılığı varsa, kurum koruma önlemlerinin alınmasını sağlar.

APHIS Denetleme Süreci

Genetik mühendisliğiyle yeni bir bitki geliştirildiğinde APHIS hastalıklara dayanıklılık, kurağa tolerans ve üreme oranları gibi konuların gözlendiği çok yıllık **tarla denemelerini** şart koşar. Kazara gerçekleşebilecek yabancı tozlanmaların olmaması için gerekli önlemleri almadan, APHIS tarla denemeleri için yapılan başvuruları kabul etmez. Örneğin, transgenik mısır deneme tarlası mısır yetiştirilen diğer tarlalardan en az

1 mil (1.6 km) uzakta olmalıdır. Deneme tarlasının etrafı 25 ft (7.62 m) genişlikte bir boş alanla (sürülmüş, ekilmemiş) çevrili olmalıdır. Bazı durumlarda, polen toplamak için mısırın tepe püskülleri poşetlenir (**Şekil 12.1**'de görüldüğü gibi) ve daha sonra istenmeyen polen kaçışlarını önlemek için tepe püskülleri kesilip uzaklaştırılır. Deneme alanındaki bitkiler hiçbir şekilde bu alandan kaçmamalı, yani deneme alanındaki kendi gelen bitkiler koparılmalı, hiçbir bitki parçalanma amacı dışında deneme tarlası dışına taşınmamalıdır. Deneme tarlası hasadı izleyen yılda nadasa bırakılmalıdır. APHIS görevlileri deneme alanında tüm yükümlülüklerin yerine getirildiğinden emin olmak için tarlayı ekim öncesinde, yetiştirme döneminde ve deneme sona erdiğinde kontrol ederler.

Bu korumaya örnek olarak 2002 yılındaki bir olay verilebilir: Iowa ve Nebraska'dan iki üreticinin belirli bir tarlada yetiştirdikleri bütün mısırı imha etmeleri istendi. Çünkü çiftçiler bu tarlada bir önceki yıl protein ekstresi (insan antikoru) için transgenik soya yetiştirmişler ve ertesi yıl "kendi gelen" birkaç soya bitkisini (USDA'nin gerekli gördüğü biçimde) uzaklaştırmadıkları için, ürettikleri mısır transgenik soya ile karışık bulundu. Kurallara aykırı bu davranışları için her birine ayrıca 250 000 $ ceza verildi. Bu dava kontrolörlerin izlediğini ve yasaların uygulandığını örnekle göstermektedir.

APHIS onay süreci

Elbette esas amaç pazarlanabilir bir ürün hasat etmektir. Bu süreçteki ilk adım APHIS'e **kuralsız durum** dilekçesi vermek olacaktır. Bu durumdaki genetiği değiştirilmiş bitkiler geleneksel bitkilerle aynı koşullarda izlenir. APHIS bu bitkinin geleneksel bitkiler gibi güvenle yetiştirilip yetiştirilmeyeceğine karar vermeden önce, tarla denemelerini, bilimsel literatürü ve ilgili her türlü kaydı inceler.

Kuralsızlık dilekçesini değerlendirirken APHIS üç ana alanı göz önüne alır:

1. *Bitkilere zarar verme durumu.* APHIS diğer bitkilere olası tehdidi açısından, bu bitkinin biyolojisini inceler. Bu durum "zararlı bitki" riskleri olarak bilinir. Kurum, aktarılan genetik materyalin yeni bir bitki hastalığına yol açma olasılığını araştırır. Ayrıca yerel bitkilerle tozlaşması sonucu "süper yabancıotlar "ın ortaya çıkma olasılığını da değerlendirir.
2. *Diğer canlılar için riskleri.* Kurum, bitkiden beslenen veya polenlerini taşıyan yaban hayatı ve yararlı böceklere getirebileceği riskleri araştırır.
3. *Yabani ot durumu.* Son olarak kurum, yeni bitkinin yetiştirileceği bölgede istenmeyen ve istilacı bir bitki – yani yabancıot – olma olasılığını değerlendirir. Bitkinin üreme gücü özellikle dikkate alınır. Kolaylıkla tohum oluşturabilen, tohumlarını yaymak için çok elverişli bir mekanizmaya sahip olan, soğuğa ve kurağa dayanıklı olan bir bitki gelecekte problem yaratabilir. Örneğin, siğilotu eğer biyoteknoloji ürünü bir bitki olarak sunulursa, üreyip yayılma gücünün yüksekliği nedeniyle kabul edilmeyecektir.



ŞEKİL 12.1 APHIS Kuralları Uygulamada USDA Hayvan ve Bitki Sağlığı Kontrol Servisi kuralları uyarınca, yakın tarlalarda istenmeyen tozlaşmaları önlemek için tepe püskülleri poşetlenerek yetiştirilen mısır.

APHIS bildirim süreci

Bazı tarımsal ürünlerin hızlandırılmış olarak piyasaya sürümünde kullanılan diğer bir alternatif de **bildirim** olarak adlandırılan sistemdir. Bildirimin bir seçenek olarak değerlendirilmesi için altı ölçütün karşılanması gerekir.

1. Yeni tarımsal ürünün sınırlı sayıdaki uygun bitki türünden biri olması gerekir. Bu bitkilerin – mısır, pamuk, patates, soya, tütün ve domates – tamamı daha önceki denemelerde yer almış ve özellikleri iyi bilinmektedir.
2. Bitkiye aktarılan yeni genetik materyal bitkinin hücre çekirdeğinde olmalı; plazmid veya virüs

vektörlerinin üzerinde taşınabilir konumda bulunmamalıdır. (Çekirdek genleri genetiği değiştirilen bitkide kalma eğilimi gösterirler. Bitki genetik mühendisliğinde kullanılan vektörler konusundaki bilgilerinizi tazelemek için Bölüm 3'e bakınız.)

3. Aktarılan genlerin fonksiyonları bilinmeli ve bunların sentezlediği protein *kesinlikle* bir hastalığa yol açmamalıdır.
4. Eğer yeni tarımsal ürün gıda olarak kullanılacaksa, aktarılan genler kesinlikle toksin, bulaşıcı hastalık veya tıbbi olarak kullanılan bir madde üretimine yol açmamalıdır.
5. Eğer aktarılan gen bir bitki virüsünden alınmışsa, yeni bir virüs ortaya çıkarma potansiyeli olmamalıdır.
6. Aktarılan genetik materyal insan veya hayvan virüslerinden elde edilmemelidir (insanlar için yeni bir hastalığın yayılmasını önlemek amacıyla).

Eğer genetiği değiştirilmiş bir bitki bu altı ölçütün tamamını karşılarsa, APHIS tarla denemelerine 30 gün içinde onay verecektir. Bildirime tabi olan bitki için de, bitkiyi geliştirenler onay sürecinde gerekli diğer koşulları karşılamakla yükümlüdürler. Yeni bitkinin kazara yayılmasını önlemek için aynı koruyucu önlemler alınmak ve denemenin detaylı kayıtları tutulmak zorundadır.

Yeni bitkinin güvenli olduğu belirlendikten sonra, APHIS onayına veya gözlemine gerek olmadan yetiştirici bunu üretime alabilir, testlerde veya melezlemelerde kullanabilir. Daha sonra yeni biyoteknoloji ürünü pazara sunulabilir. Ancak işlemlerin tamamı bunlarla bitmez, EPA'nın da çevreye salınan yeni ürünleri denetlemesi söz konusudur.

12.3 Çevre Koruma Dairesi

1970'de kurulan EPA, nesli tükenmekte olan türlerin korunmasından araç egzoz gazı emisyon standartlarına kadar değişen aralıkta sorumluluk üstlenir. Diğer bir ana uğraşı pestisit (zararlılarla mücadele ilaçları) ve herbisitlerin (yabancıotlarla mücadele ilaçları) denetlenmesidir. Bu işin doğal bir uzantısı olarak, zararlılara karşı etkili protein sentezleyecek şekilde genetiği değiştirilmiş bitkilerin denetlenmesini de üstlenmiştir (Bölüm 6).

EPA ayrıca herbisit toleransına sahip bitkilerin kullanılmasını da denetler (**Şekil 12.2**). Böyle bir durumda EPA sadece bitkiyle değil, herbisite tolerant bitkinin yetiştirileceği tarlada kullanılacak herbisitle de ilgilenir. Bitkideki ilaç kalıntısı özel bir öneme sahiptir. EPA kalıntı düzeylerini izleyerek bitkinin insan tüketimi için güvenli olmasını sağlamaya çalışır. Bu durumda hem USDA hem de EPA onayına gerek vardır.



ŞEKİL 12.2 "Buzsuz (Ice-Minus)" Spreycilerini EPA Koruyor Resimde görülen "Astronot giysileri" bilinmeyen biyotehlikelerden korunmak için kullanılmaktadır. Kırağı zararından korumak için çileklere buzsuz bakteri spreyi uygulayanların giydiği gibi (buzsuz bakterinin tam tanımı Bölüm 5'te yapılmaktadır).

Deneysel Kullanım İzinleri

Zararlılara karşı protein üreten bir bitki geliştirecekler in ilk olarak EPA ile bağlantı kurmaları gerekir. Yaklaşık 40 da ve üzeri kara veya 4 da ve üzeri su alan denemesi EPA'dan **deneysel kullanım izni (EUP)** almadan kurulamaz. Deneysel kullanım izinleri düzenli kayıt tutmayı gerekli kılar. Çünkü bitkinin pestisit (bitki koruma ilacı) olarak ruhsat alabilmesi için, ABD pestisit yasasında tanımlanan "zararlı yan etkilerinin" olmadığının kanıtlanması gerekir. Diğer bir deyişle, tarlada kullanılan kimyasal pestisitlerin taşıdıkları standardı bu bitkilerin de karşılaması gerekir.

Serbestleştirme ve Ticarileştirme

Pazar için onay almanın bir sonraki aşaması ticarileştirmedir. Ancak, herhangi bir şeyin satış için elverişli duruma gelmesinden önce, EPA deneysel aşamada topladığı verileri değerlendirmek için bir yıllık bir süreç harcar. Bu değerlendirme kaygı duyulan dört genel alan üzerinde yoğunlaşır. EPA'nın ilgilendiği ilk alan genin kaynağı, nasıl ifade edildiği ve üretilen pestisit-proteinin doğasıdır. İkinci olarak, genetiği değiştirilen bitkinin sağlık üzerine etkileri derinlemesine araştırılır. Araştırıcılar proteinin canlılar üzerindeki etkisini ölçmek için hayvan modellerinden yararlanır; proteinin nasıl sindirildiği, alerjiye neden olup olmadığı gibi etkilere bakarlar. Üçüncü olarak EPA, aynı zamanda tüm çevreyi korumakla görevli olduğundan, pestisit-proteinin "çevredeki akıbeti"ni de araştırmak zorundadır. Buradaki kaygılardan biri, pestisidin doğada ayrışma hızı ve toprak veya suda kalıntı bırakıp bırakmayacağıdır. Diğer bir konu, transgenik bitkinin yabancıotlarla tozlaşması sonucu pestisit-protei-

nin doğaya kaçışı ve süper yabancıotlar yaratmasıdır. Dördüncüsü, EPA hedef olmayan türlere olabilecek etkilerle de ilgilenir. Bunlar arılar ve uğur böcekleri gibi yararlı böcekler, balık, kuş ve kemirgenler gibi diğer hayvanlar olabilir (Bölüm 6).

USDA gibi EPA da gereklilikleri karşılayan herhangi bir bitki için kuralsız durum onayı verebilir. Kuralsız durum onayı olan genetiği değiştirilmiş bitki EPA'da tescillidir ve diğer herhangi bir bitki gibi dağıtımı veya satışı yapılabilir. Ancak bu aşamada bile EPA'nın görevi sona ermez. Kurumun yeni bilgilere karşılık verecek şekilde hazırlıklı olması gerekir. Gerektiğinde mevcut izinlerde değişiklik yapma veya kaldırma yetkisine sahiptir (Bölüm 6).

ABD'deki bürokratik düzenlemelerin işleyişi ortaya çıkan toplumsal kaygılara duyarlı biçimde ve gerekli önlemleri alarak sürdürülür. Belki de en önemlisi, düzenleyici kurumların kararlarını bilimsel kanıtlara dayalı olarak vermeleridir. Gıda ve ilaçların piyasaya sürülmesini ilgilendiren konularda toplumu koruyan düzenlemeler birbirine benzemektedir.

12.4 ABD Gıda ve İlaç Dairesi (FDA)

FDA gıdaların ve ilaçların güvenliğini ve etkinliğini sağlamakla yükümlüdür. Gıda ve ilaç ürünleri biyoteknolojideki gelişmelerin en hareketli bölümü olduğundan, FDA çalışanları endüstrideki yeni gelişmeleri çok yakından izlemektedirler. FDA, biyoteknoloji ürünlerinin geleneksel eşdeğerleri kadar güvenli olduklarından emin olmak durumundadır.

Gıda ve Gıda Katkı Maddeleri

Yeni bir gıda ürünü veya katkı maddesi geliştirildiğinde FDA geliştirenlere (şirketler, üniversite araştırıcıları, vb.) danışmanlık yapar ve testlemeler hakkında tavsiyelerde bulunur. Çalışmalar yeni ürünün beklenmeyen, istenmeyen özellikleri olup olmadığı üzerine yoğunlaşır. Transgenin yeni üründe ifade ettiği protein, gerçekte doğal olarak ortaya çıkan proteinle aynı olup olmadığı bakımından incelenir. Çünkü birçok temel gıda maddesinin – süt, kabuklu deniz ürünleri, yer fıstığı ve yumurta gibi – alerji tetikleyicileri içerdiği bilinmektedir. Bu kaynaklardan elde edilen proteinlerin potansiyel alerjen olarak değerlendirilip, uygun şekilde etiketlenmeleri gerekir. Halen pazarda bulunan biyoteknoloji ürünlerinin geliştirilmesinde çalışan şirketlerin FDA'dan danışmanlık almalarına gerek yoktur. Buna rağmen ABD'deki birçok şirket pazara yeni bir gıda ürünü sunmadan önce FDA'nın bu konudaki uzmanlığından yararlanır. Çünkü geliştirilen gıda veya katkının öngörülmeyen bir tehlikesi yoksa, FDA bu ürüne **genellikle güvenli olarak bilinir (GGOB)** statüsü verebilir ve böyle bir ürünün pazara çıktığında kabul edilmesi daha kolay olur.

GGOB statüsündeki ürüne örnek olarak, ABD'de üretilen peynirlerin % 80'inde kullanılan genetiği değiştirilmiş kimosin verilebilir (Bölüm 4). FDA tarafından güvenli varsayılan bir ürün bazen bu duruma rağmen pazarda kolay kabul görmez. Örnek olarak süt verimini artırmak için ineklere enjekte edilen sığır büyüme hormonu (bovin somatotropin-BST) verilebilir. Bu hormon ineklerde doğal olarak bulunsa da, tüketiciler verilen maddenin aldıkları sütün içinde bulunacağından endişelenmektedir. Uygulamanın inekler veya bu sütleri tüketen insanlar üzerinde negatif etkilerinin olup olmadığı konusundaki tartışmalar devam etmektedir. FDA'nın bu konuda 8 yıl süren çalışmalarında BST'nin zararlı olduğunu gösteren herhangi bir veri bulunmamıştır. Buna rağmen, eğer gelecekte BST güvenli görülmezse, sorumluluk ve kullanımını yasaklama yetkisi FDA'nmdır.

FDA İlaç Onay Süreci

FDA yeni ecza ürünlerinin denetlenmesinden de sorumludur. Biyoteknolojiyle geliştirilen ilaçların da diğer ilaçlar için gerekli aynı zor standartları karşılaması gerekir. Kistik fibroz tedavisi için yeni bir biyoteknolojik ürünün hayvan deneylerinde ümitvar sonuçlar verdiğini düşünün. Bunu hastalarda kullanmak için atılacak ilk adım, FDA ile bağlantıya geçerek, **İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi**'ne **araştırılan yeni ilaç (AYİ) başvurusu** yapmaktır. FDA bu ürünün insanlarda denenmesine onay vermeden önce, daha önce yapılan deneyleri, maddenin niteliğini ve yapılabilecek ilave deneyleri değerlendirir. Biyolojik ürünler hakkında etkin bir denetleyici inceleme yapmak için İlaç Değerlendirme ve Araştırma Merkezi görev alanıyla ilişkili araştırmalar yürütür. Bu araştırmalar temel biyolojik işlemler hakkındaki bilgilere büyük katkı sunar ve denetlemelerle ilgili incelemelerin sağlam bilimsel temellere dayanmasını sağlar.

İlaçların faz testi

FDA eğer yeni ilacın bir sonraki deneme düzeyine geçebileceği, belirgin bir riski olmadığı ve bilimsel yöntemler kullanılarak test edileceği konusunda ikna olursa, ona AYİ statüsü verir. Bir sonraki aşama ise gıdalara uygulanandan daha katı kuralları olan faz testleridir. İlk olarak faz I'de (güvenlik) 20 ile 80 arası gönüllüden oluşan bir grup, beklenmeyen yan etkilerin olup olmadığını ve dozunu belirlemek için, ilacı kullanır. Faz II (yararlılık), yeni ilacın iyileştirmeyi vaat ettiği 100 ile 300 hasta üzerinde test edildiği evredir. Eğer zararlı bir yan etkisi görülmemiş ve bazı pozitif etkileri varsa, faydasının diğer ilaçlarla karşılaştırmalı olarak gözleneceği faz III başlar. Bu fazda ilaç 1 000-

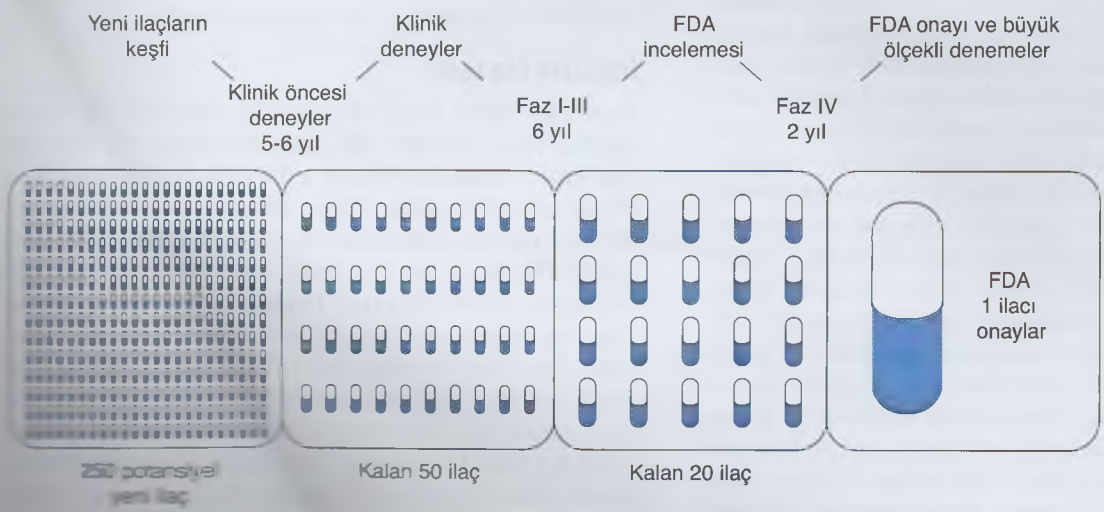
3 000 hasta üzerinde çift kör denemelerde (sonuçları etkilememesi açısından, ne hasta ne de klinik hekimi, kime plasebo kime gerçek ilaç verildiğini bilmez) kullanılır ve 3½ yıl sürer. İlaçlar genellikle faz III'te yararları ve uzun dönem güvenli kullanımlarından emin olunduktan sonra pazara sürülürler. İlaçların çoğunluğu bu aşamaya kadar gelemez. Faz I'deki ilaçların sadece % 20'si faz III'e kadar gelir ve FDA'dan **yeni ilaç izni (Yİİ)** alır. ABD'de hiçbir tıbbi ilaç FDA'dan Yİİ almadan pazarlanamaz. Hatta yeni ilaç pazara sunulduktan sonra da FDA tarafından süresiz izlenmeye (faz IV) devam edilir. FDA'nın onay verdiği yeni ilaçların sayısı 1996'dan bugüne yarıya düşmüş, 2005 yılında sadece 20 ilaç onay almıştır. Faz III deneyleri kliniksel geliştirme maliyetinin % 70'ini oluşturur; buna rağmen bileşiklerin % 40'ı bu son aşamada çoğunlukla plaseboya üstünlük gösteremedikleri için kaybederler (bakınız **Şekil 12.3**). Viral tedavi, kan ürünü, aşı veya hayvanlardan elde edilen bir protein gibi biyolojik ürün için onay almak isteyen bir biyoteknoloji şirketi, önce Yİİ benzeri bir **Biyolojik Lisans Sözleşmesi (BLS)** için başvuracaktır. Onay sürecinin bir parçası olarak FDA ilacın profesyonel etiketi hakkındaki bilgileri değerlendirir ve üretimin yapılacağı tesisleri kontrol eder.

Faz testi istisnaları

Bu test uygulamasının önemli bir istisnası vardır. FDA biyolojik, kimyasal ve nükleer terörizme karşı olan ilaç ve aşıların onaylarının faz II ve faz III süreçlerini beklemeden alınmasına izin verir. Aynı durum FDA'nın Yetim Ürünler Geliştirme Birimi (Office of Orphan Products Development-OODA) tarafından "yetim ilaç-orphan drugs" olarak tanımlanan ilaçlar için de geçerlidir. Bunlar kısıtlı kullanıcısı olan, fakat nadir hastalıkları iyileştiren botulizm immun globulin (BIG) - botulizm zehirlenmesini iyileştiren antikor - gibi ilaçlardır. Tedavinin değerini ölçmek için insanları bilerek çiçek hastalığına veya sinir gazına maruz bırakmak etik olmayacağından, bu tür tedaviler için kullanılacak bir hasta topluluğu da yoktur. OODA Yetim İlaç Yasası (Orphan Drug Act-ODA) uyarınca gerekli malzemeyi sağlayarak, bu nadir hastalıklar için ürün geliştirecek sponsorlara teşvik sağlar. Nadir hastalıklar için 1983'den bugüne 200'den fazla ilaç ve biyolojik ürünün pazara sunulmasını sağlayan ODA oldukça başarılı bir düzenlemedir. Hâlbuki 1983'den önce bu şekilde ancak 10 ürün pazara çıkabilmiştir. Bu şekildeki yeni ilaçlar faz I testine yine de alınır. Çünkü sürecin bu kısmı sadece ilaca maruz kalmayı içerir, onun tedavi edeceği tehlikeli maddeye değil; böylece FDA ilacın kendisinin istenmeyen yan etkilere neden olmayacağını belirleyebilir. Örneğin FDA şarbon tedavisinde kullanılan bir antibiyotik olan Cipro (ciprofloxacin) adlı ilacın onayını bu şekilde hızlandırmıştır.

İyi Laboratuvar (İLU), Klinik (İKU) ve İmalat (İİU) Uygulamalarının Geliştirilmesi

FDA'nın 1975'te birkaç eczacılık test laboratuvarında yaptığı kontroller, diğer problemler yanında; kötü tasarlanmış, dikkatsizce yürütülen deneyler, hatalı kayıt tutma ve bakımsız hayvan tesisleri olduğunu ortaya çıkardı. Bu eksiklikler, ecza ürünlerinin hayvan deneylerinin yapılmasına düzen getirmek için FDA'nın **iyi laboratuvar uygulaması (İLU)** ve **iyi imalat uygulamasını (İİU)** başlatmasına neden oldu. İLU gereğince, test laboratuvarları ve imalatçıların yazılı protokollere (standart işlem protokolleri veya SOPs-



ŞEKİL 12.3 İlaç Onay Hattı Faz I'e giren ilaçların sadece % 20'si faz III'e kadar gelecek ve bunların da % 40'ı plaseboya üstünlük gösteremedikleri için kaybedeceklerdir.

standard operation procedures) uymaları, uygun tesislere sahip olmaları, hayvan bakımını doğru yapmaları, kayıtları düzgün tutmaları ve geçerli toksisite testleri yapmaları gerekir. Bu standartların benzer bir seti olan **iyi klinik uygulamaları (İKU)** ise araştırmalara katılan insanların haklarıyla güvenliklerini korur ve klinik deneylerin bilimsel kalitesini garantiye alır.

Hızlı İlaç Onayına Karşı Halk Güvenliği

Biyoteknoloji şirketleri bir biyolojik ürünü pazara getirene kadar yaklaşık 1.2 milyar $ harcarlar ve pazar için FDA onayını almak 8-10 yıl sürer. Biyoteknoloji şirketleri mali kaygılar nedeniyle bu süreci hızlandırmak isteyebilirler; ancak FDA yeterli test yapıldığından emin olmak için süreci mevcut hızında tutmayı tercih edecektir. Toplumun ihtiyaç duyduğu ürünleri (ölümcül hastalıkların iyileştirilmesinde gen terapisi gibi) sağlarken aynı zamanda FDA gibi kurumların kabul edeceği düzeyde güvenliği sürdürmek arasında bir orta yol bulmak gerekebilir.

Örneğin, insan büyüme hormonunun halen beş üreticisi bulunmakta; her şirketin FDA'dan ayrı ayrı onay alması ve kendi faz testlerini yapmaları gerekmektedir. ABD Farmakop Konvensiyonu (USP) bu beş şirketin testlerin ilk aşamalarını paylaşarak yürütecekleri bir alternatif yöntem önermektedir. Buna göre bu şirketlerin her birinin test süreci hızlanacak ve insan güvenlik testleri aşamasına biraz daha erken varılmış olacaktır. Ecza şirketlerinin bu bakış açısına göre; yöntemin uygulanmasındaki bu değişiklik, standart yöntemin getirdiği güvenlikten herhangi bir taviz vermeden, onay bekleyen başvuruların birikimini önleyecektir. Bu değişikliğin onaylanıp onaylanmayacağını ise zaman gösterecek.

Hızlı sonuçlar için uyarlanmış faz testi

Klinik ilaç deneylerinde az sayıda insanla daha hızlı sonuçların alınması için başlatılan bir uygulamada FDA, ilaç şirketlerini, kayıtların ve dozların esnek olduğu klinik deneyler tasarlamaları için destekliyor. Ancak bunun iyi bir fikir olduğu konusunda herkes anlaşabilmiş değil.

Tipik bir klinik deneyde, ilaç dozu ile kontrol ve uygulama gruplarında yer alan hasta sayıları önceden belirlenir ve değiştirilemez. Buna karşın uyarlanmış testlerde ilaç dozlarının, hasta havuzundaki kişi sayısının ve benzer diğer faktörlerin, elde edilen verilere bağlı olarak değiştirilmesine izin verilir. Diğer bir deyişle, yeni sonuçlar geldikçe parametreler "deney yürütülürken" değiştirilir. Faz II ve III evrelerinin 5 yıl veya daha uzun sürebileceği düşünüldüğünde, sonuçları hızlandıracak bu değişiklikleri herkes desteklemektedir.

Bayer Sağlık Hizmetleri yeni bir kanser ilacının faz II denemelerinde uyarlanmış yaklaşım yöntemini izledi. Yeni ilaçla hangi kanser türünde en iyi karşılığı alacaklarını önceden bilmedikleri için, hastalığı ileri aşamada olan farklı kanser hastalarını denemeye aldılar. Kısa bir süre içinde yeni ilacın böbrek kanserine en iyi karşılığı verdiğini anlayınca, sadece ilerlemiş böbrek kanseri hastaları üzerinde yürütecek şekilde denemelerini "uyarladılar".

Uyarlanmış testlerle ilgili sonuçlarda karar verecek komitenin kesinlikle tarafsız olması temel gereklilik olmalıdır. Bu çalışmalardaki ilaçların daha hızlı olmada başarızlık göstermesi veya şirketlere daha pahalıya mal olmaları söz konusu olabilir ve sonuçlar doğru "uyarlamalarla" değiştirilebilir. FDA denemelerde bu ilaçlardan yararlanma olasılığı yüksek hasta sayısını artırmak için, birden fazla olası sonuç ve yöntemlerin değerlendirilmesine yardımcı olacak kılavuzlar yayınlıyor. Uyarlanmış deneme desenleri sonuçları hızlandıracak mı? İlaç maliyetleri yükselecek mi, düşecek mi? En büyük fayda kime olacak? Hastaya mı, ilaç şirketine mi?

Laboratuvar Çalışanlarını Korumak İçin FDA Yasal Düzenlemeleri

Gen vektörleri, rekombinant DNA ve rekombinant DNA içeren canlılar, bakteriler ve funguslar gibi materyaller ile uğraşan laboratuvar çalışanları bu işleri gereği risk altındadır. Biyoteknoloji şirketleri, çalışanlarının bu materyalden enfeksiyon kapmasıyla ilişkili potansiyel yükümlülük ve bunun mali sonuçlarının bilincinde olarak, uygun biyogüvenlik önlemlerinin alınmasına yüksek öncelik vermektedirler. Biyolojik tehlikelere karşı üç düzeyde korunma önlemi vardır: Düzey 1, ortamda hava akımı yaparak havayı filtreden geçirip geri verir ve çalışma ortamında hava kaynaklı materyalden çalışanları korur. Düzey IIB, özellikle bakteri ve hücre kültürü yapılan ortamlarda, yüksek verimli parçacık hava filtresi (HEPA filtre) ile havayı temizleyerek geri verir. Düzey III, materyali gazgeçirmez bir alanda izole eder ve sadece en tehlikeli materyalle çalışılan ortamlarda kullanılır (bir sonraki sayfadaki **Şekil 12.4**).

12.5 Mevzuat ve Düzenlemeler: Devletin Devam Eden Rolü

Biyogüvenlikteki yasal mevzuat bilimsel olduğu kadar aynı zamanda siyasi bir meseledir. Düzenleyici kurumlar devlet kurumlarıdır ve yasaları uygulamak için oluşturulurlar. İdeal olarak bu yasalar iyi bilimsel



ŞEKİL 12.4 Biyogüvenlik Düzey I Koşullarında Mikropipet Kullanan Laboratuvar Teknisyeni

uygulamaların sonuçlarına dayanırlar, ancak aynı zamanda felsefi değerleri de yansıtırlar. Değerler sisteminin çatışması görülmemiş bir durum değildir ve bu olduğunda, uzlaşı için uzun bir müzakere ve ara bulma sürecine gerek duyulabilir.

Biyoteknoloji Ürünlerinin Etiketlenmesi

Tartışmalı konulardan biri de genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) içeren gıdaların etiketlenmesidir. FDA'nın ve Beyaz Saray'daki mevcut yönetimin bakışına göre, gıda etiketlerinde içerdiği maddeler ve imalatçının istediği veya önerdiği bilgiler bulunmalıdır. FDA ayrıca gıdaların bilinen güvenlik, kullanım veya alerjen durumlarını belirten özel etiketlemeyi de zorunlu kılar. Eğer bir biyoteknolojik gıda ürünü genellikle gıdalarda bulunmayan ve alerjen olarak bilinen bir protein içeriyorsa, FDA alerjisi olan tüketicileri risk konusunda uyaran bir özel etiket isteyebilir. Birçok çikolatalı şekerlemede az miktarda yerfıstığı içerebileceğine dair uyarı bulunur. Bununla birlikte, biyoteknolojik gıdalar doğal olarak geleneksel eşdeğerlerinden daha az ya da daha fazla tehlikeli olmadıklarından, FDA üretim yönteminin etikette belirtilmesini zorunlu kılmaz. Ancak bu ürünler Avrupa'da satılırsa Avrupa Birliği genetik modifikasyonun etikette belirtilmesini istemektedir.

Bazı tüketici grupları etiketleme yasasında değişiklik yapılarak, gıda ürünlerindeki etiketlerde genetik mühendisliğinin kullanıldığı bilgisinin verilmesini sağlamaya çalışıyorlar. Bu açıklamanın, bilme hakkının temeli olduğunu ve kendi değer ve inançlarına dayalı bilinçli seçim yapabilmeleri için gerekli olduğunu savunuyorlar. Bu gerçek dünya tartışmasının ilginç bir örneği, daha önce sözü geçen BST kullanılarak süt veriminin artırılması üzerinde yoğunlaşmıştır. Geçen on yılda yapılan bir seri kapsamlı araştırma BST kullanılarak yapılan süt üretiminin önemli bir sağlık sorununa yol açmadığını göstermiştir. Bu nedenle FDA etikette BST kullanıldığını belirtmeye gerek olmadığı görüşünü sürdürmektedir. Dahası, üreticiler ürünlerini "BST içermez" şeklinde etiketlediklerinde FDA, ineklerde süt üretiminin doğal olarak ortaya çıkan BST'ye bağlı olduğu gerekçesiyle yanlış yönlendirme yaptıklarını belirterek, müdahalede bulunmuştur. Bu durum "BST verilmeyen ineklerden üretilmiştir" şeklinde etiketlenmiş sütlerin satışını teşvik etmiştir. Bazıları proteinlerin veya antibiyotik dayanıklılığı sağlayan içeriklerin gıdalara eklenmesinin alerjileri tetikleyeceği düşüncesiyle korkmaktalar (bakınız Bölüm 7). Düzenleyici kurumların onyıllardır yaptıkları iş, bu potansiyel zararlara karşı koruyucu önlemleri almaktır.

Toplum biyoteknolojinin dünyamızdaki rolüne uyum sağladığında, gelecek günler daha birçok tartışmayı da beraberinde getirecektir. Bu nedenle tüm düzenleyici kurumlarm ana sorumluluklarından biri de kamuoyu görüşlerinin dikkate alınacağı bir yol sağlamaktır. Düzenlemenin bu yönü mevcut demokrasinin önemli bir unsurudur ve Tablo 12.2'de görüldüğü gibi birden fazla kurum tarafından paylaşılmaktadır. Rehber İnternet Sitesinde düzenleyici kurumların web adreslerini ziyaret ederseniz, politikaları belirleyen kamuoyu görüşleri hakkında daha fazla bilgi sahibi, hatta kendiniz de kalıtılımcı olabilirsiniz.

12.6 Patent Uygulamaları

Patent, buluşçusu veya araştırıcısına bir ürün üzerinde ayrıcalıklı haklar verir ve diğerlerinin bu ürünü yapma, kullanma ve satmasını yasaklar. Bu ürünler geniş anlamda aşağıdaki gibi sınıflandırılırlar:

- **Kullanım patentleri** faydalı yöntemleri, makineleri ve işlenmiş ürünleri korur. Örneğin bilgisayar donanımı ve ilaçlar.
- **Tasarım patentleri** sanayi ürünlerinde yeni ve orijinal tasarımları onaysız olarak kullanılmaya karşı korur. Örneğin bir spor ayakkabı veya kaskın "görünüşü".
- **Bitki patentleri** aseksüel olarak üreyen bitki çeşitleri icat veya keşiflerini korur.

Bir buluşa patent verilmesi için üç temel gerekliği sağlaması gerekir: Yeni olmalı, bilinmeyen olmalı ve bazı yararları olmalı ("Yararlı" terimi bu bölümün devamında ayrıntılı ele alınacaktır). Geleneksel olarak patentler icatlara verilmekteydi, ancak birçok doğal ürün yukarıda açıklanan her üç gerekliliği de karşılamakta ve sınıflandırma gruplarından birinde yer almaktadır. Örneğin keşfedilen bir DNA dizisi yeni, bilinmeyen ve çok yararlı olma potansiyeline sahip

TABLO 12.2 FEDERAL DÜZENLEYİCİ KURUMLARIN PAŞLAŞTIKLARI YÜKÜMLÜLÜK ÖRNEKLERİ

Yeni Özellik/ Organizma	İnceleyen Denetleyici Kurum	İncelenme Nedeni
Gıda bitkisinde virüs dayanıklılığı	USDA	Yetiştiricilik güvenliği
	EPA	Çevre güvenliği
	FDA	Gıda güvenliği
Gıda bitkisinde yabancı ot ilacı toleransı	USDA	Yetiştiricilik güvenliği
	EPA	Eşdeğer herbisitin yeni kullanımı
	FDA	Gıda güvenliği
Süs bitkisinde yabancı ot ilacı toleransı	USDA	Yetiştiricilik güvenliği
	EPA	Eşdeğer herbisitin yeni kullanımı
Gıda bitkisinde yağ içeriğinin değiştirilmesi	USDA	Yetiştiricilik güvenliği
	FDA	Gıda güvenliği
Süs bitkisinde çiçek renginin değiştirilmesi	USDA	Yetiştiricilik güvenliği
Kirleticileri parçalayan modifiye toprak bakterisi	EPA	Çevre güvenliği

Kaynak: www.fda.gov.

olabilir. Bu nedenle, patentleri denetleyen **ABD Patent ve Tescil Ofisi (USPTO)** fonksiyonu bilinen proteinlere ait DNA dizilerine patent verme konusunda çekinmez.

Patent kanunları ilk ortaya çıktığında hiç kimse DNA veya proteinlerin patentleneceğini hayal edemezdi. Mucitlerin daha iyi fareler değil, daha iyi fare kapanları tasarlayacağı beklenmekteydi. USPTO özgün bir gen dizisine sahip bakteri (genetiği değiştirilmiş organizma) üzerindeki ilk patenti 1980'de verdi. O zamandan bugüne kurum bitki, hayvan ve insan genleri için 2 000'den fazla patent verdi. Patentler ayrıca transgenik hayvan ve bitkiler, monoklonal antikorlar ve hibridomalar, izole antijenler ve aşı kompozisyonları, klonlama veya protein üretme yöntemleri için de verilmektedir.

Bu patentler biyoteknoloji şirketleri için büyük karlara dönüşmekte, ancak önemli tartışmalara da yol açmaktadır. Birçok kişi genlerin – özellikle insan genlerinin – fare kapanı muamelesi görmemesi gerektiğine inanmaktadır. Onların düşüncesine göre, insan yaşamıyla ilgili DNA veya proteinler gibi hiçbir bileşiğin patentlenmemesi gerekir.

Genlerin patentlenmesi işlemi, patent yasasının metni ve ruhuna tamamen uygundur. Buna rağmen birçok kaygı ve belirsizlikler de devam etmektedir. Yönetimleri bekleyen zorluk, bir bütün olarak bilimi desteklerken araştırıcıların kişisel haklarını da koruyacak yolların bulunması olacaktır.

Patent Edinme

ABD'de patentler dosyanın açıldığı tarihten başlayarak 20 yıla kadar süreyle uygulanır. Bunun anlamı; diğer



KARARI SİZ VERİN

Araştırılan İlaçlar için Klinik Deneyler

Eğer size ciddi bir ölümcül hastalık teşhisi konulsaydı, yeni bir ilaç için yapılacak klinik deneylerin bir parçası olmak istemez miydiniz? Eylül 2010'da duyurulan FDA'nın yeni düzenlemeleri sizlerin yararınıza iyileştirmeler içermektedir. FDA, ilaç ve biyolojik ürünlerin klinik araştırmaları sürecinde rapor edilmesi gereken güvenlik bilgilerinin daha anlaşılabilir olması için, yeni kurallar yayınlamıştır. Kurum şimdi, daha önce istemediği bazı güvenlik bilgilerinin, söz konusu güvenlik meselesi ortaya çıktıktan 15 gün sonra FDA'ya verilmesini zorunlu kılmaktadır. Araştırıcılar klinik veya deneysel çalışmalarında katılımcılara önemli riskler getiren bulgularını açıklamak zorunda kalacaklardır. Ciddi olumsuz etki şüphesi beklenenden daha yüksek oranlarda ortaya çıkmaktadır. Bir ilacın kan dolaşımında ne kadarının ve hangi oranda emildiğinin belirlenmesi için yapılan çalışmalarda da aynı şekilde ciddi yan etkiler ortaya çıkmaktadır. Araştırıcılar ayrıca eşdeğer bir ilacın yeni geliştirilen ilaç kadar etkili olup olmadığını belirleyen çalışmalarını da sunmak zorunda olacaklar. Bu yeni kurallar, ilaç buluşlarının hızını kesmeden, hastaları korumak amacıyla düzenlenmişlerdir. Bu yeni düzenlemelerle yeni bir ilacın riskleri denemeye değer mi? Kararı siz verin.

Kaynak: FDA Doles Out New Rules on Clinical Trial Safety Data Reporting, GEN, September 29, 2010.

şirketler ürünün kendilerine ait varyantlarını ancak 20 yıl sonra, orijinal buluşçu şirketin özgün hakları sona erdiğinde, pazarlayabilirler. Bu işleyiş hem yeni buluşları teşvik etmekte hem de uzun-dönem tekellerinin oluşmasını önlemektedir. Bir şirketin ABD patenti almak için önce ürünü yeterince tanımlayan bir başvuru formu vermesi gerekir. Şirket ayrıca başvurunun yapıldığı zamanda ürününün en iyi kullanımının ne olduğunu da açıklamalıdır. Özel teknik eğitimli USPTO uzmanları tüm patent başvurularını incelerler. Patentler ilk gelen-ilk alır prensibiyle verilirler. Eğer iki şirket aynı buluş için yaklaşık aynı zamanda başvuru yapmışsa, iki taraf da yasal yoldan hak arayabilir. Bu gibi durumlarda, küçük bir hazırlığın etkisi uzun sürebilir. Aşağıdaki temel ilkeler patent hazırlığındaki bir ürünü korur:

1. *Kayıt Tutma.* FDA yasalarında belirtildiği gibi, her araştırıcının bir defter veya güvenli bir elektronik formatta ayrıntılı notlar tutması gerekir. Bu notlara yapılan her giriş, o araştırmayla doğrudan bağı olmayan birinin şahitliğinde, tarihi belirtilerek imzalanmalıdır. Defterde tüm kavramsal fikirler ve destek veriler yer almalıdır. Bu kanıt şirketin patentini desteklemek veya rakip patentleri iptal etmek için kullanılabilir.
2. *Hazırlık.* Araştırıcılar potansiyel rakiplerinin ve diğerlerinin çalışmalarını meslek literatürü, yayınlanmış patent başvuruları ve verilmiş patentleri dikkate alarak izlemelidirler. USPTO web sitesi değerli bir başvuru kaynağıdır. Ayrıca Derwent, Medline ve Biosis gibi ticari veri tabanlarına da bakabilirsiniz.



TİCARET ARAÇLARI

Güvenli ve Etkin Bir Çalışma Ortamı

Mükemmel bir devlet fonu, sınırlı yasalar ve geniş bir gen kaynağına sahip iyi eğitimli bir bilim insanı ne üretebilir? Çinli bilim insanları, Kuzey Amerika'dan sonra, en büyük bitki biyoteknolojisi üretim kapasitesini yarattılar. Eğer yeni bir ürün gelişmekte olan bir ülkede geliştiriliyorsa, devlet desteğinin ne kadar önemli olduğunu gösterdiler. Sonuç olarak, Çinli çiftçiler gelişmekte olan ülkelerin hepsinden daha fazla alanda genetiği değiştirilmiş bitkiler üretiyorlar ve bunu devletlerinin desteği ve özendirmesiyle yapıyorlar. Bu ürünler Çin hükümetinin getirdiği yasalar çerçevesinde izleniyor ve denetleniyorlar.

Çin son 50 yılı gelişmekte olan dünyadaki en başarılı tarımsal sistemi kurmakla geçirmiş olsa da (70 000'den fazla bilim insanına iş vererek), modern bitki biyoteknolojisi çalışmalarına 1980'lerin ortalarına kadar başlamadı. 1980'lerdeki artan pestisit kullanımı ve pestisitlere dayanıklı pamuk kurdu popülasyonlarının ortaya çıkmasına karşılık olarak, Çinli bilim insanları genetiği değiştirilmiş pamuk üzerinde araştırmalara başladılar. 1997'de böcekler nedeniyle yaşanan büyük ürün kaybından sonra, genetiği değiştirilmiş pamuğun ticari kullanımına izin verildi. Çin'in fakir çiftçilerinin Bt pamuğun kullanımına verdikleri tepki, genetiği değiştirilmiş bitkilerin gelişmekte olan ülkelerde oynayabileceği role karşı duyulan tüm kuşkuları giderdi. 2000 yılına gelindiğinde, çiftçiler Çin'deki toplam pamuk ekim alanlarının % 20'sinde Bt bitki çeşitlerini ekiyor ve ortalama 13 ilaçlama daha az yapıyorlardı (yetiştirme sezonunda hektar başına 762 $ tasarruf). Bt çeşitlerin verim ve fiyatlarının diğerleriyle aynı olmasına rağmen, maliyet ve işçilikten sağlanan tasarrufla, bir kilogram pamuğu % 28 daha ucuza üreten Bt kullanıcısı çiftçiler durumdan memnundu.

Çin'in başarısının tek nedeni basitleştirilmiş onay işlemleri değildir. Çinli bilim insanları, bitki genetik mühendisliğinde kullanılan 50'den fazla bitki türü ve 120'den fazla fonksiyonel gen belirlediler. Bu genetik teknolojilerden 353'ü 1996-2000 yılları arasında geliştirildi. Çin'in Genetik Mühendisliği ve Güvenliği Yönetim Bürosu 251 genetiği değiştirilmiş bitki başvurusunun tarla denemeleri, çevreye salımı veya ticarileştirilmesini onayladı. Denetleyiciler bunlardan 45 tanesine tarla denemeleri, 65 tanesine çevreye salım ve 31 tanesine ticarileştirme için izin verdiler. Çin'deki üç önemli zararlısına – sap kurdu, trips ve bakteriyel yaprak yanıklığı - karşı dayanıklı transgenik çeltik, çevreye salım deneylerinin en az iki yılını tamamladı.

Bitki biyoteknolojisi araştırmalarının çoğunun özel sektör tarafından yürütüldüğü dünyanın geri kalanından farklı olarak, Çin hükümeti bitki biyoteknolojisi araştırmalarının hemen tamamını finanse etmektedir. Bu araştırmalara ayırdığı bütçeyi 2005'ten önce % 400 artırmayı planlamış, ancak bu amaca ulaşmada bir bakıma başarısız olmuştur. Bazı ABD şirketleri bu yasal düzenlemelerin işlediği yeri çekici bulmuştur. Monsanto (merkezi St. Louis, Missouri'de) diğer bitki çeşitlerinin geliştirilmesi için Çin'deki Hebei Provincial Seed Company (Tohum Şirketi) ile ortak bir girişim peşindedir. Biyoteknolojik araştırma yöntem ve ürünlerinin ihracatçısı durumuna gelen Çin, sözleşmeli araştırma yapmak için aktif bir arayış içindedir. Genetiği değiştirilmiş çeşitlere ek olarak, genlerin, markörlerin ve diğer araçların satışa sunulması, genetik modifikasyonlar açısından daha sıkı önlemlerin geçerli olduğu diğer ülkelerin bu dünya liderine bakmalarına neden olabilir.

Biyoteknoloji Sektöründe Patentlerin Değeri

Biyoteknoloji endüstrisinde güçlü patentler, güçlü işletmeler anlamına gelir. Başarılı bir biyoteknoloji şirketinin gelişmesinin her dönemindeki değerinin belirlenmesinde patentler en temel etken olacaktır. Bir grup bilim insanının ölümcül bir virüse karşı aşı geliştirdiklerini varsayın. Patent olmazsa, hiçbir ecza şirketi pahalı klinik deneylerin zorlu külfetini, FDA onayını ve kapsamlı bir pazarlama planı oluşturmayı göze almayacaktır. Patent koruması olmazsa, rakip bir şirket ilacı eczaneden satın alıp eşini üretebilir ve araştırmaya bir kuruş ödemediği için indirimli fiyattan satabilir.

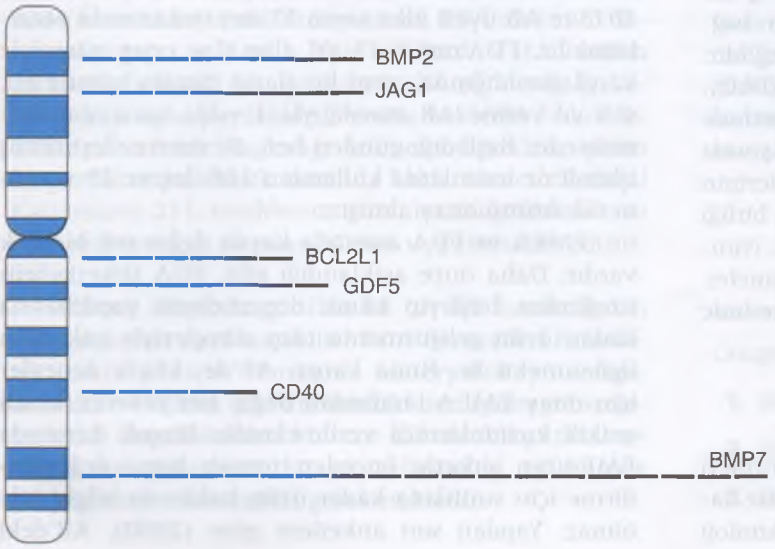
DNA dizilerinin patentlenmesi

DNA dizilerinin büyük çoğunluğu hiçbir zaman tıbbi veya tarımsal değere sahip olamasalar da, bazıları gıda üretiminde veya hastalıklarla mücadelede önemli rol oynayabilir. Bu dizilimleri tanılayan kuruluşlar, doğal olarak, emeklerinin karşılığını patent kanunlarının sağladığı korumayla almak isterler. Genomik sınırlar çizildi ve bugünün öncüleri, kendilerinin olduğunu ileri sürdükleri alanlara, hevesle ve saldırganca sahip çıkıyorlar.

Patent ilkelerine göre, başvuru sahipleri iddia ettikleri özel, maddesel ve güvenilir buluşları için bir fayda ortaya koymalılar. Bir DNA dizisi söz konusu olduğunda **özel kullanım** savında bulunmak için, araştırıcının o DNA dizisinin ne yaptığını tam olarak bilmesi gerekir. Onun bir prob veya markör olduğunu söylemek yeterli olmaz (bakınız Bölüm 3). Araştırıcı bu dizinin tam olarak neyin probu olduğunu veya neyi işaretlediğini açıklamalıdır (örneğin belirli bir insan hastalık geni için prob). **Gerçek kullanım,** gerçekte varolan bir kullanımı tanımlar – örneğin, fonksiyonu veya kullanımı bilinen bir proteini kodlayan klonlanmış bir DNA parçası. **Güvenilir kullanım** özelliğinin karşılanması için, araştırıcının başvurunun kuvvetli bilimsel verilerle desteklendiğine patent bürosunu ikna etmesi gerekir.

Gen dizisinin faydası kanıtlansa bile, eğer varolan bir patentli diziye çok benziyorsa başvuru reddedilebilir. Bir genin fonksiyonunun önemli ölçüde değişebilmesi için tek bir nükleotid değişikliğinin bile yeterli olacağını hatırlayalım (Bölüm 3). Bu nedenle, gen dizilerine verilen patentler, dizinin çok özel olmasını dikkate alır. Diğer bir deyişle, bir patentin ihlal edildiğinden – veya "tecavüz"den – bahsetmek için, başvurudaki DNA segmentinin patentli bir diziyle tam olarak eşleşme gösteriyor olması gerekir. Eğer bir şirket benzer iki dizi için patent ihlali savında bulunursa, dizilerin aslında aynı fonksiyona sahip olup olmadıklarına mahkeme karar verir. Bu durum, **eşdeğerlik öğretisi** olarak bilinir. Fikri mülkiyet haklarının korunması ve patentli ürünlerin satışını korumak için gerekenler, ABD dışındaki ülkelerde aynı değildir ve ayrı ayrı başvuruları gerektirir.

Yapılan birçok çalışmada insan genlerinin yaklaşık % 20'si, çoğunlukla özel biyoteknoloji şirketleri tarafından patentlenmiştir. Beklendiği gibi, en çok patentlenenler insan sağlığı ve hastalıklarıyla ilgili olanlardır. Bilinen kanser genlerinin neredeyse % 50'si patentlidir. Bazı durumlarda, meme kanseriyle ilişkili *BRCA1* geninde olduğu gibi, patent hakları birden fazla şirkete verilmiştir. Bu durum dizilerin sahipliği ve ticari hakları üzerinde tartışmaları da beraberinde getirmiştir. Bazı genler, genetik testlerle tanılamak için genlerin ticari kullanımlarını kapsayan hakları da içine alacak şekilde, 20'ye varan patente sahiptir. Kromozom 20 üzerinde en çok patentlenen bölgeler için **Şekil 12.5** 'e bakınız.



ŞEKİL 12.5 Bir İnsan Kromozomu Üzerindeki Patent İşlemlerinin Gösterilmesi Kromozom 20 üzerinde; yatay barların herbirinde o bölgedeki bir gen dizisi için alınan patent hakları gösterilmektedir. Etiketler patentli genlerin çok fazla olduğu lokusları belirtmektedir.



KARARI SİZ VERİN

Patentsiz İlaç Geliştirildiğini Görecek miyiz?

Gen patentleri vazgeçilmez bir gerçek, ancak arkasında sorularla. Örneğin, hayat kurtaracak etkisi olan bir biyoteknoloji ürününe tek bir şirket "sahip" olursa ne olur? Şekil 12.5'te gösterildiği gibi, birçok şirket kanserde gen terapisi için patent başvurusunda bulunmaktadır.

Tarih, tıbbi uygulamaların patent kanunlarından etkilenebileceğini göstermektedir. Örneğin, Myriad Genetics kadınlarda meme kanseri riskini belirleyen *BRCA1* ve *BRCA2* genlerinin paylaşılmayan patentine sahiptir. Şirket, birçok kadın için testlerin yapılmasını engelleyecek bir uygulamayla, bu genler için kan testi yapan her laboratuvardan ücret istemektedir. Ulusal Kanser Enstitüsü (NCI) tüm NCI ve NIH laboratuvarlarında testlerin indirimli fiyatla kullanılması için Myriad Genetics ile 2001 yılında bir anlaşma yaptı. Hala, bu testin fiyatını karşılayamayan bazı laboratuvarlar var. Amerikan Sivil Haklar Sendikasının Mart 2010'da Myriad Genetics'e karşı kazandığı önemli dava, genleri patentlemenin sorgulanmasının yolunu açmıştır. ABD Patent Bürosu yaklaşık 35 000 gen dizisine patent vermiştir. Büyük olasılıkla bu karar temyiz süreçlerinde tersine dönecek veya sınırlanacak, ancak hiç şüphe yok ki "doğal ürünler" için daha iyi bir tanım yapılmasını sağlayacaktır. "İnsan eliyle değiştirilmiş" kavramı daha iyi tanımlanacağı ve özel olarak düzenlenmiş ürünler için kullanılmaya başlanacağından, birçok kişi bu kararı biyoteknolojide inovasyon için bir uyarıcı olarak görmektedir. Mahkeme gen dizileri kullanılarak yapılan tanı ve tarama yöntemlerinin patentlenemez olduğuna karar vermiştir. Bu, biyoteknoloji ürünlerinin daha pahalı olmasına mı, yoksa tarama testlerinin daha az yapılmasına mı yol açacak? Mahkemeler kararlarında haklı mı? Kararı siz verin.

12.7 Uluslararası Biyoteknoloji Yasaları

Biyoteknoloji küresel bir girişimdir. Günümüzde dünya üzerindeki toplumlar biyoteknoloji ürünlerinin düzenlenme ve denetlenmesi konularında hala başlangıç aşamasındalar. Umut veren bazı gelişmeler olmaktadır. Örneğin, Birleşmiş Milletler (BM) GDO'ların planlı serbest bırakılması için isteğe bağlı bir yönetmelik oluşturmuştur. 2000 yılında bunun önerilmesinden bugüne kamuoyu yorumları istenmekte, ancak henüz son bağlayıcı kararlar üzerinde anlaşmaya varılabilmiş değildir. Bir BM ajansı olan Gıda ve Tarım Organizasyonu (FAO), gelişmekte olan ülkelerdeki biyoteknoloji üzerinde yoğunlaşmakta, güvenlik ve risk analizleri konularında yol göstericilik yapmaktadır. Biyoteknoloji ürünlerinin ithalat ve ihracatı ile ilgili genel olarak bir görüş birliği veya açıkça belirtilmiş standartlar yoktur. Ancak iyimser olmak için nedenler var. Avrupa'daki son gelişmeler, biyoteknoloji ürünlerinin geliştirilmesi ve ticaretinde uluslararası işbirlikleri için model olabilir.

Avrupa Birliği

Son yıllarda Avrupa Birliği (AB) biyoteknoloji ürünleri için hem bir yenilikler yatağı hem de cazip bir pazar haline geldi. 1993'te AB'nin oluşması, yeni biyoteknoloji ürünlerinin pazara sunulmasını dikkate değer biçimde elverişli hale getirmiştir. AB bugün, kitaplara örnek olacak şekilde, kendini bilimsel ilerlemeyi teşvik etmeye adamış bir devlet organı niteliği sergilemektedir.

Yeni sistemdeki anahtar birim, FDA eşdeğeri, **Avrupa Tıbbi Ürün Değerlendirme Ajansı (EMEA)**'dır. EMEA insan ve veterinerlik tıbbi ürünlerinin onayını verir. Ayrıca yeni ürünler hakkındaki bilimsel bilginin 11 Avrupa resmi dilinde yayımına yardımcı olur. Bir ürün EMEA tarafından onaylandıktan sonra, AB'deki 15 ülkenin (çevirenin notu: Nisan 2013'te AB üyesi ülke sayısı 27'dir) tamamında pazarlanabilir. FDA'nın 8-11 yıl alan ilaç onay süreciyle karşılaştırıldığında, yeni bir ilacın pazara sunulması, 4-5 yıl yerine AB aracılığıyla 1 yılda tamamlanabilmektedir. Başladığı günden beri, bu merkezileştirilmiş işlemlerle insanlarda kullanılan 100 ilaç ve 25 veterinerlik ürünü onay almıştır.

EMEA ve FDA arasında kayda değer tek bir fark vardır. Daha önce açıklandığı gibi, FDA şirketin izin isteğinden başlayıp klinik denemelerin yapılmasına kadar, ürün geliştirmenin tüm süreçleriyle yakından ilgilenmektedir. Buna karşın AB'de, klinik deneyler için onay EMEA tarafından değil, her ülkenin kendi yetkili kurumlarınca verilmektedir. Birçok durumda EMEA'nın şirketle önceden teması hatta değerlendirme için sunulana kadar ürün hakkında bilgisi bile olmaz. Yapılan son anketlere göre (2000), AB'deki



KARİYER PROFİLİ

Kalite Kontrol İnspektörü

Biyoteknoloji şirketlerindeki kalite kontrol inspektörleri, ürünlerin prospektüslerinde yazan (ve düzenleyici kuruma verilen ürün özellik dosyasında belirtilen), o üründe geçerli kalite standart düzeylerini karşılamalarını sağlamak için teftiş ve kontrol yapmakla yükümlüdürler. Laboratuvarda çalışmayı seven, detaylarla ilgili kişiler için bu meslek güzel bir kariyer sunar. Yüksek istihdam yaratmaya devam eden bir iş alanıdır. Kalite kontrol ürün geliştirmenin her aşamasında uygulanır. Bazı inspektörler istenen özellikleri taşıdığını doğrulamak için hammaddeyi incelerler, bazıları donanımı test ve kalibre eder, bazıları da şirket tarafından belirlenen standart işletim yöntemlerinin (FDA, USDA, EPA ve ilişkili düzenlemelere dayalı) düzenini test ederler.

Bazı şirketlerde bir lise diploması ve kalite kontrolda deneyimli olmak yeterli olsa da, çoğu işveren teknik bir alanda önlisans ve birkaç yıllık deneyimi tercih etmektedir. Kalite kontrol inspektörlerinin genellikle hata düzeylerini belirlemeleri beklendiğinden, iyi bir matematik eğitimi almış olmaları gereklidir. Mekanik konulara yatkınlık ve iyi bir el-göz koordinasyonuna sahip olmak da gerekir. Endüstrideki ürünleri yönlendiren yasal düzenlemeler hakkında mutlaka güçlü bir altyapıya sahip olmak da gerekir. Lisans eğitimi almış deneyimli kalite kontrol inspektörlerinin yönetici olmaları desteklenebilir. Biyoteknoloji şirketlerinde kalite güvenliğinden kalite kontroluna birçok geçiş gerçekleşir. Kalite güvenliği birimi, bir denetleyici kurumun kontrol için geldiğinde inceleyeceği, bütün kayıtların tutulması ve sürdürülmesinden sorumludur. Birçok şirkette kalite güvenliği ve kalite kontrolu alanlarında uygun kariyer basamakları bulunmaktadır.

ecza şirketlerinin % 75'i mevcut uygulamalardan memnundur.

Uluslararası düzenlemeler ABD şirketlerini etkileyebilir

İlaçlar ve Sağlık Ürünleri Değerlendirme Ajansı (Medicines and Healthcare Products Regulatory Agency-MHRA) görevlisi İngiliz denetleyicilerin bazı aşı partilerinde bakteriyel bulaşıklık bulması sonucu, Emeryville, California merkezli Chiron şirketinin 48 milyon doz grip aşısı (Fluvirin) imha edildi. İngiltere'de işletilen şirketler, ABD'deki kadar hatta oradakinden de sıkı olan İİU kurallarına uymak zorundadırlar. MHRA'nın 2004'te tesisi kapatmasından sonra, FDA da kendi denetimini yaptı ve Aralık 2004'te Chiron'a ihlal edilen 20 kuralı belirttiği bir uyarı mektubu gönderdi. Şirketin 9 grip aşısı partisinde *Serratia* bakterisi bulundu. Sorunun nerede başladığı izlenemediğinden, şirket 91 partiyi imha etmek zorunda kaldı. Mevcut Federal Kanunların 211. maddesine göre, bu tür problemlerin izlenebilmesi için standart işletim uygulamaları zorunludur.

Chiron olayında görülen bu tür İİU hatalarından diğer şirketler nasıl kaçabilir? FDA denetçileri firmaların insan, yöntem, donanım, materyal, kayıt tutma, denetim ve eğitim gibi üretimdeki her aşamayı incelemelerini önermekteler. Mevcut İİU sürekli güncellenmekte ve şirketlerin bu güncellemeleri eğitimlerle çalışanlarına aktarmaları gerekmektedir.

BİR FARK YARATMAK

Federal yasalar (FDA Kısım 211), ilaç imalatında bütün çalışanların İyi İmalat Uygulamaları (İİU) eğitiminden geçmesini zorunlu kılmaktadır. Biyoteknoloji şirketleri çalışanlarına düzenli olarak bu eğitimleri sunmakta ve mevzuatı öğrenmelerini sağlamaktadır. FDA, kurallara uyumu denetler ve uymayanları cezalandırır. Mayıs 2010'da Genzyme şirketine, Boston yakınlarındaki Allston dolum tesislerindeki uygulamaları düzenlemediği için 175 milyon $ ceza verildi. FDA tesisteki ilaç ürünleri içinde çelik, lastik ve iplik parçacıkları buldu. Bu problem giderilene kadar şirketin tesisi kapatması gerekti. Kurallara uyum biyoteknoloji sektöründe çalışmanın bir parçası ve çok dikkatli olmayı gerektirmektedir. Ayrıca sorunu rapor etmek de İİU'nın bir zorunluluğudur. Birçok olayda, şirketler uygulamalarını değiştirmekten memnunlar, çünkü onlar da temiz ve hayat kurtaran ürünler üretmek istemekteler (ayrıca düzenlemelere uymadıklarını belgeleyen bir utanç raporu riskini göze alamazlar).

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Hangi ABD Kurumu gıda katkılarını denetler?
2. Hangi ABD Kurumu GD bitkileri denetler?
3. Hangi ABD Kurumu su kalitesini denetler?

4. Hangi ABD Kurumu genetiği değiştirilmiş organizmaların çevreye salımını denetler?
5. İlaç ve icatlar patentle nasıl korunur?
6. Yeni akım onay süreçleri Avrupa ilaç pazarını nasıl etkilemektedir?
7. Kanser tedavisinde en fazla patent başvurusu nerede yapılıyor?
8. Size göre, Fluvirin vakasını önlemek için FDA mevzuatı uyarınca ne yapılmalıydı?
9. Size göre, ilaçların FDA tarafından izin verilen kullanımı dışındaki amaçlar için önerilmesinin neresi yanlıştır?
10. İlaçlar niçin genellikle Avrupa'da ABD'den önce kullanıma sunulur?

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.

BÖLÜM

13

Etik ve Biyoteknoloji

Çeviren: Mücella TEKEOĞLU

Bu bölümü tamamladıktan sonra, şunları yapabilmelisiniz:

- Biyoetiği tanımlayabilmeli ve biyoteknolojiyle ilişkisini açıklayabilmelisiniz.
- Etik düşüncede farklı yaklaşımları anlayarak uygulayabilmelisiniz.
- Biyoteknolojiyle ilgili olası etik ikilemleri tanımlayabilmelisiniz.
- Bu bölümde belirtilen etik sorunlarla ilgili soru ve yaklaşımlar ortaya koyabilmelisiniz.
- Farklı etik yaklaşımlarla ilgili sonuç ve zorlukları belirleyebilmelisiniz.
- Bilim, ekonomi, iletişim ve kamu düzeni arasındaki etkileşimleri tartışabilmelisiniz.
- Genetik testler, kök hücreler, genetiği değiştirilmiş organizmalar, klonlama ve diğer biyoetik başlıklarındaki anlaşmazlık ve etik konuları anlayabilmeli ve açıklayabilmelisiniz.
- Biyoetikte kariyer yapmayı mümkün kılan yolları tanımlayabilmelisiniz.



Biyoetik insan hayatı gibi başlıkları dikkate alır. John ve Lucinda Borden ABD Temsilciler Meclisinde embriyo araştırmaları üzerine bir oturumda tanıklık yaptılar. John'ın kucağında ikizleri Luke ve Mark; Lucinda ikizlerin embriyo halindeki resmini gösteriyor. Luke ve Mark dondurulmuş embriyolardan edinildiler.

Etik, bazı açılardan, basitçe, bildiğimiz sağduyu gibi görünür. Elbette, bilgi vermeden yeni kanser önleyici ilacınızı test etmek için bir grup insanın kasıtlı olarak kanser olmasına neden olmak, etik değildir. Ancak birçok durumda seçenekler çok açık olarak belirtilmemiştir. Karar verilirken sık sık karşılıklı ödün verme, uzlaşma, hatta bazen fedakârlık yapma durumunda kalınır. Biyoetik, toplumumuzun karşılaştığı en tutucu soruların üstesinden gelir. Şimdi alınan kararlar birçok açıdan bilimin geleceğini, insanlığı ve içinde yaşadığımız dünyayı etkileyebilir. Bu bölümün amacı, biyoetik hakkında size ne düşüneceğinizi söylemek değildir. Bunun yerine, amacımız, biyoetik hakkında *nasıl* düşüneceğinizi anlamanızı sağlamak – soru sormaya, doğru soruları nasıl soracağınızı düşünmeye, tüm gerçekleri bilmeye özendirmek ve kararlarınızı duygusal reaksiyonlarla değil, bilgiye dayalı olarak almanızı sağlamaktır.

GELECEĞİ ÖNGÖRME

Bilimin her alanındaki etik ve ilişkili konular halk, bilim insanları, politikacılar ve diğerleri tarafından gittikçe artan bir ilgi alanıdır. Gelecekte yeni biyoteknoloji uygulamaları ortaya çıktığında, bu uygulamalara bağlı tartışmalar ve etik kaygılar konusunda artan farkındalık neredeyse her zaman uygulamanın kendisindeki gelişmeden önce gelecektir. Kök hücreleri bir örnek olarak kullanırsak; herhangi bir kök hücre çalışmasının uygulanmaya değer olduğu kanıtlanmadan çok önce, etikçiler kök hücre uygulamalarının olası etik sonuçlarını tartışıyorlardı. Şimdi bilginin çok hızlı paylaşılmasıyla birlikte, ancak çok az sayıda biyoteknoloji uygulaması ve buluşu etik tartışmaların önünde yer alabilecektir. Bu nedenle imkânsızı yapmaktansa – yani gelecek birkaç yıl içinde biyoteknolojinin karşı karşıya kalacağı en öncelikli etik baskıyı tahmin etmektense – etik düşünme ve karar vermenin gelecekte önemli bir yeti olacağını vurgulamak istiyoruz. Bu kitapta öğrendiğiniz hemen hemen her uygulamanın, geleceğin en heyecanlı alanları olarak öngördüklerimiz dâhil, önemli etik bileşenleri de olacaktır.

13.1 Etik Nedir?

Etik, davranışlarımız için bir değerler kodu anlamı taşır. Basit bir açıklamayla, etik, doğruyu yanlıştan, iyiyi kötüden ayırmaya yarayan bir yol gösterici olarak düşünülebilir. Biyolojik araştırmalar ve biyoteknolojik uygulamaların etkileriyle uğraşan etik alanı, özellikle sağlıkla ilişkili olanlar, **biyoetik** olarak isimlendirilir. Bu alan sosyal ve manevi yönlerle, biyoloji ve sağlık teknolojilerinin kullanımında ortaya çıkabilecek sonuçlarla ilgilenir.

Etiğin *ikilem temelli disiplin* olduğunu anlamanız önemli. Etik ikilemler, önemli bir sorun veya durum dikkatli değerlendirme gerektirdiğinde ve birini o durumun etik olacağına inandırdığında, ortaya çıkar.

Biyoetik konularla uğraşırken sorulması gereken temel soru "Bu yapılabilir mi?" değil, "Bu yapılmalı mı" olmalıdır. Eğer bir şeyin yapılması gerekiyorsa, soru, "Bu şey doğru yollar kullanılarak nasıl yapılabilir?" şekline dönüşür. Bu sorgulamaları herkesin, özellikle biyoteknolojinin insan sağlığı ve çevre üzerine büyük etkisi olan buluşlarının uygulama alanlarında çalışanların, dikkate alması gerekir. Bu sorular sadece toplumun değil, bilimin ve onun toplumdaki rolünün de özünü ortaya çıkarır.

Örneğin, **Şekil 13.1**'de gösterilen fotoğrafa bakın. Bilim insanları, diş oluşumu başlatmak için – tavuklarda normal olarak gerçekleşmez – fare hücrelerinin tavuk embriyosundan sinyal alacağını göstermek amacıyla, fare hücrelelerini tavuk embriyosuna naklettiler. Tavuk embriyoları diş oluşturmaya başladı, fakat bunların yetişkin hale gelmelerine izin verilmedi. Ancak bazı insanlar bu tür deneylerin yapılmasına çok öfkelendiler. Çünkü bu normal olmayan biçimde dişli "Frankenstein benzeri" mutant tavuk imajı vermektedir. Şekil 13.1'de gösterilen tavuk, fotoğrafçılar tarafından dikkat çekmek ve manşet yapmak için yaratılmıştır, gerçek değildir. Daha en



ŞEKİL 13.1 Tavuklarda Diş Çıkarmak. Yapılmalı mı? Burada gösterilen resim dişleri olan bir tavuğun yapay tasviri; gerçekte böyle bir hayvan yok. Bu resim kasıtlı olarak, dikkat çekmek ve biyoetik hakkında düşünmenizi sağlamak için gösterilmiştir.

başında, sırf teknoloji buna olanak veriyor diye, diş geliştirebilecek bir tavuk embriyosu yaratılmalı mıydı? Dişleri olan bir yetişkin tavuğun gerçekleşip gerçekleşmeyeceğini görmek için, embriyo gelişmesi devam ettirilmeli miydi? Bu etik midir? Ne düşünüyorsunuz? Burada bahsedilen araştırma hakkında daha fazla bilgi edinmek için Rehber İnternet Sitesi'nde yer alan kaynak listesinden Mitsiadis ve ark.'nın makalesine bakabilirsiniz.

Etik Karar Verme Yaklaşımları

Etik konuların araştırmasına başlamadan önce, etik düşünmenin önemli bazı yöntemlerini inceleyelim. Etik çalışmalar insanlık kadar eskidir. Yerine getirdiğimiz görevlerle ilgili sorular ve toplumdaki diğer insanlara karşı sorumluluklarımız yıllardır hayatımızın bir parçası olagelmiştir. Hipokrat (MÖ 460-361), ilk **biyoetikçi** olarak değerlendirilebilir. Yaptığı tıbbi uygulamalarda, kişinin değerini ve insan hayatının kutsallığını birinci öncelik olarak alıp, hastalığı değil hastayı öne çıkarmıştır. Hekimler, yıllardır hastalarına ve mesleklerine karşı sorumluluklarını yerine getirirken, **Hipokrat Yemini**nin temel ilkelerine – "öldürmemek", "yardım etmek veya en azından zarar vermemek" – uyma sözü vermekteler.

Etik düşünce ve sorunları ele alma sıklıkla iki ana bakışaçısına ayrılır (başka bakışaçıları da mutlaka olmakla birlikte). **Faydacı yaklaşım** veya dolaylı etik, İskoçyalı Jeremy Bentham (1748–1832) ve İngiliz John Stuart Mill (1806–1873) adlı felsefecilerle başlamıştır. Bu yaklaşım, bir şey eğer faydalıysa iyidir ve bir davranış "en fazla sayı için en iyi" olduğunda ahlakidir, anlayışını benimser. İkinci temel yaklaşım – **deontolojik (Kantçı) yaklaşım** veya görev etiği – Alman felsefeci Immanuel Kant (1724–1804) tarafından ortaya sürülmüştür. Davranışlarımıza temel almamız gereken görev anlayışının dayanacağı kesin kurallara ve belirli zorunluluklara odaklanır.

Modern biyoetik çok daha yakın zamanların konusudur ve temel olarak iki etikçinin 1970'lerdeki çalışmalarını içerir: Joseph Fletcher ve Paul Ramsey. Bu kişiler, yukarıda sözedilen iki temel yaklaşımı yeniden ele alıp geliştirdiler – Fletcher faydacı (duruma bağlı etik olarak da isimlendirilir) ve Ramsey deontolojik (veya nesnelcilik) yaklaşımları ele aldı.

Faydacılık sonuçları vurgular, planları değil. Diğer bir deyişle burada, "hedefe giden her yol mubahtır". Buradaki düşünce, bir eylemin ne gibi sonuçları olacağını hesaplamak ve farklı sonuçlara birbiriyle karşılaştırarak değer vermektir. Eğer, en fazla sayıda insan üzerinde en olumlu etkiyi yapacak bir eylemin, farklı gidiş yollarını analiz edebilirsek, ne yapmamız gerektiği sorusuna da cevap bulmuş oluruz. Bazı durumlarda bu, karar vermek için zekice bir yoldur. Hedefe götürecek bütün yollar potansiyel faydaları bakımından değerlendirilir ve karar daha nicelikli olur. Bu hesaplamanın dezavantajı, hesaba alınan her şeye bir değer biçme zorunluluğudur. Bu değerleri nasıl belirleriz? Bazıları, yaşamdaki en önemli şeylere (sevgi ve aile) kolaylıkla değer verilemeyeceğini, buna karşın bazılarının (maddi değeri olan mal ve ömür) sayılabilir değeri olduğundan hesaplamalarda daha ağırlık kazanabileceğini söyleyecektir. Kaygı duyulabilecek bir diğer nokta da, bu değer biçme ve hesaplamaları yapan kişidir. Örneğin, eğer faydacı hesaplama, erkeklerin kadınlardan daha değerli olduğuna veya önceliğin kar payı olduğuna inanan biri tarafından yapılırsa, olması gereken değerin altında çıkacaktır.

Deontoloji veya nesnelcilik, bazı mutlakların (tanımlanmış, çiğnenemeyen kurallar) olduğu ve bu mutlaklara bağlı kalmak için ahlaki zorunluluk veya adanmışlıklarımızın olduğu noktasından hareket eder. Genellikle insan hayatının değeri için bahsedilen bir mutlak, Kant'ın ifade ettiği şekliyle: "Kendinde ya da başkalarında daima insan sevgisiyle hareket et, sadece amaca ulaşmada bir araç olarak değil, aynı zamanda amacın kendisi olarak."

Bunu başkalarına saygı anlamı da içerecek şekilde şöyle söyleyebiliriz – başkalarına, onların bize nasıl davranmalarını istiyorsak, öyle davranmalıyız.

Bu yaklaşım çoğunlukla dini geleneklerle ilişkilendirilmektedir. Ancak objektif bir etik yaklaşımı sadece dini yaklaşımlar veya daha da ötesi etik konulara dini bakışın aynı mutlaklardan kaynaklandığını ileri sürmek, yanlış bir varsayımdır. Kuvvetli inanç değimiz şey, bir şahsın bağlı olduğu kişisel referans noktalarıdır. Nesnelliğin bir avantajı, karar vermede kullanılacak basit bir etik formül yoluyla, etik karar gerektiren birçok durum için belirgin kurallar getirir. Bu yaklaşımın olumsuz yanı, neyin önemli olduğunu veya değerlerdeki olası değişiklikleri dikkate almadığı için, karar verme sürecinde çok katı olabilir ya da en azından öyle algılanabilir. Kesin fikir veya mutlağın olmadığı durum veya olaylar olabilir. Bu durumlarda ahlaki zorunlulukları tanımlamak ve davranış biçimini kavramak için olayın daha detaylı incelenmesi gerekebilir.

Faydacılıkla nesnellik arasındaki farklılıkları anlatmak için, son derece aç ve yiyecek alacak parası olmayan birini düşünün. Bir dükkânın yanından geçerken, masanın üzerine bırakılmış bir dilim ekmek görür. Faydacı bir hesaplama, kişinin ihtiyacını, elaltındaki yiyeceği ve dükkânın bu çok küçük değerde olacak kaybını dikkate alarak, ekmeğin alınmasını onaylayacaktır. Nesnel yaklaşım, "çalmak yanlıştır" mutlağına sahip olduğundan, ekmeğin alınmasını etik bulmayacaktır.

Burada bahsedilen iki ana yaklaşımının dışında başka etik yaklaşımların da olabileceğini dikkate alın. Hatta bu iki yaklaşım bazı etik karar süreçlerinde karma olarak uygulanabilir. Etik karar yaklaşımlarında temel hedeflerden biri, bilgi toplamak, gerçekleri dikkate almak ve düşünülmüş, bilinçli bir karara varmaktır. Etik olarak tartışmalı kararlar üzerindeki çatışmalarda, diğer kişinin kararını küçümsemek veya alay etmek, ne akıllıca ne de incelikli değildir. Davranışlarınızın etkilerine karşı duyarlı olun. Kendi etik kararlarınızı mantık çerçevesinde yorumlamayı ve savunmayı hedefleyin, başkalarının kararlarına saygı duymaya çaba gösterin.

Bir olayın olabilirlik tahmini, **istatistikî olasılık**, etik karar vermede akılda tutulması gereken diğer bir önemli kavramdır. "Kötü" bir olayın olması olasılığını doğru şekilde belirlemek çok önemlidir. Diğer bir faktör, gerçekleşecek olayın negatif etkilerinin nasıl olacağıdır. Bazı sonuçların ortaya çıkması zaman aldığından, bir sonucun gerçekleşme olasılığının dikkate alınması gerekir.

Biyoetikçiler ve bilim insanları **risk değerlendirmeleri**, zararlı veya beklenmeyen şeylerin olma olasılıkları için sıklıkla istatistik ölçümler kullanırlar. Risk değerlendirme günlük hayatta sizlerin karar verme süreçlerinizin de bir parçasıdır. Örneğin, arabanızı kullandığınız her seferde bir kazaya karışmanız riski olduğunu bilirsiniz. Araba kullanmaktan korkmadığınızı düşünürsek, risk değerlendirmeniz size muhtemelen, kazaya karışmanız olasılığının gitmek istediğiniz yere arabayla gitme ihtiyacınızdan yüksek olmadığını söylüyordur. Cep telefonu kullanma, havayoluyla seyahat, içki içme, antibiyotik kullanmanın riski-faydası, aşılar ve diğer ilaçlar (yan etkileri) veya kötü beslenme seçeneklerinin hepsi günlük hayatınızdaki risk değerlendirmelerinin güzel örneklerindendir.

Etik Uygulama Canlandırması

Aşağıda zor etik kararlar vermeyi gerektiren tipik bir senaryo okuyacaksınız. Okuyacağınız durum biraz şiddet içeriyor, çünkü ölüm-kalım senaryosu. Geliştirilen bazı biyoteknolojiler hayat ve ölüm konularıyla da uğraşır ve geniş kapsamlı sonuçlar taşır.

Bir aile Grand Kanyon yolunda arabalarını kenara çekerler. Ebeveynleri, üç küçük çocuklarını arka koltukta uyur bırakarak, arabayı kilitler ve içecek bir şeyler almaya giderler. Fakat el frenini düzgün bir şekilde çekmezler. Arabadan biraz uzaklaştıklarında, araç uçurumun kenarına doğru hareket etmeye başlar. Arabanın hareket ettiğini gören tek kişi sizsiniz. Arabanın yöneldiği yerin yakınında iri cüsseli bir adam durmakta. Onu arabanın önüne iterek aracın hareketini durdurabilirsiniz, ancak bu durumda adam ya ezilecek ya da uçurumun kenarına itilecek. Ne yapardınız?

Öncelikle, bu olaydaki tüm verilere sahip misiniz? Anlattıklarımızla biz size sadece iki seçenek sunan senaryo verdik; arabanın uçuruma doğru gitmesine izin vermek veya bir adamı üç çocuk için feda etmek. Soru basitçe şöyle sorulabilir "Bu adamın hayatını çocuklarınkiyle takas edebilir misiniz?" Faydacı bir yaklaşım bunu bir etik ticaret olarak değerlendirebilir ve üçünü genç olarak ele alır; nesnelci bir yaklaşım,



TİCARET ARAÇLARI

Dikkatli Düşünme ve Açık Fikir Biyoetik İçin Güçlü Araçlardır

Biyoteknolojinin çeşitli laboratuvar ve endüstriyel uygulamalarının aksine, biyoetik herhangi bir özel ekipmana gerek duymaz. Temel ticari araçlar, mantık ve açık, araştıran bir zihindir. Biyoetikçiler bir olayı, tüm olasılıkları düşünerek, farklı açılardan dikkatlice inceleyebilecek yetenekte olmalılar. İncelemelerine tıbbi, dini, felsefi, yasal, bilimsel ve sosyal kaygıları dâhil etmeleri gerekir. Biyoetikçiler ayrıca meraklı ve araştırıcı, açıklık getirici sorular sorabilen ve kaygıların temelinde ne gibi faktörler olduğunu belirleyebilen kişiler olmalıdır. Bir konunun arka planını değişik açılardan derinlemesine araştırmak için kapsamlı bir literatür taraması yapmayı gerekli görebilirler. Bütün değerlendirme kaynaklarına veya literatüre tek dilden ulaşılamayacağı için, dil yetenekleri ek bir kazanç olabilir. Sorunların çözümü için olası sonuçları seçmek ve potansiyel yolları belirlemek, sabır kadar akıl ve mantık da gerektirir. Modern dünyada düzenleyici kurumlar ve yasalar hakkındaki bilgi de çok önemlidir. Bunun anlamı, biyoetikçilerin mevcut yasa ve düzenlemeleri sadece anlayabilmeleri değil, etkili düzenleme ve yasaların yapılabilmesi için karar alıcılarla etkileşim içinde olmalarının da gerektiğidir. Son olarak; kişiler arası iyi iletişim yeteneklerine (sözlü ve yazılı) sahip olmak, kaygıları, soruları ve sonuçları ilgili tüm tarafların anlayacağı şekilde açıklıkla ortaya koymak için çok önemlidir.



KARARI SİZ VERİN

Doğru veya Yanlış?

Küçük bir biyoteknoloji kurucu şirketi başkanı (CEO), şirketinin geliştirdiği umut veren bir kök hücre klonlama teknolojisiyle ilgilenen büyük bir biyoteknoloji şirketiyle, milyon dolarlık bir birleşme pazarlığı yürütmekte. Ancak CEO bu teknolojinin son zamanda ortaya çıkan önemli bir probleminin de farkında. CEO problemden bahsedip birleşmeyi tehlikeye sokmalı mı, yoksa problemden hiç bahsetmeden birleşme işlemlerine devam mı etmeli? Kararı siz verin.

sonucu ne olursa olsun, herhangi bir hayatı tehlikeye atmanın veya sona erdirmenin yanlış olduğunu değerlendirebilir. Olası başka seçenekler veya alternatifler var mıdır?

13.2 Etik ve Biyoteknoloji

Doğa insanlardan çok daha uzun zamandan beri biyoteknoloji denemeleri yapıyor. Bakteriler birbirleriyle plazmid alışverişi yapıyor; daha önce olmayan gen kombinasyonları veya yeni genlerin sentezlenmesi yolunu açan rekombinasyon ve mutasyonlar oluyor. Bütün bunlara rağmen, işin içine insan karıştığında ve yeni genetik kombinasyonlar yaratmaya başladığında, oyunun kuralları değişiyor. Bölüm 3'te tartıştığımız gibi, yeni bir yöntem olan rekombinant DNA teknolojileri konusunda duyulan kaygılar nedeniyle, bilim insanları 1975'te Asilomar, California'da bir konferansta bir araya geldiler ve bu yöntemin güvenliği ve olası sonuçları değerlendirilene kadar **moratoryum** (tüm araştırmaların geçici olarak durdurulması) ilan ettiler. Genetiği değiştirilmiş bakterilerin laboratuvardan çevreye yayılabileceği ve yeni hastalıklara yol açabileceği, eski hastalıkları daha virülent kılabileceği veya ekosistem değişikliğine neden olarak bazı türlerin yok olması yolunu açabileceği gibi temel kaygıları tekrar hatırlayalım.

Sonuçta bilim insanları, rekombinant DNA teknolojisinin, bilimsel çalışmalar devam ederken aynı zamanda insan ve çevrenin güvenliğini de koruyarak kontrol edilebileceğini belirlemişlerdir. Özellikle, kullanılan deneysel sistemin taşıdığı tekhlikelere bağlı olarak ortaya çıkan farklı düzeylerdeki biyogüvenlik kapsamları için, kılavuzlar geliştirilmiştir. Örneğin, patojen olmayan bakteriler ve patojen olmayan gen dizilerinin deneyleri için enaz düzeyde güvenlik donanımı gerekir. Buna karşın bilinen patojenler, insan hücreleri veya potansiyel patojenik genlerle yapılan deneylerde daha zorlayıcı içerikte güvenlik yöntemlerinin kullanılması gerekir.

Hücre ve Ürünleri

Kitap boyunca tartıştığımız gibi, hem bakteriler hem de ökaryotik hücreler, yabancı gen ve proteinleri sentezlemek için genetik olarak düzenlenebilirler. Bunun, özellikle sağlık alanında önemli ürünlerin üretilmesinde, vazgeçilemez bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır. Bireysel hücrelerin genetik modifikasyonları ve bu değişimlerin sonucu olarak ortaya çıkan ürünler ile ilgili etik zorlukları düşünün.

Bir ürün, terapötik rekombinant protein gibi insan uygulaması içinse, sadece güvenlik değil ayrıca amaçlanan kullanımı için **etkinlik** veya yararlılığı da düşünülmesi gereken bir kıstastır. Bu durum özellikle hedeflenen hasta için önemlidir çünkü hasta etkili bir tedavi ister. Ancak etkinlik imalatçı için de önemlidir; eğer ürün etkili değilse, çok büyük bir ekonomik kayıp söz konusu olabilir. Herhangi bir ilaç için önemli bir diğer konu da, ilacın hangi dozda, en az yan etki ve toksisite ile etkili olacağıdır. Sonuçta, ilacın herhangi bir **kanserojenik** veya **teratogenik** etkisi olup olmadığının ortaya konması önemlidir. Bu konuların göz önünde tutulması gelecekteki problemleri – ilacın belli bir dozunun hastalığı tedavi edici özelliği varken, diğer dozlarda hastanın ölümüne veya kansere veya doğum anomalilerine yol açması gibi – önleyecektir. Çünkü bunlar hastaya yardım etmek yerine zarar verdiğinden etik kaygıları artırmakta ve hastaların kendilerini ilaç testlerinde kullanılan kobaylar gibi görmelerine yol açmaktadır.

Klinik öncesi çalışmalarda kullanılan hayvanlara **insanca muamele** konusunda da bilinçli olmalıyız. İlacı test etmek için enaz kaç tane deney hayvanına gerek olacağını, testler için ne tip uygulamaların gerekli olacağını, farelerin mi maymunların mı kullanılacağını belirlememiz gerekir. Testlerde seçilen tür ilacın aksiyonunu etkileyebilir. İlaç aksiyonunda tür farkının gözlendiği en iyi örneklerden biri, zayıf bir yatıştırıcı olarak geliştirilen **thalidomide** adlı ilaç olmuştur. Bu ilaç standart laboratuvar fareleriyle test edilmiş ve güvenli bulunmuştur. Ancak bu yatıştırıcıyı kullanan birçok hamile kadının ileri düzeyde sakat bebekler doğurduğu görülmüştür. İlaç marmosetlerde (bir çeşit maymun) denendiğinde, insanlarda görülene benzer doğum kusurları görülmüştür. İlaç metabolizmasının türler arasında farklı olabileceği anlaşılmıştır. İnsan deneyleri sorunlarını daha sonra ayrıntılı göreceğiz, fakat etki bakımından karşılaştırıldığında insan ve hayvandaki sonuçların farklı olabileceğini her zaman aklımızda tutmamız gerekir.

GD Bitkiler: Ne Yersen O musun?

Genetik mühendisliğindeki en temel ilerleme ve aynı zamanda da en büyük tartışma **genetiği değiştirilmiş (GD) organizmaların**, özellikle GD bitkilerin, üretimi konusundadır. Burada amaç, hastalık ve zararlılara veya zor iklim koşullarına dayanabilen bitkiler geliştirerek, bitkisel üretimi artırmaktır. Buna rağmen birçok kişi GD bitkilere ve genetiği değiştirilmiş gıdaları tüketmeye karşı tavır sergilemektedir.

GD ürünler ve bitkiler birçok bakımdan kaygı vermektedir. Bunlardan ilki, bitkinin kendisidir. Bitkinin genetiğinde yapılan değişikliklerin o bitkiye bir yararı olup olmadığının, en azından daha güçsüz bir bitki olmayacağının, bilim insanlarınca belirlenmesi gerekir. Bu değişiklikler yapılırken türlerin bütünlüğünün (bir türde büyük değişiklikler yapmadan orijinal genetik kompozisyonun sürdürülmesi ve türün aynı kalması) bir şekilde korunup korunmayacağının cevaplanabilmesi gerekir. **Türlerin bütünlüğü** önemli mi değil mi veya "daha iyi" bir bitki türü yaratmak "eski tür"ü sürdürmeye çalışmaktan daha iyi mi değil mi, kendi değerlendirmenizi yapın. Bunu yaparak, canlıların genetiğini değiştirmenin – burada söz konusu olan bitkiler gibi – herhangi bir etik kuralı çiğneyip çiğnemediğine kendiniz karar verin.

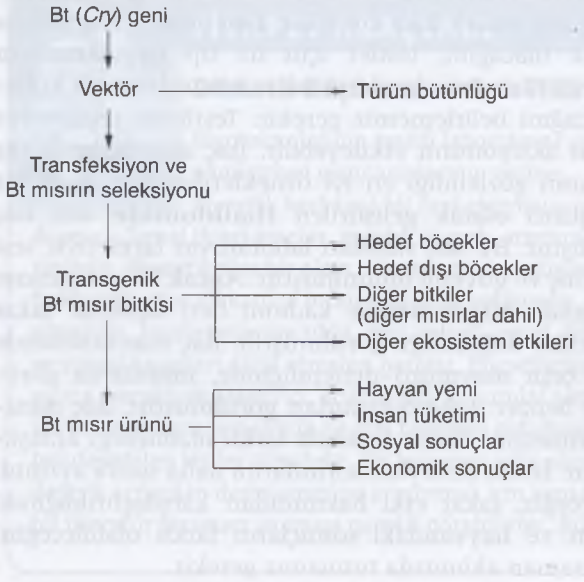
Birinciden daha kapsamlı ikinci bir soru da, değiştirilen bitkilerin ekosistem ve tüm **biyoçeşitlilik** (bir ekosistemde varolan farklı türlerin çeşitliliği) üzerindeki olası etkileridir. Genetiği değiştirilmiş bitkinin salındığı çevreye etkisini belirlememiz gerekir. Kültür bitkileri üzerine odaklandığımız için, beklenen iyi etkiler sadece GD kültür bitkilerinin yetiştirilme ve üretimlerinin artırılması değil, aynı zamanda potansiyel zararlı ve hastalıkların yol açabileceği zararları da azaltmak olacaktır.

Roundup-Ready soya buna bir örnektir. Bu soya çeşidi Roundup herbisitine dayanıklılık için genetik olarak modifiye edilmiştir. Böylece çiftçiler soyaya zarar vermeden tarlayı ilaçlayıp, ürünlerinin gelişmesini engelleyen zararlı yabancıotları öldürebileceklerdir. Diğer bir örnek ise Bt mısırdır (**Şekil 13.2**). Bölüm 6'dan hatırlarsak, bu GD bitki *Bacillus thuringiensis* bakterisinin, mısırdan beslenen koçan kurdu ve diğer böcekleri öldüren bir toksinini üretmek üzere, genetik olarak modifiye edilmiştir.

KARARI SİZ VERİN

Alıcı Sakınmalı mı?

GD gıdaların olası güvenliği konusundaki toplumsal kaygı nedeniyle, tüm GD gıdaların, çok az miktarda GD ürünü içerseler bile, belirgin biçimde etiketlenmesi teklifleri yapılmaktadır. Test ve etiketleme maliyeti bu gıdaların fiyatını önemli oranda artırabileceğinden, güvenlik nedeniyle etiketlemeye gerçekten gerek var mı, tartışılmaktadır. Halkın GD gıdalar için duyduğu korku, tüketiciler için bütün bu ürünlerin etiketlenmesini gerekli kılar mı? Bu iyi bir pazarlama planı mıdır? Kararı siz verin.





ŞEKİL 13.2 Bir GD Bitki, Bt Mısır, Hakkında Olası Etkileşim ve Düşünceler
Bt-modifiye bitkiler, pamuk kurdu (üstteki resim) ve mısır koçan kurdu gibi zararlılara karşı bitkileri korumak için tasarlandılar; ancak kullanıldıktan hemen sonra kral kelebeği (alttaki resim) gibi hedef dışı böceklere olası etkileri konusunda kaygılar arttı.

Bazı araştırmalar Bt bitkilerin kral kelebekleri üzerinde, bunlar hedef böcek olmadığı ve mısırdan beslenmedikleri halde, toksik etkileri olabileceğini göstermektedir. Bu nedenle toksinin belli bir türe ait böceklerde mi yoksa daha geniş bir gruba mı etkili olduğunu ve hedef dışı böceklerin etkilenip etkilenmeyeceklerini de bilmek önemlidir. Dikkate alınan diğer bir soru, toksinin yayılabilir mi yoksa sadece mısırla mı sınırlı kalacağı olmuştur. Çünkü mısır yabancı döllenir ve polenleri rüzgârla diğer bitkilere taşındığından, uzak mesafelerdeki bu bitkiler de bazı böceklere toksik etki yapabilir. Araştırıcılar bunun gerçekleşme olsalığını da belirlemek zorundadırlar. Kral kelebekleri için yapılan bir çalışmada, mısır polenlerinin GD mısır yetiştirilen tarlanın yanındaki tarlada bulunan ipekotu bitkilerine (kral kelebeklerinin besin kaynağı) rüzgârla taşınabileceği gösterilmiştir. İpekotundan beslenen kral kelebekleri bu polenleri (ve de toksini) de içine çekebilir. Bilim insanları bunun gerçekleşebilecek bir olay olup olmadığını ve ne kadar polenin dolayısıyla toksinin bir kral kelebeğini öldürebileceğini sorgulayan çalışmalar da yapmışlardır. Siz de benzer soruları cevaplayabilecek denemeleri nasıl düzenleyebileceğiniz konusunda düşününüz. Son yıllarda yapılan birçok uzun vadeli çalışmada, Bt mısırın kral kelebekleri üzerinde olumsuz etkisi olmadığı gösterilmiştir.

Bt mısır ve kültürü yapılmayan diğer bitkiler arasındaki gen transferinde (örneğin, diğer bitkilerin toksin genini alması ve kral kelebekleri gibi böcekleri öldürmesi) yabancı döllenmenin etkisi olabilir. Böyle bir şeyin gerçekleşebilme olasılığını dikkate almak zorunda olacaksınız. GD bitkilerin doğal çevreye salımı sorusu, ekosisteme uzun dönemde getireceği değişiklikler ve biyoçeşitlilik üzerine etkileri bakımından, dikkatlice, ince eleyip sık dokumayı gerektirir. Değerlendirilecek diğer bir etken, GD bitkilerin üretim alanları ötesine yayılmaları konusudur.

Tartışılacak diğer bir soru, GD bitkilerin ürünleridir; bunların nasıl kullanılacağını, hayvan yemi olarak güvenli olup olmadıklarını, insanlar için güvenli olup olmadıklarını araştırmak zorundayız. Bütün gerçekleri bir araya toplayarak, bilinçli değerlendirmeler yapmak zorundayız. Toksinle böcekler hedeflendiğinden, insan veya hayvanları etkilemesi olası görünmüyor. Fakat bu çıkarımı yapmak yeterli değil; güvenli olduğunu gösterecek kanıt ve testlere de ihtiyaç vardır. Bir GD ürünün güvenli olduğunu test etmek için yapabileceğiniz bazı denemeler düşünün. Sorun olan özel bir gen üzerine odaklanmamalı, GD bitkide dikkate almamız gereken başka gen ve ürünlerin olup olmadığını da sormalıyız. Örneğin, birçok uygulamada genetiği değiştirilmiş hücreler için antibiyotiklere dayanıklılık genleri seleksiyon markörü olarak kullanılmaktadır. Bu genler GD bitkilerde varlıklarını korumakta mıdır? Eğer öyleyse, bu genler yediğimiz yiyecekten bağırsak bakterilerine geçer mi? Yine, DNA veya proteinlerin sindirimde bozulmadan kalma olasılıkları nedir, sorusunu sormalıyız. Şekil 13.2, olası interaksiyonlar ve dikkate alınması gereken konulardan bazılarını göstermektedir. GD bitki hasat edildikten sonra, bu bitkiden alınan ürünün karantinaya tabi olup olmayacağını da belirlememiz gerekir. Bu da bizi tekrar güvenlik sorumuza getirir, özellikle bu ürünle insan teması veya tüketimi açısından.

Akılda tutulması gereken bir konu da, Bt toksinin gıda hazırlama aşamalarında bozulmadan kalıp kalmayacağı ve hala alerjik reaksiyonlara neden olup olmayacağıdır. Bazı ülkeler GD bitkilerin ithalatına çok katı sınırlamalar getirmiştir ve genetiği değiştirilmiş bitkilerden elde edilen gıdaların bu durumunu belirtecek şekilde etiketlenmelerini destekleyen bir yönelim vardır. Bazıları ise, eldeki verilere dayanarak, bu sınırlamaların bir geçerliği olmadığına ve tüketicileri gereksiz yere korkuttuğuna inanmaktadırlar. Pizzanızda veya mısır gevreğinizde "GD" etiketi gördüğünüzde sizin reaksiyonunuz ne olurdu?

GD bitkilerin olası kullanımları ayrıca sosyal ve ekonomik soruları da beraberinde getirmektedir. Bitki-



KARARI SİZ VERİN

Genetiği Modifiye Edilen Böceklerin Salımında Halka Danışılmalı mı?

Aralık 2010'da, Malezya'da 6 000 kadar GD sivrisinek tasarlanarak insansız bir orman alanına salındı – yerel halkın ve uluslarası takipçilerin bilgisi dışında. Malezya denemesi, *Aedes aegypti* adlı sivrisinek tarafından taşınan bir virüs hastalığı olan, dang ateşinin kontrol edilmesi amacıyla yapılmıştı. Dang virüsü 100 ülkeye yayılmış ve Dünya Sağlık Örgütü (WHO) dang enfeksiyonu riski taşıyan yaklaşık 2.5 milyar insan olduğunu bildirmektedir. Dang virüsü dünyanın bazı bölgelerinde çocuk ölümlerinin ana nedenidir. Dang ateşi yetişkinlerde, bazen ölüme yol açabilecek, ağır ve sancılı grip benzeri semptomlar gösterir. Daha önce İngiliz biyoteknoloji şirketi Oxitec, dang-taşıyıcı böcek populasyonlarını kontrol altına almak için yapılan dünyanın ilk GD sivrisinek alan denemesinde, Seymen Adaları'nda 2009 ve 2010 yıllarında 3.3 milyon GD sineği salmıştı. Şirket, Seymen Adaları'ndaki denemelerinde sinek populasyonunun yaklaşık % 80 azaldığını iddia etmektedir. Her iki olayda da halk ve hatta alandaki araştırıcılar, denemenin sonuçları açıklanana kadar salım konusundan haberdar olmamıştır. Bu gibi deneylerde halkın bilgilendirilmesi konusunda bir prensip bulunmamaktadır. Olmalı mıdır? Halka sadece GD böceklerin salındığı bilgisini vermek yeterli midir? Kararı siz verin.



KARARI SİZ VERİN

Yatırımda Geri Kazanım Ne Kadar Olmalıdır?

St. Louis, Missouri merkezli Monsanto şirketi, Roundup-Ready soya bitkisini geliştirdi. Bu soyanın genetiği, Monsanto'nun hemen her bitkiyi öldüren total herbisiti Roundup'a dayanıklı olacak şekilde değiştirilmiştir. Roundup-Ready soya tohumları, diğer geleneksel soya tohumlarından daha pahalıya mal olmaktadır. New Jersey'deki çiftçilerin bir önceki yıl hasat ettikleri Roundup-Ready tohumlarını tekrar kullandıkları konusundaki raporu soruşturmak için Monsanto özel dedektifler kullanmıştır. Bir önceki ürün hasadından elde edilen tohumu kullanmak birçok çiftçi için genel bir uygulama ve onlara yeni ürün için tohum parasından tasarruf sağlamaktadır. Monsanto, geliştirdiği teknoloji için çok büyük yatırım yaptığından, çiftçilerin Roundup-Ready tohumlarını her yıl yeniden satın almalarını istemiş, fakat çiftçiler tohumlarını tekrar ekemeyeceklerinin kendilerine hiçbir zaman söylenmediğini ifade etmişlerdir. Monsanto geliştirdiği ileri teknoloji ürünü pahalı tohumların çiftçiler tarafından bedava kullanıldığını iddia etmektedir. Çiftçilere geleneksel uygulamaları olan tohumlarını yeniden kullanma izni verilmeli midir? Bunun yerine, biyoteknoloji şirketlerine ürünlerinin kullanımına sınırlama getirme hakkı mı tanınmalıdır? Kararı siz verin.

leri daha az maliyetle, daha iyi üretim için modifiye edebilme yetisi, tarım sektörünü de tamamen değiştirebilir. Potansiyel olarak, hem tüketiciler hem de üreticiler için, azaltılmış bir maliyetle daha bol gıda elde etmek mümkün olabilir. Bu avantajlar belki daha önce bahsedilen güvenlik kaygıları gibi potansiyel dezavantajlarla dengelenir. GD bitkilerin diğer bir potansiyel kullanımı, tıbbi olarak kullanılan bileşiklerin üretimini içerir. Bu bileşiklerin kullanımında etik değerlendirmeye anahtar olacak konular yine güvenlik ve etkinlik olacaktır. Mevcut ABD politikası, tıbbi bileşikler için sadece olağan güvenlik ve etkinlik testlerini değil, aynı zamanda GD bitkilerin yetiştirilmesinin sınırlandırılmasını da gerekli kılmaktadır. Tarlaların etrafına GD bitkinin tozlaşma yapamayacağı bitkiler ekilmeli, bütün bitki materyali hasatta tarladan uzaklaştırılmalı ve tarla hasattan sonra birkaç yıl kullanılmamalıdır.

Hayvancılık mı, Hayvanları Değiştirmek mi?

Hayvanların genetik modifikasyonu, bitkilerin genetik modifikasyonunda bahsedilen birçok sorunun aynısını ortaya çıkarır. Hayvancılıkta biyoteknolojinin ilk uygulamaları, yemlerde antibiyotik katkısı ve hayvan büyümesini artırmak için büyüme hormonu veya steroidlerin enjeksiyonu şeklinde olmuştur. Bu katkıların uygulanışını etik bakış açısı ile değerlendiriniz. İlk olarak, bunlar tarımda kullanılan hayvanlar olduğundan, bu hayvanların ürünleri (süt, et, vb.) üzerinde genetik modifikasyonun etkileri ve insan tüketimine sunulan bu ürünlerin güvenilirliği, temel kaygılar olmuştur. Kaygının biri, bu katkıların (özellikle hormonların) hayvanda ne kadar süreyle devamlılık göstereceğiydi – yani bu hayvansal ürünler insan tarafından tüketildiğinde hala var olup olmayacakları. Eğer öyleyse, bilim insanları, tüketici üzerinde bir etkileri olup olmayacağını, herhangi bir pişirme veya sindirim işlemleri sırasında varlıklarını devam ettirip ettirmeyeceklerini belirlemek zorundalar.

Tarımı yapılan GD hayvanların çevreye etkileri konusunda çok az kaygı dile getirilmekle birlikte, türlerin bütünlüğü ve hayvanların sağlığı da hala insan tüketiminde kullanılan hayvansal ürünlerin güvenilirliği kadar sorgulanmaktadır. Benzer kaygılar, tıbbi olarak kullanılan ürünleri üretmek üzere genetiği değiştirilen hayvanlar söz konusu olduğunda da duyulmaktadır. Bu hayvanlara örnek olarak, sütlerinde pıhtılaşma faktörü üretmek üzere genetiğine müdahale edilenler, organları insanlara nakledildiğinde reddedilmemesi için insan genleri taşıyan domuz gibi transgenik hayvanlar veya et üretimi için klonlanan sığırlar verilebilir. Çinli bilim insanları insan sütü üreten transgenik inekler yarattılar. Bir hayvanı böyle değiştirmenin hangi noktada etik olmayacağını düşünürdünüz?

Bir hayvanı insan olarak değerlendirmenize yol açacak, belirli sayıda insan geni, hücresi veya insana özgü bir niteliği gösterdiği, belli bir sınır olup olmadığı konusunu dikkate alınız. Bu durumun, o hayvanın araştırma amaçlı kullanımında, sizin etik bakış açınızı değiştirip değiştirmediğini değerlendiriniz. Şekil 13.1'e tekrar bakınız. Kısa süre önce İngiliz ve Fransız bilim insanları, fare hücrelerinin tavuk hücrelerindeki gelişimsel sinyalleri algılayarak diş oluşumunu başlatacağını göstermek için, fare hücrelerini tavuk embriyosuna naklettiler. Bu durum biyologların ilgisini çekmekte çünkü bu gelişimsel sinyalleri yöneten genler kuşlarda aktif olmamasına rağmen (kuşlarda dişler yaklaşık 70-80 milyon yıl önce kayboldu), bu genlerin aktive edilebileceği ve uygun hücreler varsa diş gelişiminin başlatılabileceği gösterilmiş oldu. Ne çıkar bundan? Dişleri olan tavuk yapmayı kim ister? Bunlar güzel sorular ve bu tür deneylerin hayvanların etik kullanımı olup olmadığını kesinlikle sorabilirsiniz. Fakat bu denemelerden elde edilen bilginin öncelikle, diş gelişimi konusunu aydınlatmak ve gelecekte insanlarda diş oluşumu, yenilenmesi ve protez için yeni tedaviler geliştirme – ki bu araştırmanın temel nedeniydi – potansiyeli olduğunu da değerlendirin.

Bölüm 10'da açıklanan, alabalık gibi hayvanların yabani türlerinin genetik modifikasyonu da etik soruların, çevresel kaygılarla birlikte, diğer bir setini sunmaktadır.

Yapay Genomlar ve Yapay Biyoloji

Yapay genom araştırmaları, bir yapay genomun bir bakteri suşuna transplantasyonuyla sonuçlanmıştır. Burada yapılan, alıcı organizmanın genomunun donör organizmanın yapay genomuyla değiştirilmesidir (Bölüm 5). Yapay biyolojinin bu ve gelecekteki diğer uygulamaları, yapay genomlarla ne yapılmalı ne yapılmamalı ve yeni hayat formları yaratmada bunların potansiyel kullanımları hakkında, birçok etik soruyu da beraberinde getirmektedir.

İnsanlık Sorusu

Biyoteknoloji ilişkili en zorlu soruların çoğu ve en çekişmeli tartışmalardan bazıları insanlar etrafında döner. Basit bilimsel uygulamalar bile, konu insan olduğunda, güçlü duygular uyandırır ve derin tartışmaları harekete geçirir. İnsanların deneysel olarak kullanılması veya kullanılma olasılığı sizce niçin böyle güçlü reaksiyonlara neden olmaktadır? Önemsiz görünen insan nedir sorusunun bir tartışma alanı haline nasıl geldiğini daha sonra inceleyeceğiz.

Şimdi, biyoteknoloji yoluyla üretilen potansiyel bir kanser ilacını temel alan, basit bir örneğe bakalım. Bu ilacın klinik deneylerde kullanılmaya hazır olduğu aşamaya kadar geldiğini varsayalım. Testlemede ilacı kimlere uygulayacağımıza karar vermeliyiz. Bu bir kanser önleyici ilaç olduğundan, doğal olarak, ilacın hedef aldığı kanser tipine yakalanmış hastalara vereceğiz ilacı. Bununla birlikte, ilacı bu kanser tipine sahip tüm hastalara mı yoksa sadece hastalığın en ileri aşamasındaki hastalara mı – diğer bütün tedavi uygulamalarından olumsuz sonuç almış ve yeni ilacı son çare olarak görenler – vereceğimizi kararlaştırmalıyız. Kararın gerekçesi, bu hasta grubu için olası başka bir tedavi yolunun olmamasıdır; böylece deneysel uygulama en azından bir umut sunmaktadır. Buna rağmen, ilaç kanser gelişiminin erken evresindeki hastalarda daha iyi çalışabilir ve böylece daha etkili olabilir. Yine de, hastalığın erken evresindeki hastalar, güvenilirlik ve etkinlikleri (bir yere kadar) kanıtlanmış diğer alternatiflere de sahiptirler.

Klinik deneyler için hasta grubunu seçmenizden sonra diğer bir ikilemle karşılaşırsınız. Hastalar, deneysel uygulamanın iyi ve kötü tüm potansiyel etkileri konusunda bilgilendirilme hakkına sahiptirler. Sadece bu şekilde bilgilendirildikleri zaman deneylerde gönüllü katılımcı olabilirler. Buna **bilgilendirilmiş onay** denir. Hastalar, ilerde karşılarına çıkacak potansiyel fayda ve riskler konusunda tüm bilgilere sahip bir şekilde, deneyleri sürdürmek için onaylarını verirler. Bilgilendirilmiş onay anlayışı insanın yer aldığı herhangi bir uygulamada zorunludur. Eğer bir hasta kendi kendine onay verecek konumda değilse (örneğin yaşı küçük veya komada), aileden biri veya vasisi vekâleten onay verebilir. Bilgilendirilmiş onayın niçin çok önemli olduğunu kendiniz de değerlendirin.

İnsanlar üzerindeki deneysel uygulamalar söz konusu olduğunda, **plasebo**lar diğer bir problem olarak karşımıza çıkar. Plasebo-kontrollü çalışmalarda standart bilimsel uygulama; bir deneysel grubun (bu olayda, ilacı kullanacak hastalar) ve bir plasebo-kontrol grubunun (bu olayda, plasebo – şeker kapsülleri veya tuz içeren bir enjeksiyon gibi güvenli fakat etkisiz bir uygulama – kullanacak hastalar) yer alması şeklindedir. Tamamen tesadüfi olarak oluşturulan bir **çift kör deneme**de, ne hastalar ne de tedaviyi uygu-



KARARI SİZ VERİN

Klinik Deney Verileri Topluma mı İlaç Şirketine mi Ait Olmalıdır?

Hasta ve hekimlere en son yapılan klinik deneyler hakkında bilgi sağlamada yardımcı olmak için, Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) 2002 yılında, Clinicaltrials.gov adresini faaliyete geçirdi. Mevcut kayıtlar 174'ten fazla ülkeden 108 400'ün üzerinde klinik deneye ait bilgileri içermektedir. Bu kayıtlar, işle ilgili hassas bilgileri ele verebilecek erken dönem denemelerini içermediğinden, birçok biyoteknoloji ve ilaç şirketi tarafından gönüllü olarak kullandırılmaktadır. Devlete ait veri tabanlarındaki klinik deney sonuçlarının açıklanmasını zorunlu kılmak için hazırlanan bir kongre yasa tasarısı (S.467 – Klinik Deneylere Eşit Erişim Yasası; FACT Yasası) yıllarca tartışıldı. Bazıları bu bilginin hastaların klinik deneylerde yer alıp almamaya karar vermelerine yardımcı olacağını savlamakta, fakat ilaç endüstrisinden bazıları bunu gereksiz bulmakta ve yeni buluşları baskılayacağını ileri sürmekteler.

FACT Yasa tasarısı hiçbir zaman kanun olarak geçmedi. Tasarı, az sayıda hastanın yer aldığı faz 1 denemelerinde elde edilen bilgiye açık erişimin gerçekleşmesini önermekteydi. Yine de, endüstri sözcülerinin bazılarına göre, bu çeşit bir bilginin hastalar için fazla bir değeri olmayacaktı. Tasarının savunucuları, erken dönem denemelerin paylaşımının, olumsuz etkisi olmuş hataların yeni ilaçlarda tekrarlanmasını önleyerek, şirketlere yarar sağlayabileceğini ileri sürmekteler. Bu konuda endüstrinin savunması ise; biyoteknoloji şirketleri risk sermayesi kaynaklarına dayanırlar ve eğer veriler diğer şirketlerle paylaşılırsa, yeni buluşlar için sağlayacakları kaynaklar kesilecektir. Sağlanacak fayda, ilaç araştırma fonlarının kesilmesi riskine değer mi? Daha iyi bir çözüm var mı? Kararı siz verin.

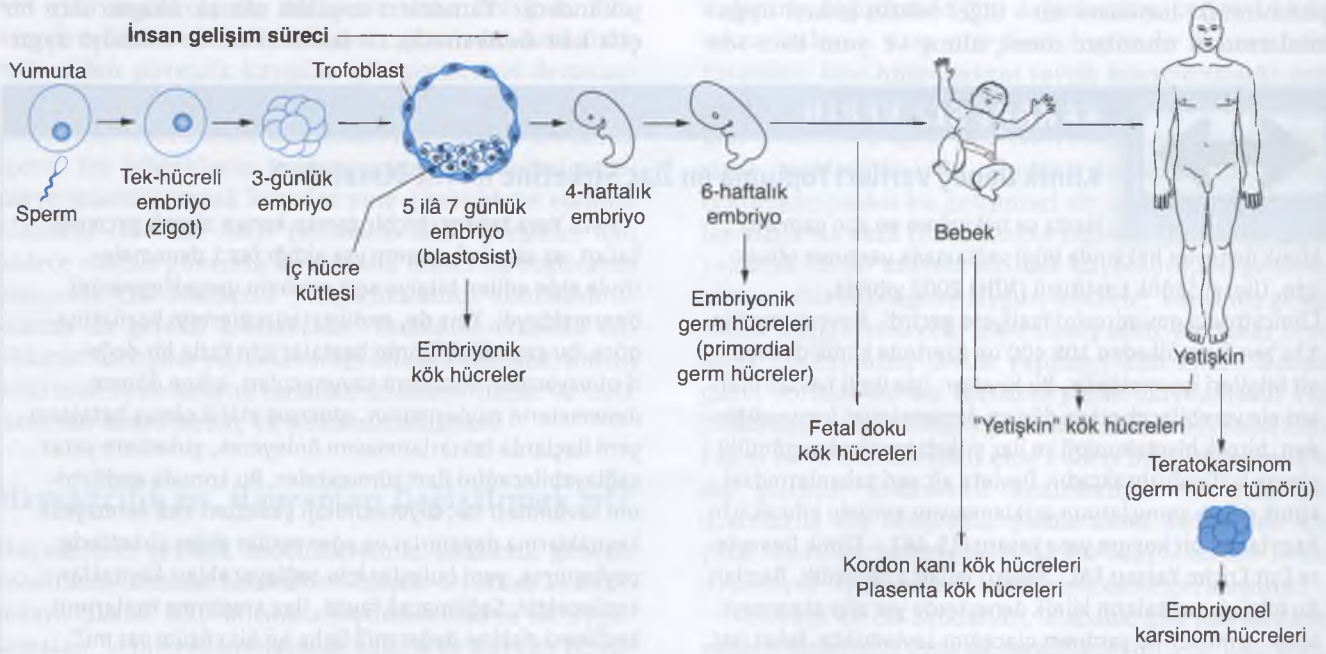
layan doktorlar kimin gerçek ilacı kimin plaseboyu almış olduğunu bilmeyecektir. Bu tip denemelerde bilgilendirilmiş onayın bir rolü olacaktır. Plasebo kullanmak objektif bilimin bir parçası, ancak bunun etik olup olmadığına da bakmalıyız. Tarafsız bilim her zaman en iyi yaklaşım veya etik yaklaşım olmayabilir.

İnsan Olmak Ne Demektir?

Kök hücreler ve klonlama hakkmdaki güncel etik tartışmaların çoğu insan embriyosunun tinsel durumu etrafında yapılmaktadır. Bölüm 11'de tartıştığımız gibi, kök hücreler kalp, felç, Parkinson veya şeker gibi hastalıklardan zarar görmüş hasta dokuların onarım veya değiştirilmesini mümkün kılarak, **rejeneratif tıp** alanında büyük atılımların potasiyelini taşıyabilir. Bildiğiniz gibi kök hücrelerin olası birçok kaynağı vardır; embriyo, fetus, göbek bağı kanı, yetişkin hücreleri ve hatta "zararsız hale getirilmiş" tümör hücreleri (**Şekil 13.3**). Bu tip kök hücreler, insan somatik hücrelerinden uyarılmış pluripotent kök hücreler elde edilmesi gibi, çekirdeğin yeniden programlanması seçeneğine ek kaynaklardır. Kök hücre tartışmalarının çoğunluğu, hastalıkların tedavisi için farklı kök hücrelerin diğer hücre tiplerine dönüşebilmesi yeteneklerinin konu edildiği, bilimsel sorgulama etrafında yapılmaktadır. Bununla birlikte, tartışmanın ana bileşenleri, kök hücre kaynağı olarak embriyolar hakkındaki etik sorulardır.

Erken dönem insan embriyolarının, binlerce hastanın yararına olabilecek araştırmalar için tahrip edilmesine, toplum olarak hepimiz aynı onayı vermiyoruz. Bir kişinin sağlığında çift olan organlarından biri için veya öldükten sonra kullanılmak üzere yaptığı organ bağışından farklı olarak, embriyonik kök hücrelerin alınması, vericiyi (embriyo; Şekil 13.3) ortadan kaldıran bir işlemdir. Kök hücre kaynağı olarak insan embriyolarının kullanılması tartışmalı bir başlıktır, çünkü "Embriyo ne zaman bir kişi olarak değerlendirilir? Diğer birçok insana fayda getirebilecek kök hücreler elde etmek için embriyoların tahrip edilmesi etik midir?" gibi soruları da beraberinde getirmektedir.

İnsan embriyosunun tinsel veya etik durumunu inceleyen odak soruya çözüm getirmek zorundayız. Biyolojik olarak embriyo, *Homo sapiens* türüne ait, gelişimsel yolculuğuna daha yeni başlayan bir insan. Biyolojik bir gerçeklik olarak embriyonun türümüzün bir üyesi olmasıyla insan olarak değerlendirilmesi arasındaki farklı gelişim aşamalarının ilişkisini tartmak zorundayız. Biyolojik olarak bir embriyo insan türünün bir üyesi, fakat insan embriyosunun tinsel durumu, biyolojinin ötesine geçer ve bazılarının **birey olma** durumu olarak adlandırdığı terim çerçevesinde düşünülür. Bu terim, içsel değerlerden çok öz-farkındalık gibi değerler temelinde korunmayı hak eden bir varlığı tanımlamak için kullanılır. Bu birey olma anlayışının avantaj ve dezavantajlarının bir listesini çıkarınız. Burada düşünülmesi gereken bir nokta, bahse konu insanın birey değeri taşıyıp taşımadığının değerlendirilmesinde, hangi özelliklerinin dikkate alınacağına kimin karar vereceği sorusudur.



ŞEKİL 13.3 Kök Hücre Kaynakları İnsan embriyoları, fetal doku, bebekler ve yetişkinler; hepsi de kök hücrelerin potansiyel kaynaklarıdır.



KARARI SİZ VERİN

Şöhret, Utanç ve Kök Hücreler

Güney Kore, Seul Ulusal Üniversitesi'nden Dr. Woo Suk Hwang'ın kök hücre araştırmalarında çığır açan biri olduğu düşünülüyordu. Kendisine tüm dünyada parasız uçak yolculuğu yapma, çağrılı konuşmalarda en yüksek ücret, yüksek sosyete partileri, sık sık televizyona çıkma ve diğer, tipik araştırıcı yaşantısıyla ilişkili olmayan, birçok avantajlar sağlanmıştı. Hwang, araştırma grubunda ilk klonlanmış insan embriyosunu elde ettiklerini ve hasta insanlardan kök hücre geliştirdiklerini iddia ettiğinden Kore'nin ulusal gurur kaynağı olmuştu. Bu çalışma 2004 ve 2005 yıllarında, çok okunan makaleler arasında, saygın bir dergi olan *Science*'da yayınlandı. Fakat Aralık 2005'e kadar Woo Suk Hwang'ın ünü ve kariyeri utanç içinde dağıldı ve bulunduğu konumdan istifa etti. Araştırma grubunun eski ve yeni üyeleriyle, işbirliği yaptığı bir laboratuvar Hwang'ın verilerinde sahtecilik yaptığını ve yumurta bağışı için etik olmayan iddialarda bulunduğunu gösterir kanıtlar ortaya çıkardılar. Bunun ardından, verilerin ve şekillerin gerçekten düzmece olduğu ve üzerinde oynandığı ortaya çıkarıldı; lab iddia ettiği gibi bir embriyo klonlamamış veya hastaya-özel kök hücre elde etmemişti. Etik olmayan bu eylemler yanında, çalışmada kullanılan yumurtaların nasıl toplandığı (başlangıçta Hwang yumurtaların isimsiz donörler tarafından bağışlandığını belirtmişti) ve kullanılan yumurta sayısı için söylenen yalanlar gibi konular da vardı. Sonradan bu donörlerin Hwang'ın labındaki genç araştırıcılar oldukları ve onlara yumurtaları için ödeme yapıldığı anlaşıldı. Kadınlara ayrıca yumurta vermelerini sağlayan doğurganlık ilaçları almaları için de ödeme yapılmıştı. Hwang'ın saygınlığını kaybetmesi tüm dünyada büyük yankı buldu ve kök hücre çalışmalarına karşı çıkan grupların – kök hücrelerin çok ses getiren potansiyeline karşı her zaman şüpheci yaklaşan gruplar – daha fazla destek bulmalarına yol açtı.

Biyoetikçiler, Hwang'ın kendisiyle çalışan genç araştırıcıları yumurtaları için kullanmasını ve onlara bunun için para ödemesini, Batı'nın etik standartlarına bağlılık açısından sınıfta kalmak olarak yorumladılar. Fakat Güney Kore Sağlık Bakanlığı etik bir sorun olmadığına hükmetti, çünkü yumurtalar gönüllü olarak bağışlanmıştı ve genç araştırıcıların bu bağış için zorlandıklarını gösteren bir kanıt yoktu. Yani bakanlık, Hwang'ın var olan yasalara aykırı bir şey yapmadığına karar verdi. Bakanlık açıklamasında; Batı-eğitimli hekim ve bilim insanlarının kolayca yararlanılabilir genç araştırıcılardan alınan bağışları etik bulmamasının nedeninin, bu araştırıcıların amirlerini memnun etmek için kendilerini baskı altında hissederek gönülsüz bağış yaptıkları, varsayımı olduğunu söyledi. Açıklamada ayrıca; Güney Kore'deki araştırıcıların araştırmalarını yürütürken etik kurallara bağlı kalmakla birlikte, genellikle etik konular üzerinde Batı'da olduğu kadar fazla dikkat harcamadıkları belirtildi. Dr. Hwang'ın araştırmada kullanılan yumurtaları genç araştırıcılardan toplaması etik miydi? Kararı siz verin.

Embriyo araştırmalarıyla ilgili olarak, bazıları şu yaklaşımı benimsemektedir: "Birey değil, problem değil." Buna, insan embriyosunun mikroskobik olduğu, henüz kol, bacak, kalp atışı ve beyin faaliyetlerinin olmadığını gerekçe gösterirler. Elbette bu organlar daha sonra gelişmekte, fakat embriyonun en erken dönemlerinde bizim insanlık kavramımızla ilişkilendirdiklerimiz yoktur. Açıkça belli olduğu gibi, insan embriyosunun durumuyla ilgili, uzlaşmayan değişik bakış açıları bulunmaktadır. Bazıları onun, tıpkı bir deri yığını gibi, sadece bir hücre yığını olduğunu söylemekte. Diğerleri, potansiyel bir insan – derin saygı hak eden insan yaşamının bir formu olduğuna inanmakta. Bir diğer grup embriyonun, insan türünün diğer üyeleriyle aynı tinsel değere sahip olduğu görüşünü savunmaktadır. *Herhangi* bir insan hücresinin potansiyel bir birey olarak saygı gösterilmeyi hak edip etmediği sorusu üzerinde düşününüz. Bir yumurta hücresi ve bir sperm hücresi birleşerek embriyoyu oluşturur ve herhangi bir somatik hücre de klon embriyo oluşturmak üzere bir çekirdeğe katkıda bulunabilir. Bu bilgiyi de dikkate alarak, bir yumurta hücresinin insanın tam genomuna sahip olmasında özel bir durum olup olmadığını değerlendiriniz.

Embriyonik kök hücre elde etmek için insan embriyolarının kullanılması bağlamında dikkate alındığında, embriyoların zorunlu tahrip edilmelerini konu alan fikir çatışmaları tartışmalıdır. Teorik olarak embriyonik kök hücrelerden, hasta veya zarar görmüş dokuların onarım ve değiştirilmesinde kullanılacak transplantlar için, her tür doku elde edilebilir. Bu durumda, insan embriyolarının araştırma amaçlı tahrip edilmelerinin etik olacağı önerisi yapılabilir, yani eğer bu yok ediş hastalıkların tedavi edilmelerine yol açan araştırma yapmak anlamına geliyorsa buna izin verilebilir. Yine de, mevcut yayınlardaki kanıtlara dayanarak sorulacak ilk soru embriyonik kök hücrelerin potansiyel tedaviler için iddia edildikleri kadar uygun olup olmadıklarıdır. Hem bilimsel hem de etik açılardan dikkate alınması gereken diğer bir nokta, yetişkin kök hücreler veya uyarılmış pluripotent kök hücreler gibi yapılabilir diğer alternatiflerin de aynı şekilde uygun

olduklarıdır. Bu durumda etik sorular yeni bir boyut kazanır. Bir taraftan, eğer bilim tıpta devrimler için tüm yolları keşfetmekse, embriyolar üzerinde araştırma yapmanın gerekli olup olmadığını sorarken; diğer taraftan da, alternatiflerin varlığının etik olarak tartışmalı araştırmaları gereksiz kılıp kılmadığı sorusunu getirir. Elbette etik değerlendirmeye göre, hiçbir alternatif olmasa bile embriyoların tahrip edilmesine bunu gerekçe göstermek, etik olarak çok büyük maliyet getirir.

İlginç bir şekilde, insan embriyolarını gerçekleşmiş bir kişi değil de potansiyel kişi olarak gören bazı insanlar bile, embriyoların tahrip edilmelerine etik bakımdan karşı çıkıyorlar. Buradaki kaygı direkt olarak embriyo ve onun durumu değil, toplumun herhangi bir insan yaşamını nasıl gördüğüdür. Onların bakış açısına göre, adım attığımız kaygan yokuşta, tıbbi veya deneysel kullanım için insanın yok edilmesi, embriyolardan başlayıp doğmuş bireylerin kullanımına kadar gidebilir. Burada tekrar birey olma sorusuna dönüyoruz; özellikle, farklı insanları hayat kaliteleri ve topluma faydaları bakımından derecelendiren bir toplumsal yapı olarak.

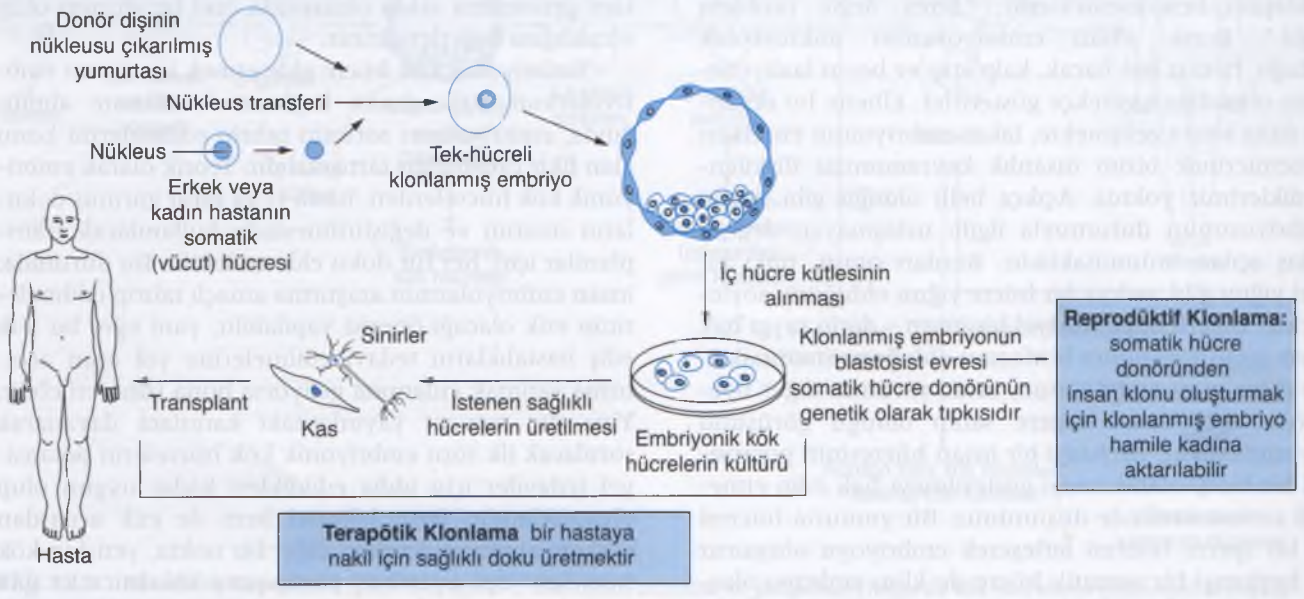
Embriyoları Araştırma İçin Ayırmak veya Araştırma İçin Embriyo Oluşturmak

Soruyu embriyonun tinsel durumu açısından değerlendirdiğimizde; embriyonun yaratılmasındaki orijinal amaç veya embriyonun yaratılmasında kullanılan yönteme bağlı olarak, değişik görüşler söz konusu olur. Kürtajla alınan fetusların kök hücre araştırmalarında kullanıldığı şeklindeki bir yaygın yanlış anlayışın aksine, bu araştırmalardaki embriyoların birincil kaynağı in vitro fertilizasyondan, veya IVF (Bölüm 11), "artan" embriyolardır. Bu embriyolar, bir çiftin diğer embriyolarından yapılan implantasyonda hamileliğin ve doğumun gerçekleşmesinden sonra, dondurulmuş olarak saklanan geri kalanlarıdır ve araştırma için (çiftin rızasıyla) bağışlanmış olabilirler. IVF kliniği veya ülkeye bağlı olarak, dondurulmuş embriyolar belli bir süre geçtikten sonra atılabilirler. Bu durumda sizin için vazgeçilmez etik kaygıların listesini çıkarınız. Bazıları bu embriyolar eğer atılacaksa araştırma için kullanılmalarının etik olarak geçerli olacağını söylemekte – eğer potansiyel bir tedaviye veya bilimde bir yeniliğe katkı sağlayacaklarsa, bunların yok olmalarından etik olarak iyi çıkarılabilir. Diğerleriyse, bunların araştırma için tahrip edilmeleri başlangıçta oluşturulma amaçlarına aykırı olduğundan, etik çizgiyi geçtiğini söylemekteler.

İnsan embriyolarının diğer potansiyel kaynağı, embriyoların özel olarak araştırma amacıyla oluşturulmasıdır. Bazıları artık embriyoların araştırma amacıyla kullanılmasını etik olarak geçerli bulup (bir yok edilişten iyi bir sonuç da çıkarılabilir diye açıklayarak), araştırma amaçlı özel embriyo oluşturulmasını etik bulmazlar. Bu savununun etik tutarlılığı olup olmadığını belirlemek için; embriyolar arasında biyolojik olarak bir fark mı var, yoksa embriyoların kullanımı ve elde edilmelerindeki amaç mı farklı, değerlendiriniz.

İnsan ve Diğer Hayvanlar Herhangi Bir Nedenle Klonlanmalı mı?

Embriyoların somatik hücre çekirdek transferi klonlaması yoluyla yaratılması, kök hücre araştırmalarında karşılaşılan soruların birçoğunun, tekniğin ve klonun potansiyel "kimlik" karmaşıklığının da eklenerek, tek-



ŞEKİL 13.4 İnsan Klonlama veya Nakilde Kullanılacak Doku İçin Klonlamanın Teorik Şeması

KARARI SİZ VERİN

Aynı ya da Farklı?

Aşağıdaki senaryo üzerinde düşününüz. Çocuk sahibi olmak isteyen bir çift için in vitro fertilizasyon yoluyla bir embriyo oluşturulur. Ancak, çiftin bir genetik hastalık taşıdığı ve % 100 kesinlikle embriyoda da bu hastalığın olacağı bilinmekte. Çiftle çalışan bilim insanları embriyodan kök hücreler izole ederler. Kültüre alınan hücrelerde genetik sorunu gidermeyi başarırlar. Embriyonik kök hücrelerden bazıları, tetraploid embriyonik hücre formunda hazırlanıp, hamileliği sonuna kadar götürmek üzere kadına nakledilir. Doğan bebek genetik hastalığı taşımaz, o çocuktan doğacak olanlar da taşımayacaktır. Bu senaryoda tartışılacak bazı etik sorulara ek olarak, şunu da dikkate alın: Doğan çocuk orijinal embriyo ile aynı insan/kişi/birey midir? Kararı siz verin.

rar sorulmasına yol açmıştır (**Şekil 13.4**). Rahime aktarıp implant etmek üzere oluşturulmuş bir embriyo, gerek doğumdan önce gerekse sonra gelişip büyümesini etkileyecek birçok risk ve güvenlik faktörüyle karşılaşır. Klonların canlı doğum ve sonrasında hayatta kalmadaki başarı oranları oldukça düşüktür. Bölüm 7 ve 11'de incelediğimiz gibi, klonların sağlıklarıyla ilgili, bazıları hafif bazıları çok ciddi, bir dizi sorun olduğunu biliyoruz.

Hamilelik ve canlı doğum amacıyla insan embriyosu klonlamak, IVF benzeri bir diğer destekli üreme tekniği midir, yoksa (güvenlik riskleri ve düşük başarı oranı nedeniyle) etik olmayan insan araştırması mıdır, bunun değerlendirilmesi gerekir. Doğacak insan klonunun kimliğiyle ilişkili toplumsal sorular da dikkate alınmak zorundadır. Örneğin, eğer bir çift, kadının verici olduğu hücreyi kullanarak bir klon çocuk sahibi olmak isterse, doğacak klon kocanın genetik kızı olmayacak, daha çok kadının kızkardeşi veya geç doğmuş ikizi olup, kocayla hiçbir yakınlığı olmayacaktır. Klonla ilişkili etik kaygılardan biri de, ebeveynlerden biriyle ilintinin yoksunluğunun akrabalık ve aile ilişkilerini nasıl değiştirebileceğidir. Klonun "ebeveynin" birinin "kopyası" olduğu düşünüldüğünde, doğduktan sonra klonlandığı kişiden "daha iyi bir hayat yaşaması" beklenebilir. Diğer bir potansiyel kaygı, şu anda hayatta olmayan birinin klonlanmış olmasıyla ilgili olarak ortaya çıkar. Klonlama daha önce varolan birini yeniden üretmek olduğundan, klonun genetik yapısı zaten biliniyor ve dikte edilmiş olacak. Genetik materyalinin vericisinin ulaştığı noktaya bakarak ebeveynleri ve diğerleri tarafından yükseltilen beklentilerle, klonun bu genetik mirasa uygun olarak yaşaması beklenebilir.

Klon kedi "cc" (**Şekil 13.5**) ona genetik materyalini bağışlayan kediye çok benziyor, fakat kürkünün deseni vericiden biraz farklı. Bu farklılıklar, gelişim sırasındaki hafif epigenetik değişiklikler nedeniyle ortaya çıkar. Genlerimiz fiziksel özelliklerimizin birçoğunu belirler ve bizi değişik hastalık ve davranışlara önceden hazırlar. Fakat doğduktan sonra, yaşadığımız birçok deneyim ve çevre bizim kim olduğumuz ve kim olacağımızı belirler. Bu deneyimler kopyalanamaz, yani klon klonlandığı bireyden farklı gelişecek ve oldukça farklı davranabilecektir. Einstein'ın klonu bilim insanı yerine bir sanatçı olabilirdi. Çevremiz ve deneyimlerimizi de içeren birçok şey, bizi ve karakterimizi genetiğimizden daha çok etkilemektedir.

Şimdiye kadar canlı bir çocuğun doğumunu hedefleyen klonlanmış insan embriyosu üretmeyi değerlendirdik. Halbuki bu, klonlanmış insan embriyosu oluşturmanın tek tasarısı değil. **Terapötik klonlama** için insan embriyoları oluşturmak, hastalar için uyumlu embriyonik hücreler üretilmesi (Şekil 13.4) ve genetik hastalıklarla kanser çalışmaları için değerli olacak insan araştırma modellerinin ortaya çıkarılmasına öncülük edebilir. Her ne kadar bu açıklama potansiyel bir değer ve etik olarak geçerli gibi görünse de, bazıları böyle embriyoların üretilmemesi gerektiğini ileri sürmekteler.



ŞEKİL 13.5 **Klonlanan İlk Kedi, "cc" (Karbon Kopya Kedi)**

Klonlanmış insan embriyolarının oluşturulmasına karşı çıkan bir diğer görüş, bunu embriyonun yaradılıştan gelen insan veya kişi olması değerine dayandırmaz. Ancak, bu şekilde insan embriyosu oluşturmanın insanı ticarileştirmenin yolunu açabileceğini, insan hayatını alınıp satılabilen ve kullanılabilen bir ticari mal haline getirip, süregelen hayatı değersizleştireceğini ileri sürer. Başka bir grup ise, sözde tasarlanmış embriyolarla insan hayatı imal etme şeklindeki embriyo üretiminin yapılmaması gerektiğini savunmaktadır.

Klonlanmış insan embriyolarının oluşturulmasını destekleyen bir görüş, bunu, eğer embriyo normal yollardan elde edilmemişse (burada söz konusu olan, döllenmeyle) onun insan sayılmayacağı varsayımına dayandırmaktadır. Bu görüşlerin herbiri, insan olmanın ve insan hayatına verilen değerin farklı tanımlarına dayandırılmaktadır. İlginçtir ki, yaklaşık 30 yıl önce, test tüpü bebeği denilen Louise Brown in vitro fertilizasyonla tasarlandığında da, insan olmanın ne anlama geldiği konusundaki benzer etik tartışmalar yapılmıştı. Şimdi, birçok dini tarikat dâhil, çok daha tutucu gruplar embriyo tasarımında in vitro döllenmeyi tamamen etik bir yol olarak değerlendirmekteler.

Hasta Hakları ve Biyolojik Materyaller

Aşağıdaki senaryo eğer sizin başınıza gelseydi ne hissederdiniz, düşününüz. Lösemi gibi bir hastalığın tedavisini görüyorsunuz ve tedavinizin bir parçası olan analizler için kan, kemik iliği ve dalak hücrelerinizden örnekler verdiniz. Daha sonra, sizi tedavi eden hekimlerin dokularınızdan, patentleyip önemli mali getiri elde ettikleri, hücre hatları geliştirdiklerini öğreniyorsunuz. Gerçekte bu gibi durumlar oldu ve birkaç hastanın dava açmasına yol açtı. Bu durumlarda hastalar, hücreleri alınırken **bilgilendirilmiş onay** vermeden önce, hekimlerin kendilerine hücreleri üzerinde araştırma yapacaklarını ve bunlardan mali getiri elde edeceklerini söylemediklerini iddia etmişlerdir. Hastalar ve avukatlar bu durumların, hasta-doktor ilişkilerinin ihlali ve "sebepsiz zenginleşme ilkesi" örnekleri olarak gösterilebileceğini söylemekteler.

Bu olayların çoğunda hastalar, hücrelerinden sağlanan gelirden, maddi tazminat paylarını talep etmekteler. Birkaç sansasyonel olayda mahkemeler, hekimlerin araştırmadaki kendi kişisel ilgilerini ve hastanın tedavisiyle ilişkili olmayan potansiyel ekonomik meseleleri açıklamakla yükümlü olduklarına karar vermiştir. Fakat mahkemeler ayrıca, hücre ve diğer biyolojik materyallerin donörlerinin bu materyaller üzerinde sahiplik hakları bulunmadığına, bu materyallerden patent geliştiren ve bunlardan mali yarar sağlayan hekim ve bilim insanlarının hastalara verilecek tazminattan sorumlu olmadıklarına da karar vermiştir.

Birçok donör kendi hücrelerinin sahibi olmadığının ve onlar üzerindeki kontrolün büyük kısmını hücrelerini bağışladıkları zaman başkalarına bıraktıklarının farkında değil. Bununla ilişkili olarak, bağış yapılan spermlerin, bağışlayıcının onayı olmadan yumurta döllemek ve çocuk elde etmek için kullanıldığı, böylece erkeklerin onayları alınmadan baba yapıldıkları durumlar da var. Genel olarak ABD mevzuatı, söz konusu donörlerden zorlama olmaksızın bilgilendirilmiş yazılı onay alınmasını desteklemektedir. Şüphesiz, kök hücre ve rejeneratif tıp teknolojileri daha yaygın hale geldiğinde, biyolojik materyalle ilgili hasta hakları konusu daha karmaşık hale gelerek, daha fazla inceleme ve etik değerlendirme gerektirecektir.

Genetik Bilgi

İnsan Genom Projesi hastalıklara neden olan veya katkıda bulunan birçok genin belirlenmesine öncülük etmiştir. Buradan elde edilen bilgiler ayrıca genetik testler ve genetik hastalıklar için yeni stratejiler geliştirilmesinin de yolunu açtı. DNA'mızın anlattıkları kolayca okunabilir hale geldiğinden, bu bilginin gizli tutulması konusunda kaygılar da artmaktadır. Birinin DNA dizisi gerçekten benzersiz bir tanımlayıcı olabilir. Araştırıcılar, dizilemek ve testler için DNA verenlerin mahremiyetlerini korumaya özen göstermek zorundadırlar. Bilimsel bilginin serbestçe dolaşımının fikirlerin hızla yayılmasını sağladığını ve bilimsel gelişmeleri kolaylaştırdığını biliyoruz. Şimdi de bilim insanlarının, gizliliklerini koruyacakları araştırma konusu kişi ve grupları güvence altına almak için kullandıkları, genetik bilgiyi koruma yollarından bazılarına bakacağız. Bu durum sadece araştırmada kullanılanlara güvence verdiği için değil, bilim insanlarına insanların gösterdiği güveni ve onların araştırma projelerine katılma isteklerini sürdürmeyi sağlayacağı için de önemlidir. Aşağıda genetik bilgi hakkında bazı etik soru örnekleri verilmektedir (Genetik testler hakkında daha ayrıntılı tartışma ve daha fazla soru için Bölüm 11'e bakınız):

- Etkili bir tedavinin olmadığı genetik bozukluklar için insanları test etmeli miyiz?
- Eğer bir kişinin DNA'sında orijinal test nedenleriyle ilgisiz mutasyonlar bulunursa, hekimler ve bilim insanlarının bu genetik test sonuçlarını açıklamalarını zorunlu kılan ne gibi etik yükümlülükleri vardır?
- Bir genetik testten elde edilen negatif sonuçlardan gelecekte asla belli bir hastalığın gelişmeyeceği çıkarımı her zaman yapılmayacağı gibi, pozitif sonuç da her zaman bu kişinin hastalığa yakalanacağını göstermez. Genetik testlerin sonuçları ve test edilen kişinin gerçek riskleri arasında etkili bir bağlantıyı nasıl kurarız?

- Bir kişi hastalıkla-ilişkili-olmayan zeka, cilt rengi, boy veya kilo gibi karakterleri etkileyen genler bakımından test edilebilmeli mi?
- *Tanınabilirlik*, yani yayılmış genetik verilerin belli bir kişiyle ilişkilendirilmesi (gizli kimliğin ortaya çıkması) olasılığı en büyük kaygılardan biridir. Hastalar tıbbi kayıtlarının belli bölümlerinin açıklanması veya paylaşılmasını onayladıklarında, elektronik tıbbi kayıt tutma sisteminde tanınabilirlik nasıl önlenebilir?

Doğrudan tüketiciye-yönelik-genetik testlerle ilgili anlaşmazlıkları daha önce tartıştık (Bölüm 11). Klinik ortamda genetik özelliklerin belirlenmesi daha rutin bir hale geldiğinde, hekimler hastalarının mahremiyetini sağlama almak zorunda kalacaklardır. Genetik bilginin çalışanlar, sigorta şirketleri, devlet kurumları veya edinilmiş genel kamusal algılar tarafından negatif olarak nasıl kullanılabileceği konusunda önemli kaygılar duyulmaktadır. Genetik mahremiyet ve genetik ayrımcılığın önlenmesinin önemi gelecek yıllarda daha da artacaktır. ABD Temsilciler Meclisi'nde 2008 yılında H.R. 483 nolu bir tasarı geçti, **Genetik Bilgiye Dayalı Ayrımcılık Yasası (GINA)**. Senato ayrıca, GINA'nın Başkan George W. Bush'un imzasıyla kanunlaşmasından kısa bir süre sonra, benzer bir tasarıyı (S. 358) geçirdi. Bu yasa, sağlık sigortası ve işe almalarda genetiğe veya genetik bilginin uygunsuz kullanımına dayalı ayrımcılık yapılmasını yasaklamaktadır.

Daha Fazla veya Daha Az İnsan?

Gen terapisi içeren ilk başarılı uygulama örneği, çocuklarda görülen şiddetli kombine immün yetmezlik sendromu (SCID; Bölüm 11) olmuştur. Bu hastalığın görüldüğü bireyler, bağışıklık hücrelerindeki bir gen hatası nedeniyle etkin bir bağışıklık sistemleri olmadan doğarlar. Başarılı tedavilerde çocuğun kemik iliğinden alınan yetişkin kök hücreler kullanılır; genetik mühendisiliği yöntemleriyle doğru genin eklendiği kök hücreler, hatalı hücrelerle değiştirilmek üzere hastaya tekrar verilir (bakınız Şekil 11.15).

Gen terapisi teknolojisiyle ilişkili etik kaygıların neler olabileceği hakkında düşününüz. SCID tedavisinde olduğu gibi, gen terapisi uygulamalarının inanılmaz başarılı olduğu görüldüğünden, kimsenin kaygısı olmayacağı düşünülebilir. Ancak, bunlar deneysel tıbbi uygulamalar olduğundan, kesinlikle bilgilendirilmiş onay, güvenilirlik ve etkinlik gibi sorunları vardır. Ortaya çıkan bir güvenilirlik sorunu, kanser oluşumu olasılığıdır. Bölüm 11'de açıklandığı gibi, gen terapisinde vektör olarak kullanılan bir adenovirüs birçok çocukta lösemiye neden olmuştur. Bu sonuç gelecekteki, özellikle sözü edilen virüs vektörünün kullanıldığı, genetik tedaviler hakkında önemli kaygıların doğmasına yol açmıştır. Bir diğer etik kaygı, kişinin genetiğini değiştirmeyle ilişkili riskler, özellikle aktarılacak genin yerleştirilmesinde seçilen hedefin özgünlüğü, konusunda olabilir.

Mevcut ve önerilen somatik gen terapileri varolan genetik hastalıkların iyileştirilmesini içermektedir. Hâlbuki belli bir hastalığa karşı sadece genetik *yatkınlığın* olduğu ve hastalığın ortaya çıkmasının kesin olmadığı durumlar için de genetik tedavi olasılıklarını değerlendirmeliyiz. Olasılıklardan biri, kanser gelişimi riskini artırabilecek genlerin (*BRCA1* ve *BRCA2* genlerindeki mutasyonlar gibi) belirlendiği meme kanseridir. Bir genetik hastalık ve bir genetik nitelik arasındaki farkı değerlendirmemiz gerekir. SCID gibi bir genetik hastalıkta, bu genetik soruna sahip olan kişide hastalığın kesinlikle görüleceği bilinir. Hâlbuki bir genetik *nitelik*, hastalık durumunun zaten gerçekleştiği veya kaçınılmaz olarak gerçekleşeceği anlamına gelmez. Eğer niteliklerin zorunlu olarak hastalığa dönüşmeyebileceğini veya hastalık için yüksek riskle bile ilişkilendirilemeyeceğini düşünürsek, genetik mühendisliği konusundaki kaygılarımızda tedavi etmenin ötesine varırız. Bu durumda, mevcut bir durumu tedavi etmenin ötesine geçen değişiklikler ve hatta insanın genetik kompozisyonunun geliştirilmesine varan diğer olası genetik modifikasyonları, etik olarak kabul edilebilir bulup bulmayacağımızın üzerinde düşünmeye başlarız.

Gerçekte sadece kişisel bir tercih olsa bile, bireysel genetik yapımızı geliştirmek, örneğin kas kütlemizi veya oksijen taşıyan kırmızı kan hücrelelerimizin kapasitesini artırmak, kişinin sağlığı için tıbbi bir gereklilik olarak değerlendirilebilir mi, üzerinde düşünelim. Bu tür genetik değişimlerin yasaklanması bireysel hakların ihlal edilmesi olarak anlaşılabilir. Bu kişinin genomu normalden farklı olacak şekilde değiştirileceğinden, onu, insan tanımının tüm kapsamıyla, insan olarak değerlendirmeli miyiz sorusunu tekrar düşünmemiz gerekir. Atletlerde **gen dopingi** olasılığı konunda birçok soru sorulmaktadır; yani, sportif faaliyetlerde önemli insan özelliklerinin geliştirilmesi için gen terapisiyle genetik modifikasyon yapılması. Hayvanlara uygulanan genetik tekniklerle kas fonksiyonunun geliştirildiği, kan hücrelerinin üretimi ve oksijen içeriğinin artırıldığı, metabolizma ve dayanma gücünün yükseltildiği gösterilmiştir.

Germline genetik mühendisliği alanındaki olasılıklara baktığımızda, bir canlıyı neyin insan yaptığı sorusu daha ısrarla vurgulanır hale gelmiştir. Bu durumda genetik değişimler sperm, yumurta veya erken embriyo üzerinde yapılmaktadır. Aslında bu, uygulamayı somatik genetik mühendisliğinden daha etkin hale getirmektedir, çünkü genetik modifikasyon bireyin vücudundaki her hücreyi etkilemekte, genetik değişimi kalıtsal kılmaktadır. Belirli genlerin insan gen

havuzundan çıkarılması nedeniyle, potansiyel olarak bu, bazı genetik hastalıkların elenmesi anlamına gelebilir. Genetik değişim sonucu ortaya çıkacak herhangi bir problem de elbette, tıpkı herhangi bir genetik iyileştirme gibi, kalıtsal olacaktır. Sadece tedavi edilen kişiyi değil gelecek generesyonları da etkileyecek bu tip bir genetik modifikasyonun etik olarak kabul edilebilir olup olmayacağını değerlendiriniz. İnsan gen havuzuna gen eklenip çıkarılmasının bazı olası sonuçları şöyle sıralanabilir; genetik hastalıkların veya hastalıklara yatkınlığın elimine edilmesi, insanın üretkenliğinin artırılması, insan ömrünün uzatılıp kısaltılması ve artan kanser riski.

Nobel ödülü almış biri, bu tip araştırmaları "daha iyi insan" geliştirilmesine yol açacağı için savunmuş olsa da, "daha iyi"nin ne olduğunu ve bu kararı verirken kimin tanımlamasının kullanılacağını düşünmek için biraz durmamız gerekebilir. Germline genetik değiştirmeler için bahsedilen diğer bir sonuç, yeni bir üstün insan türü yaratılmasıdır – **öjenik** kavramının arkasındaki düşünce. İnsanları farklı genetik sosyal sınıflara ayırmak, bu sonuçla ilişkili negatif bir olasılık olarak karşımıza çıkabilecektir.

13.3 Ekonomi, Bilimin Rolü ve İletişim

Araştırma kararlarının verilişinde paranın büyük rolü olduğu gerçeğini görmezden gelemeyiz. Devlet katkısı kadar özel yatırımlar da araştırma ve geliştirmeyi teşvik eder; kişi ve şirketler benzer şekilde karlı buluşlar için biyoteknolojinin kullanılmasını isterler. Ne de olsa biyoteknoloji bir ticari faaliyettir.

Bilimsel araştırma sadece pahalı değil; ayrıca araştırmanın karlılığına ve finansman sağlanmasına bağlı olarak projeler, şirketler ve kariyerler devam edebilir veya sona erebilir. İster üniversitede araştırma yapan bir öğretim üyesinden isterse yeni bir ürün geliştirmeye çalışan şirketten gelsin, her bilimsel önerinin desteklenmesi için yeterli paranın olmadığı açıktır. Araştırma finans değerlendirmeleri genellikle, onun bilimin temel konularındaki bilgimizi artırıp artırmayacağına veya yaşantımızı iyileştirecek bir buluş veya ürünün geliştirilmesiyle sonuçlanıp sonuçlanmayacağına bakılarak yapılır.

Finansal destek arayan birçok üniversite ve mesleki okul araştırmacısı araştırma tekliflerini finans kurumlarına sunarlar. Daha sonra bu teklifler, hangi projelerin desteklenmesi gerektiği konusunda finans kurumlarına tavsiyelerde bulunan bilim insanlarının oluşturduğu panellerde değerlendirilir. Fakat paranın miktarı ve hatta hangi yönde kullanılacağı konusundaki kararlar, parayı veren kurum, özellikle ABD Kongresi, tarafından verilir. Kararların çoğu, bilimin olası başarısı, yeniliği ve sağlık ve genel bilgi alanlarındaki uygulama potansiyeline dayandırılır. Yine de bazı kararlar, değerlendiriciler tarafından bilim insanının ne kadar iyi bilindiğinden veya Kongre üyelerinin politik baskılarından etkilenebilir.

Sadece araştırma tekliflerinin nasıl değerlendirildiğini ve başarı şanslarını değil, ayrıca onların bilimsel bilgiye yapacakları katkı olasılığının genişliğini de dikkate almamız gerekir (çünkü bilimde bir sonraki çığır açan büyük buluşun nereden gelebileceğini ve hangi geçmiş bilginin bu buluşa öncülük edebileceğini bilmek zordur). Dikkat edilecek diğer konular, üretilebilecek tedavilerin maliyeti ve bunlara erişimdir. Araştırma finansmanı öyle pahalı olabilir ki, ondan sadece zenginler yararlanabilir veya devasa bir para ve zaman kaybı olduğu anlaşılabilir; basitçe söylenirse, araştırmada izlenecek diğer yollarla faydalı sonuçlar elde etme olasılığının daha yüksek olacağı ortaya çıkabilir. Mümkün olan araştırma finans kaynakları kısıtlı olduğundan, finanslama kararlarının, bir alandaki araştırmanın desteklenmesinin başarı potansiyeli daha yüksek diğer alana yapılan desteği azaltıp azalmayacağının da dikkate alınarak değerlendirilmesi gerekebilir.

Kar getirme potansiyeli olan bir fikre sahip bir biyoteknoloji şirketi tipik olarak, ürünün geliştirilmesi için yapılması gerekli Ar-Ge'yi finanse etmeyi isteyen risk sermayedarları ve diğer yatırımcıları bulmak zorundadır. Eğer bu yatırımcılar riskten kaçıyor fakat kar arıyorlarsa, pahalı fakat hayat kurtarıcı potansiyelleri olan yeni ve yarayışlı teknolojilere öncülük edecek riskli deneysel araştırmaları kim finanse edecek?



KARARI SİZ VERİN

Gen Terapisiyle Tedavi Edilmesi Gerekenler

Bölüm 11'de gen terapisi çerçevesinde sorulan cevaplanmamış bazı soruları tartıştık. Gen terapisiyle ilgili ayrıca birçok etik kaygı ve riskler de bulunmaktadır. Hasta veya ailesi gen terapisi denemeleriyle ilgili riskleri iyice kavramakta mıdır? Örneğin Jesse Gelsinger (Jesse'nin aldığı gen terapisi sonucu öldüğünü Bölüm 11'den hatırlayalım), ilaç kullanarak başarıyla tedavi edilebilecek bir hastalığın iyi huylu formuna yakalanmıştı. Gen terapisi denemelerine katılmalı mıydı? Bugün için gen terapisi çok pahalı. Maliyete bakılmaksızın herkes gen terapisi uygulamalarından yararlanmalı mı? Hangi tip hastalıklarda gen terapisine başvurulmalı (örneğin sadece ölümcül hastalıklar)? Peki, hastaların günlük olarak etkili ilaçlar almak zorunda kaldığı, bunun yerine gen terapisi kullanılarak tedavi edilebileceği hastalıklar için ne yapmalı? Ya da kellik gibi kozmetik durumlarda? Kararı siz verin.

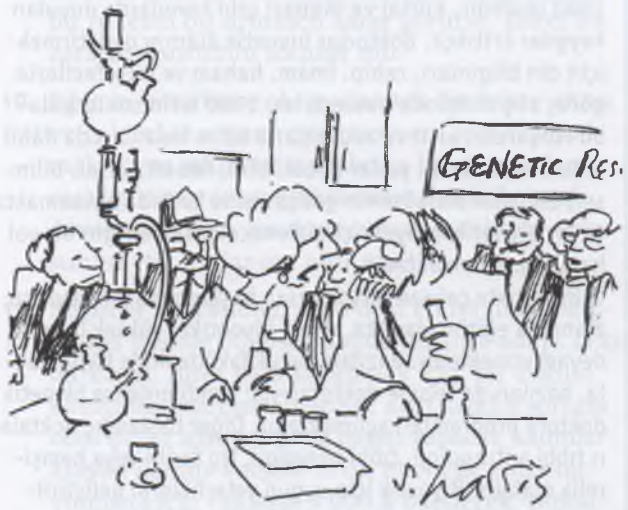
Ekonomik tartışmaları, kök hücre araştırmalarında kadınlara yumurta bağışı yapmaları için ödeme yapmak kabul edilebilir mi gibi etik konulara kadar genişletebiliriz hatta. IVF'dan kalan yumurtaların kalitesiz olması kök hücre çalışmalarının yaygınlaşmasıyla yumurtalara olan talebin artmasıyla birleşince, insan yumurtasına duyulan ihtiyacı kuvvetlendirmiştir. Haziran 2009'da New York kamu parasının – 10 000 $'a kadar! – bu yolda kullanılmasına izin veren ilk eyalet olmuştur. Burada sözü edilen etik konulardan bazıları; yumurtaları elde etmek için gereken hormonsal durum, olası istenmeyen durumlar ve invaziv yaklaşımlardır. Bu konu etrafında ekonomik ve ekonomik olmayan birçok soru sorulmaktadır:

- Yumurta vericisi olarak kadınlara ödeme yapılmalı mı?
- Eğer yapılırsa, bu ödemelerde sınırlamalar olmalı mı?
- Bir kadının belirli bir zaman süreci içinde kaç kez yumurta bağışı yapabileceği sınırlandırılmalı mı, yoksa zaman içinde düzinelerce yumurta veren bir "seri" donör olmasına izin mi verilmeli?
- Yumurtalar için ödeme yapmak, kadınların yumurta bağışını bir çeşit iş edindikleri bir pazar yaratır mı?

Araştırma ve onun finansmanının etik sonuçları söz konusu olduğunda fikri mülkiyet hakları da önemlidir. Fikri mülkiyetin **patentlenmesi** – yeni genler, yeni hücre tipleri, GDO'lar ve hatta embriyolar olabilir – buluş sahipleri için kazançlı olabilir, fakat aynı zamanda bilimsel ve etik ikilemleri de taşır. Örneğin, izole edilip karakterizasyonu yapılan – ve sonra da buluşçusu tarafından patentlenen – bir insan geni için olasılıkları göz önüne getirin. Patentin sahibi kişi veya şirket patentlenmiş geni kullanarak araştırma yapacak herkesten o gen için lisans ücreti ödemesini isteyebilir. Araştırmada bir tanı testi veya tedavinin bulunması, daha fazla ücret ve telif hakkı ödenmesini gerektirebilecektir. Bu durum bazı genler üzerinde araştırma yapılmasının zor ve pahalı olmasına veya patentli genin klinik kullanımının sınırlanmasına neden olacaktır. Genlerin patentlenmesi konusundaki bazı anlaşmazlıkları Bölüm 12'de incelemiştik. 2011'de bir federal temyiz mahkemesi, alt mahkemenin meme kanseri testi hakkındaki (*BRCA1* ve *BRCA2* genleri için) kararını bozarak, insan genlerinin patentlenebileceği hükmünü verdi. Şimdi Amerikan Sivil Haklar Birliği'nin bu karara karşı çıkmak için temyize gitmesi bekleniyor.

Bazı hekimler halen lisans kısıtlamalarına bağlı olarak bazı genetik testler için ortaya çıkan maliyeti hastalarına yansıtmayı göze alamadıklarından şikâyetçiler. Bununla birlikte, genler ve genetik donanım için getirilen sınırlayıcı veya önleyici patentler bu araştırmaların sürdürülmesindeki özendiriciliği, özellikle bundan kazanç uman şirketler için, ortadan kaldırabilir. Genler ve hücrelerin patentlenmesine ilişkin potansiyel etik problemlerin bir listesini oluşturun ve araştırmaların devam etmesi için uzlaşma sağlanabilecek olası alternatifler veya verilebilecek ödünleri değerlendiriniz.

Biyoteknolojiyle ilişkili etik sorular ayrıca bilimin toplumdaki rolüne de değinir (**Şekil 13.6**). Bilim ve teknoloji yaşantımızı daha mutlu ve sağlıklı yapan buluş ve icatları sunmaktadır. Fakat bilim insanlarının araştırma özgürlüklerinin sınırsız olup olmadığını iyi değerlendirmek de önemlidir. Bir sonraki büyük bilimsel atılımın hangi kaynaktan geleceğini bilmek genellikle zordur ve bazen yeni buluşlar, bilim insanlarının izlemeye bile değer bulmadıkları, beklenmedik kaynak ve yöntemlerden doğar. Bilimin topluma en iyi nasıl hizmet vereceğini belirlememiz gerekir. Bilimsel keşifler gibi öngörülmeyen ve kendiliğinden olan şeylerin düzenlenmesine yönelik bir yaklaşımın zorlukları vardır. Ayrıca bu sorularda kimin karar verici olacağını bilmek de güçtür – bilimin nasıl işlediğini bildikleri için bilim insanları, kuralları belirlemek zorunda olduklarından politikacılar veya kararlardan en fazla etkileneceği için toplum. Hem buluşlarını sürdürmesi bakımından bilimin, hem de sağlık hizmetleri ve etik ilgisini sürdürmesi için toplumun ihtiyaçlarına



"ETİKÇİLER ETRAFTAYKEN HERHANGİ BİR İŞ YAPMAM GİTTİKÇE ZORLAŞIYOR"

ŞEKİL 13.6 Etik Karar Alma Bilimin Gerekli Bir Parçasıdır

karşılık verecek, ne tip düzenlemelerin yapılabileceğini değerlendiriniz. Genel olarak etik tartışma ve çekişmeler, toplumun belli bir kesiminde bu konuda bir kanuna gerek olduğu kanısına varıldığı noktada, kanun yapmanın itici gücünü oluşturmaktadır (toplumun davranışlarını kontrol eden kanunlar ve kesinlikle biyoteknoloji endüstrisini düzene sokacak kanunlar). Bu nedenle biyoetik, biyoteknoloji sektöründe kritik öneme sahip olmaya başlamıştır.

Doğru, dürüst bir iletişim genelde bilimde olduğu gibi biyoteknolojide de çok önemlidir. Bilim insanlarının diğer bilim insanlarıyla, fakat daha da önemlisi genel toplumla, açıklıkla ve içtenlikle iletişim kurmaya istekli ve yetenekli olmaları gerekir. Bilimin günlük yaşantılarına yaptığı katkının önemini anlayamayan ve değerini veremeyen halk, bu alanda verilen uğraşları desteklemeyecektir. Araştırmanın potansiyelini veya sonuçlara yakınlığı abartmadan ve karmaşık terminoloji kullanmadan yapılacak yalın bir iletişim gereklidir. Eğer halk ve siyasetçiler yanlış yönlendirildiklerine inanırlarsa, bunun sonuçları hem bilim hem de toplum için korkunç olabilir. Eğer halk bilim insanlarının yaptıkları araştırmalarda etik sorulara duyarsız olduklarına inanırsa, bilim insanlarının halkın güvenini kazanmaları güç olacaktır. Bütün olguların dikkate alınıyor olması önemlidir. Araştırmada dürüstlük temeldir, aynı zamanda bilimsel iletişimdeki dürüstlük de.

Bu gibi etik soruların çoğu, hem şimdi hem de gelecekte, sadece sizi değil aynı şekilde başka hayatları da etkileyen zor kararları içerir. Eğer kararlar, özellikle de zor olanlar, sizin adınıza verilseydi her şey daha kolay olabilirdi. Ancak bu yaklaşım, karar vericilerin ellerindeki tüm olguların ve amaçlarının sizinkilerle örtüştüğünü varsaymaktadır. Bu durum ayrıca, bu tür kararları almaktaki kişisel iradenizden ve aynı şekilde



KARİYER PROFİLİ

Biyoetikte Kariyer Yolları

Dünya üzerinde 100'den fazla akademik biyoetik araştırma merkezi vardır. Toplumun biyoetiğe ilgisi her zaman yüksek olmuştur ve bu alanda birçok ilginç kariyer seçenekleri bulunmaktadır. Geleneksel olarak, tıbbi etiğe Hipokrat'ın ettiği "Öncelikle, zarar verme" yemininden bugüne ilgi duyulmuştur; fakat biyoetiğin bir disiplin olarak bilinmesi 1980'lerdedir. Kürtaj ve ötenazi gibi konularda duyulan kaygılar arttıkça, doktorlar biyoetik alanını geliştirmek için din bilginleri, rahip, imam, haham ve felsefecilerle görüş alış verişinde bulundular. 1980'lerin sonlarında bu istişareler arttı ve avukatlarla bilim insanları da dâhil oldular. Bütün bu yollar (tıbbi, dini, felsefi, yasal, bilimsel) biyoetik disiplininin gelişmesine katkıda bulunmakta ve bir biyoetik kariyeri için izlenecek çok belirgin bir yol hala bulunmamaktadır.

Biyoetikte çalışan birçok insan başlangıçta fen veya tıp alanında eğitim almakta, sonra biyoetikte yüksek lisansa devam etmektedir. Bazıları hukuk fakültesinde başlamakta, bazıları da felsefe doktorasıyla; şimdilerde ise biyoetik doktora programları açılmaktadır. Diğer başlangıç noktaları tıbbi antropoloji, tıbbi sosyoloji, tıp tarihi veya hemşirelik olabilir. Biyoetik için uygun yeterliklerin geliştirilmesinde en iyi eğitimin nasıl olacağıyla ilgili hala pek çok anlaşmazlık bulunmaktadır. Neredeyse herkesin anlaştığı bir nokta, eğitimin disiplinlerarası olması gerektiğidir: Eğitim geniş bir bilgi tabanı, dil yeteneği ve din, bilim, tıp gibi diğer disiplinlerle iletişim yeteneklerini içermelidir.

Eğitimde doğru yolun seçimi büyük oranda kişinin ilgi alanlarına bağlıdır. Kendi ilgi alanlarınızı ve yeteneklerinizi biyoetikle ilişkilendirerek bir değerlendirme yapınız. Ayrıca olası iş imkânlarını da araştırıp, bunların gerektirdiği eğitimlere katılmalısınız. NIH'in "Careers in Bioethics" websitesi başlamak için iyi bir yerdir (bakınız, Rehber İnternet Sitesinde Keeping Current web listesi).

Bu alandaki yetenekleriniz potansiyel işverenlerinizi ikna edebilir. Biyoteknoloji işverenleri potansiyel çalışanlarına baktıklarında, sadece akademik yeterliliklerine ve iş deneyimlerine bakmazlar. İş tanımında belirtilen özellikleri karşılamak önemlidir, fakat müstakbel işverenlerin sizi görüşmeye çağırmalarını sağlayacak bazı soyut yeteneklere sahip olmak genellikle daha önemlidir. İşverenler genellikle takım çalışmasında iyi fakat aynı zamanda diplomatik, becerikli ve akranlarından bir çevre oluşturabilecek yetenekte, çok-yönlü çalışanlar ararlar. Yeteneklerizi başvuru yaptığınız iş kolunda değil zaman içinde çalıştığınız diğer işlerde kazanmış olsanız bile, işverenlere bu yeteneklerinizin olduğunu gösterin. İşverenler ayrıca çalışanlarının karmaşık konuların üstesinden dürüstlük ve uygun etik değerlendirmelerle gelebileceğini bilmek isterler.

Herhangi bir sözde sosyal beceriye sahip olduğunuzu açık örneklerle savunmak için hazır olun, fakat kendinizi veya yeteneklerinizi pazarlamaktan korkmayın.

Uyarlanmıştır. P. Watson (2003), Transferable Skills for a Competitive Edge, *Nature Biotechnology*, 21: 211.

sorumluluğunuzdan da vazgeçmenizi içerir. Özgürlük sorumluluk getirir – eğer seçimler yaparsanız, o seçimlerinizden sorumlu olursunuz ve seçimleriniz sadece sizi değil aynı şekilde başkalarını da etkiler. Zeki bir kişi bir sona ulaştıracak en iyi yolları bilir; deneyimli biri hangi sonun çabalamaya değer olduğunu bilir.

BİR FARK YARATMAK

Buradaki "Bir Fark Yaratmak" için, bu bölümde daha önce bahsedilen bir politikayı, Kongrede 13 yıl süren tartışmaların ardından 2008 yılında imzalanarak yasalaşan Genetik Bilgiye Dayalı Ayrımcılık Yasası'nı (GINA), vurgulamayı seçtik. Bu yasanın etik önemi, kişiler arasında genetiğe dayandırılarak ayrımcılık yapılmasının önlenmesini hedeflemesidir. Bu yasanın genel etkinliği henüz görülmemekle birlikte; genetik testlerin daha yaygın hale gelmeye başladığı bu zamanlarda, vatandaşların sigorta ve işe alma gibi konularda genetik verilere dayanılarak yapılacak ayrımcılıktan korunmasına daha çok ihtiyaç duyulacağı açıktır. Bu nedenle GINA, genetik bilgiye dayandırılacak suistimallerin önlenmesinde, bir fark yaratma potansiyeline sahiptir.

SORULAR & ETKİNLİKLER

Cevapları Ek 1'de bulabilirsiniz.

1. Etik düşüncenin iki önemli yaklaşımı nelerdir, birbirlerinden farkları nedir?
2. Geçen Eylül California'dan Molly adlı küçük bir kıza, hayatını kurtaracak bir uygulama olan, yeni doğan kardeşi Adam'ın göbek kordonu kanı nakledildi. O zaman 8 yaşında olan Molly'nin, Fanconi anemisi olarak bilinen, ölümcül bir genetik kan bozukluğu hastalığı vardı. Bu olayı özellikle sıra dışı kılan ise, kız kardeşi hasta olmasaydı Adam'ın dünyaya gelmeyebileceği. İn vitro döllenmeyle tasarlanan embriyosu, kardeşinin hastalığını göstermeyen ve ona en iyi doku uyumu sağlayacak bir grup embriyoya test uygulanarak seçildi. Bu etik midir?

   R. M. Kline (2001)'den uyarlandı. Whose Blood Is It, Anyway? *Scientific American*, 284(4): 42–49.
3. Bir sütunda GD bitkilerin ekosistemle interaksiyonu hakkında düşünebileceğiniz bütün olasılıkları listelediğiniz bir çizelge hazırlayın. Sonra, ikinci sütunda bu interaksiyonların karşısında, iyi veya kötü olabilecek sonuçlarını listeleyiniz.
4. Eğer bir GD bitki büyüme hormonu üretecek şekilde tasarlanmışsa, ortaya çıkabilecek etik sonuçlar ve beklenilmesi gereken sorunlar nelerdir?
5. Bir insan ve bir kişi arasında fark var mıdır? Varsa niçin, yoksa niçin?
6. Finans kurumlarına sunulan her bilimsel araştırma projesini destekleyecek yeterli para, devlette bile, yoktur. Bu proje önerilerinin hangisinin para israfına, hangisinin insan hayatını sonsuza kadar değiştirecek buluşlara yol açacağına nasıl karar verilmeli?
7. Gen terapisinin kolesterol düzeylerini ve kandaki doymuş yağları düşürmekte kullanılabileceğini, böylece insanların bol yağlı kızarmış yiyecekleri, kalp hastalıkları riski yaşamadan tüketebileceklerini varsayın. Yine de bu uygulama herkes için çalışmayabilir ve kimlerin bundan yararlanabileceğini önceden bilmenin bir yolu olmayabilir. Sonuçta bazıları kaçınılmaz olarak vaktinden önce ölecektir. Böyle bir gen terapisi, insanlarda kullanılmak üzere onaylanmalı mıdır? Soruyu cevaplarken; bu senaryoyu hem faydacı bir yaklaşımla ele alan bir biyoetikçinin nasıl değerlendirebileceğini, hem de deontolojik açıdan bu yaklaşımı reddeden bir biyoetikçinin nasıl değerlendirebileceğini belirtiniz.
8. Bir ilaç şirketi hedef grubun yeni ilaçlarına karşılık vermediğini görürse, bu durumu yasal olarak diğer ilaç şirketlerine bildirmek zorunda mıdır?
9. Eğer bir gıda alerjeni, rekombinant bitki kullanılarak elemine edilebiliyorsa ve GD bitkiyi kullanarak gıda üreten firmanın istemediği şekilde bir tüketici bu üründen zarar görürse, şirket bu zarardan sorumlu tutulur mu?
10. Eğer in vitro bir embriyodan tek bir hücre alınır ve gelecekte organ rejenerasyonu için kullanılmak üzere saklanırsa; embriyo bu durumdan zarar görmüyor ve gelişmesine normal olarak devam ediyorsa, bu durum insan embriyo dokusunun etik kullanımı olur mu?
11. Michelle 21 yaşında, ABD'deki en iyi üniversitelerden birinde bilimsel alanda doktora adayı, çekici bir kadın. Biraz para kazanmak için, bir doğum kliniğinin yerel gazatede yer alan kısırlık sorunu olan çiftler için yumurta bağışı yapacak kadınlar arayan ilanına karşılık verir. Michelle'e her bir yumurta için yaklaşık 5 000 $ ödenecek. Birkaç yıllık süre boyunca, kısır çiftler ve embriyonik kök hücre elde etmede kullanılan somatik-hücre çekirdek transferi işlemleri için, yumurta bağışında bulunur. Bu süreçte bağışladığı yumurtalardan Michelle yaklaşık 45 000 $ kazanır. Yumurtaların-

dan herhangi birinin gerçekte başarılı bir gebeliğe yol açıp açmadığını asla bilmeyecektir. Bu durum sizin için etik olarak geçerli mi? Birine yumurtaları için ödeme yapmak kabul edilebilir mi? Yumurta bağışlamak isteyen birine, bağıştan önce ve sonra sizce hangi bilgiler verilmelidir?

12. Bir şirket tedavisi olmayan ölümcül bir hastalık için aşı geliştirir, ancak ilk denemeler aşının hastaların sadece % 40'ında etkili olduğunu gösterir. Aşının daha iyi sonuçlar alacak duruma getirilmesi (ki bu gerçekleşmeyebilir de) çalışmaları ve insanlar ölmeye devam ederken, şirket ürünü pazara sunmayı ertelemeli mi, yoksa hemen pazarlamalı mı?

13. Eğer bitkiler veya böcekler gibi GD organizmaların çevreye salınması taraftarı iseniz, bu organizmaların yayılmasını kontrol edecek bir plan oluşturunuz.

www.pearsonhighered.com/biotechnology sitesinden

Öğrenme hedefleri, bölüm özetleri, "Güncel Kalın" web bağlantıları, sözlük, bilgi kartları ve bu bölümdeki resimlerin jpeglerine ulaşabilirsiniz.