

AYLIK POPÜLER BİLİM DERGİSİ

BİLİM ve TEKNİK



YENİ UFUKLAR

GENETİK 2

MAYIS 2002 SAYISININ ÜCRETSİZ EKİDİR

HAZIRLAYAN : PROF. DR. BEYAZIT ÇIRAKOĞLU
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi - TÜBİTAK GMBAE

GENETİK UY

Yirminci yüzyılın önde gelen özelliklerinden biri, birçok teknolojinin filizlenip geliştiği bir zaman dilimi olması. Bugün 55-60 yaşlarında olan insanların, gelişmelerine tanıklık ettikleri teknolojilerin neler olduğuna baktığımızda, nükleer teknolojiden uzay teknolojisine, lazer teknolojisinden bilgisayar-iletişim teknolojisine kadar, yaşantımızı derinden etkileyen birçok teknolojinin 20. yüzyılın ikinci yarısında geliştiğini görüyoruz. Bu teknolojilerin arasında en öne çıkan ve popüler olanlarından biri de biyoteknoloji... Ancak biyoteknolojinin en yalın tanımı olan "bir mal veya hizmet üretmek için canlı organizmalardan yararlanma teknolojisi" ifadesinden yola çıkılırsa, bunun hiç de yeni bir teknoloji olmadığı görülmekte. Binlerce yıl önce insanlar daha verimli tohumlarını ayırırken, ilk yoğurdu, peyniri, şarabı üretirken, 21. yüzyılın en önemli teknolojileri arasına giren biyoteknoloji alanında ilk adımları attıklarının farkında değillerdi. Ve binlerce yıl insanoğlu gıda maddeleri üretmek için göremediği ama etkinliklerini bildiği mikroorganizmalardan

yararlandı. 19. yüzyılın ikinci yarısında Mendel ve Pasteur gibi bilim insanlarının genetik ve mikrobiyoloji alanında orijinal yaklaşımlarla vardıkları sonuçlar, biyoteknolojiye de önemli katkılar sağladı.

Ancak biyoteknolojinin günümüzde en önemli teknolojiler arasında yer almasına en büyük desteği, 20. yüzyılın ikinci yarısında hızla gelişen gen teknolojisi sağladı. Tüm canlıların genetik maddesi olan DNA molekülünün özelliklerinin anlaşılması ve belli DNA dizilerinin (genlerin)

Biyoteknolojinin Tarihinden Satır Başları

Biyoteknolojinin kökeni yaklaşık **10.000 yıl önceye**, ilk tarım toplumlarında, en iyi kaliteye sahip bitkilerin tohumlarının, bir sonraki yıl ekmeğe üzere toplanmasına dayanmaktadır. Babil, Mısır ve Roma halkının da ürün geliştirmek için bu "seçici üretim" yöntemini kullandıkları bilinmektedir.

MÖ 6000'lerde insanlar ekmeğe, bira, şarap üretiminde mikroorganizmaların biyolojik etkinliklerine bağlı doğal bir işlem olan mayalama yöntemini kullanmaya başladılar.

Bundan 2000 yıl kadar sonra **MÖ 4000'lerde** Orta Asya ve Çin'de yo-

ğurt yapmak için laktik asit üreten bakteriler kullanılırken, peynir üretimi için küften, şarap sirkesi üretimi için asetik asit bakterilerinden yararlanılıyordu.

1500'lü yıllarda tüm dünyada bitki keşif ve toplama gezileri yaygınlaştı. Bu süreç sonunda ilk bitki tip (gen) bankası kuruldu. Hastalıklara direnç gibi istenen bazı özelliklere sahip bitkiler, gelecekteki üretimlerde kullanılmak üzere saklanmaya başlandı.

Ondokuzuncu yüzyılın ikinci yarısı biyolojide önemli bir kilometre

taşı oluşturdu. Mikroorganizmalar keşfedildi ve Pasteur kendi adıyla anılan yöntemi; ısı yoluyla mikroorganizmalardan arındırma (pastörizasyon)



yöntemini geliştirdi. Gregor Mendel tohum ve bitkilerle yaptığı çalışmalarla genetiğin temellerini kurdu.

"Biyoteknoloji" terimi ilk olarak 1919'da bir Macar mühendisi olan Karl Ereky tarafından kullanıldı. O dönemde bu terim canlı organizmalar yardımıyla hammaddelerden elde edilen ürünlerin geliştirilmesi için tüm çalışmaları betimliyordu. Bu dönemde N.I. Vavilov, Rusya'da tahıl genetik kaynakları yöntemi konusunda bir planı da içeren bir araştırma ve üretim programı geliştirdi.

GULAMALAR

bir canlıdan diğerine aktarılabilmesi, yeni bir döneme girilmesine öncülük etti. Binlerce yıl sadece doğada var olan mikroorganizmalarla sınırlı kalan biyoteknoloji alanında, canlıların genetik özelliklerinin gen aktarımı yoluyla değiştirilmesiyle sınırlar genişledi. Paul Berg'in deyişiyle "gen teknolojisi sayesinde biyoteknolojinin sınırları, gökyüzü oldu". Biyoteknoloji bugün yaşamın hemen her alanında etkisini doğrudan veya dolaylı

şekilde göstermekte. Tükettiğimiz gıdalardan giysilerimize, kullandığımız kağıttan enerjiye, uzay teknolojisinden sağlığa kadar her alanda biyoteknolojiden yararlanıyoruz. Genetik değişikliğe uğratılmış (gen aktarılmış) mikroorganizmalar, bitkiler, hayvanlar, klonlanmış canlılar, farklı ürünleri toplumun kullanımına sunuyorlar. Hızı giderek artan bu teknoloji toplumun bir bölümünde derin kaygılar da uyandırıyor. Genetik değişikliğe uğratılmış organizmaların doğaya yayılması, insan klonlama çalışmalarının tüm olumsuz tepkilere ve yasaklamalara karşın süregitmesi, bu teknolojiye yönelmede çekingenliklere de yol açmakta. Ancak biyoteknolojinin bir teknoloji olduğunu ve kullanım amacına göre insanlığa yararlı veya zararlı olacağını unutmamak gerek. Biyogüvenlik koşullarını hiç aksatmadan doğaya ve topluma zarar vermeyecek bir biyoteknolojinin, gelecekteki birçok sorunun çözümüne büyük katkı sağlaması beklenmekte.

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

Biyoteknoloji 20. yüzyılın başında endüstri ve tarıma aynı zamanda girdi. Nişastadan aseton ve boya çözücülerini üretimi için mayalama yöntemleri geliştirildi.

1932-1952 arasında araştırmacılar hücre biyolojisi konusunda yoğun araştırmalar yaparak, gen mu-

tasyonlarıyla proteinlerin aminoasit dizileri arasında doğrudan bir bağlantı olduğunu saptadılar.

İkinci Dünya Savaşı yıllarında penisilin keşfi, dikkatleri ilaçların üzerinde topladı. Bunu izleyen "Soğuk Savaş" döneminde birçok ülke yeni bir savaşta kullanılmak üzere biyolojik ajan üretimine ve yeni antibiyotikler geliştirmeye yönelik yoğun çaba harcadılar.

Modern moleküler biyolojinin **1953'te** DNA'nın yapısının bulunmasıyla girdiği yeni dönem, genetik ve moleküler biyoloji-genetiğe dayalı biyoteknoloji çağı olarak adlandırıldı. Bu dönemin ilk yıllarında DNA'nın kopyalanması ve protein sentezi konularında çok sayıda çalışma yürütül-



dü. 1965'te ilk kez fare ve insan hücreleri birleştirildi ve genetik kod aydınlatıldı.

1972'de Paul Berg DNA'yı belli bölgelerinden kesen "restriksiyon" enzimleri kullanarak iki ayrı organizmaya ait DNA parçalarını birleştirdi.

1974'te Stanley Cohen ve Herbert Boyer, bir geni plazmit aracılığıyla bakteriye aktardılar.

1975'te Kohler ve Milstein, hücre füzyonu yöntemiyle yüksek özgüllüğe sahip monoklonal antikorlar ürettirtiler.

1976'da ABD'de ilk genetik şirketi Genentech Inc, iki moleküler biyolog tarafından kuruldu. Şirket 1977'de insan büyüme hormonu ve 1982'de insan insülin genlerini bakteride klonladı. 1983'te Lilly firması rekombinant insülin üretimi için izin aldı.

1981'de gama-interferon klonlandı ve bunu tıp ve endüstri için gerekli birçok gen izledi. İlk monoklonal antikor temelli tanı kiti, kullanı-



TRANSGENİK

Memeli hayvanlarda süt verimi, hızlı gelişme, yün kalitesi gibi amaçlarla uzun süreli çaprazlama ve seçim işlemleri uygulamak yerine, bakteri ve bitkilerde olduğu gibi gen aktarım yönteminin kullanılması, ilk kez 20 yıl önce başarılıydı. ABD'de iki araştırmacı, insan büyüme hormonu genini taşıyan ve bu genin etkinliği sonucunda normal farelerden 4 katı büyüklükte olan "transgenik" fareler geliştirdiler.

Transgenik hayvanların geliştirilmesi için yaygın olarak kullanılan yöntem, "mikroenjeksiyon" oldu.

Bu yöntemde :

- Erkek farelerle çiftleştikten kısa bir süre sonra, dişi farelerin döllenmiş yumurta hücreleri alınarak,

- Bu hücrelerde yaşamın ilk hücre-sini (zigotu) oluşturmak üzere henüz biraraya gelmemiş dişi veya erkek ö-nçekirdeklerden (pronukleus) birine, 1 mikron çaplı bir mikroinjektörle 1 pikolitreye (1 mililitrenin milyonda biri) hacim içinde, istenen genden 200-400 kopya aktarılmakta,

- Bu genetik değişikliğe uğratılmış hücreler, ilk grupta aynı zamanda steril (kısır) erkek farelerle çiftleştirilmiş ve yumurta hücresi döllenmediği halde hamile özellikleri göstermeye başlayan psödopregnant (sahte hamile)



dişi farelerin (taşıyıcı annelere) rahimlerine küçük bir operasyonla yerleştirilmekte,

- 21 gün sonra dünyaya gelen yavruların aktarılan geni taşıyıp taşımadıkları, kuyruklarından alınan kan örneklerinde yapılan testlerle saptanmakta ve

- Gen taşıyan yavrular kendi aralarında çiftleştirilerek, yabancı geni her iki kromozomu üzerinde de taşıyan (homozigot) fareler elde edilmekte.

Bu yöntem bazı değişikliklerle balıktan tavuğa, koyundan sığıra kadar birçok hayvanda uygulandı. Genetik yapıları insanla benzerlik taşıyan fare-



ma sunuldu. İlk kez bir insan geni (insan büyüme hormonu geni) taşıyan bir "transgenik fare" geliştirildi.

1985'te böcek virüs ve bakterilerine dirençli gen aktarılmış bitkilerin tarla testleri yapıldı.

1987'de uzun raf ömrüne sahip transgenik domates için Colgene Inc. patent aldı. Aynı yıl rekombinant (yeni-bileşen) Hepatit B aşısı üretildi.

1988'de göğüs kanserine yatkın genetik yapısı değiştirilmiş bir fare patentlendi. Genencor Int. firması detarjanlarda kullanılacak bir rekombi-

nant proteaz (protein parçalayan enzim) için patent aldı. İlk transgenik bitki pazara çıktı.

1989'da ABD'de İnsan Genomu Araştırma Ulusal Merkezi kuruldu ve 2005'e kadar insan genomu projesinin bitirilmesi hedeflendi.

1990'da Hepatit C virüsü tanı kitini patent alarak kan bankalarında kullanılmaya başlandı. Gen Pharm Inc.

sütünde bebekler için insan proteinleri içeren bir transgenik sığır geliştirdi.

1992'de ABD ordusunda askerlerin kimlik tespitini kolaylaştırmak için kan ve doku örneklerinin alınarak saklanmasına

başlandı.

1994'te genetik yapısı değiştirilmiş ilk domates satış izni aldı. Genentech büyüme hormonu kökenli ilaç için onay aldı.

1995'te insan Alzheimer hastalığı geni taşıyan bir transgenik fare geliştirildi. Kanserle karşı bağışıklık sisteminin uyarılması ve rekombinant antikor uygulamaları başlatıldı.

1996'da *E.coli* bakterisini saptayabilen ucuz bir tanı biyosensörü geliştirildi.

1997'de ilk kez bir memeli canlı (koyun Dolly) klonlandı. İlk antikor kökenli kanser ilacı onaylandı.

1998'de embryonik

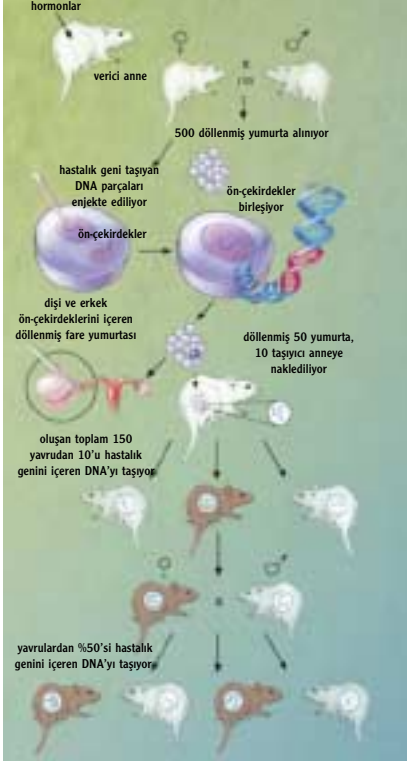


kök hücrelerin kültür ortamında gelişmeleri başarılıydı. Japonya'da tek bir sığırdan alınmış hücrelerle sekiz kopya geliştirildi.

1999 Klon hayvan sayısı hızla arttı.

2000 İnsan Genom Projesi ön sonuçları açıklandı.

HAYVANLAR



bir protein olan doku plazminojen aktivatörü geninin, farede süt protein geni düzenleyen bölgeyle birleştirilip aktarılmasıyla, dişi bir transgenik fare elde edildi. Transgenik dişi farenin sütünün, insan proteinini de içerdiği ve bir kan pıhtısının üzerine damlatıldığında etkinliğini gösterip pıhtıyı parçaladığı görüldü. Bu çalışma bazı hastalıkların tedavisi için zorunlu bazı proteinlerin ve hormonların, sistem olarak insana yakın memeli hayvanların sütlerinden elde edilebileceğini gösterdi ve yeni bir dönemin kapısını araladı.

Gen aktarımı için hedef hayvanlar, bol süt veren sığır ve koyun olarak ön plana çıktı. Ancak bu konuda önemli zorluklar vardı. Transgenik koyun veya sığırlar elde etmek ve bu hayvanları kendi aralarında çiftleştirerek homozi-

got koyun veya sığır elde etmek, farelere oranla çok daha zor ve uzun zaman gerektiriyordu (yaklaşık 8-10 yıl).

Buna ek olarak uzun ve zor bir çalışma sonunda geliştirilebilecek, dişi koyun veya sığırla yapılacak üretim de aynı genetik özellikte bir karşı cins olmaması nedeniyle, o hayvanın yaşamıyla sınırlı olacaktı. Araştırmacıların bu sorunlara karşı geliştirdikleri çözümlerle bir başka dönemi başlattı: Hayvan kopyalama (klonlama)...

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

Kaynaklar
www.cyagra.com/process.html
www.sciam.com/explorations/030397clone/030397beards.html
www.nap.edu/html/human_cloning/ch3pdf
www.nap.edu/books/0309076374/html

lerde yapılan çalışmaların, genellikle tıbbi araştırma amaçlı hastalık modellemeye (hastalık yapıcı mutant genler aktarmaya) veya bir genin işlevini anlamaya yönelik olduğu görülmekte.

1980'lerin sonunda farelerle yapılan bir çalışmada farklı bir yaklaşım kullanıldı: İnsanlarda kan pıhtılarını çözen



2001 İnsan Genom Projesinden ilk kesin bilgiler elde edilmeye başlandı.

Kök hücrelerinin kültürü ve farklılaşmasıyla istenen dokuların elde edilmesi konusunda önemli adımlar atıldı.

Yürütülen Projelerin Örnekler

Biyoteknoloji devriminin temelinde birçok buluş var. DNA klonlamadan bi-

yoinformatiğe kadar genom dizisi analizinde, gen "chip" teknolojisinde ve protein profil analizlerinde önemli boyutlarda veri elde edildi. Biyolojik sistemlerin karmaşıklığını anlamak için bu bilgiler nasıl değerlendirilip yorumlanıyor? Biyomedikal araştırmalarda bu bilgilerden nasıl yararlanılıyor? Aşağıdaki birkaç büyük proje bu soruların yanıtlanmasına yardımcı olabilir:

*Mamut Klonlama

Bir grup araştırmacı 23.000 yıldan bu yana buzullar içinde bozulmadan kalmış bir mamut hücresinden yola çıkarak mamutları yeniden dünyaya getirmeye çalışıyorlar. En büyük sorun, bu hücreden elde edilecek DNA molekülünün bütünlüğünün bozulmamış olması. Çekirdeği çıkartıl-

mış bir fil yumurta hücresine, mamut hücre çekirdeğinin aktarılmasıyla geliştirilecek embriyonun, bir dişi fil rahmine yerleştirilerek dünyaya getirilmesinin çok kolay ve gerekli bir çalışma olmadığı kesin. Ayrıca bu çalışmanın getireceği etik ve ekonomik açımlar da söz konusu.

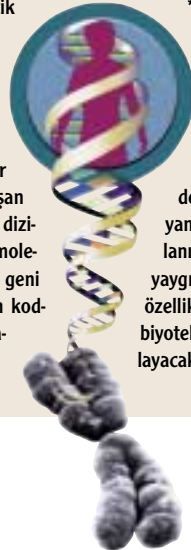
*İnsan Genomu Projesi

İnsan Genomu Projesinin hedefi 3,2 milyar birimden (nükleotid) oluşan insan DNA molekülünün dizisini saptamak; bu dev moleküldeki yaklaşık 35.000 geni tanımlamak. Bu genlerin kodladıkları proteinlerin yapısal özelliklerini ve iş-

levlerini aydınlatmak. Bu projenin, modern tıp başta olmak üzere birçok alanda önemli gelişmelerin odağı olacağı bugünden biliniyor (Ayrıntı için Bilim ve Teknik Nisan 2002 sayısı ekine bakınız).

*Gen çip (DNA mikro dizi)

Bir çipin üzerine binlerce küçük DNA dizisinin bağlanmasıyla oluşturulan gen çip DNA değişimlerini (mutasyonları) ve gen ifadesindeki (genden proteine geçişteki) değişimleri melezlemeyle saptayan bir yöntem. Günümüzde kullanılmaya başlanan ve giderek yaygınlaşan bu yeni teknik, tıpta özellikle tanı ve tedavide, yanı sıra biyoteknolojide de önemli katkı sağlayacak.

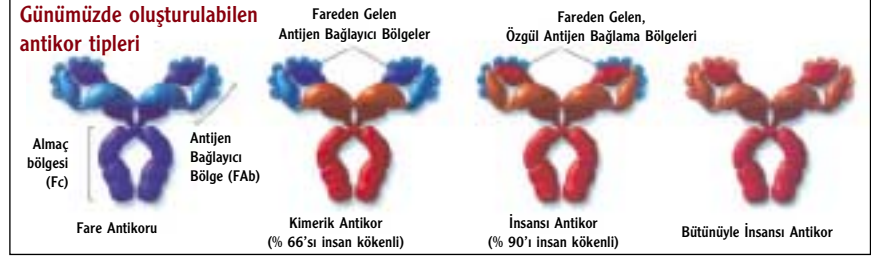


MONOKLONAL

Günümüzde organizmalarda yabancı maddelere (antijenlere) karşı gelişen tepkinin en önemli unsurunun antikorlar olduğu biliniyor. Organizmaya giren yabancı madde, kendine özgü bir antikorun üretimine neden oluyor ve bu antikorlar antijene özgün şekilde bağlanarak onu etkisiz hale getiriyorlar. Onlarca yıldan beri bu gözlemden yola çıkarak, hastaların idrar, kan gibi vücut sıvılarından izole edilen bakteri veya virüsler kobay, domuz, at gibi değişik hayvanlara verilerek bu hayvanların kan serumlarından söz konusu antijenlere özgü antikorlar elde edilmekte. Aynı şekilde, çeşitli insan protein ve hormonlarına karşı, değişik hayvanlardan antikorlar üretilmekte ve bu antikorlar çeşitli örneklerde araştırılan mikroorganizma veya proteinin varlığını, nitel veya nicel olarak belirlemede kullanılmakta.

Antijen-antikor reaksiyonu bağışıklık sağlayıcı birçok yöntemin geliştirilmesine yol açmış durumda. Bunlardan en yoğun kullanılan ve güncel olanı hiç kuşkusuz ELISA. ELISA (Enzyme Linked Immuno Assay = enzime bağlı bağışıklık testi) iki değişik antikorun kullanıldığı ve araştırılan antijenin varlığını renk değişimiyle gösteren bir test yöntemi.

Bir antijen (bakteri, virüs, hücre veya molekül) "epitop" adı verilen birçok antijenik bölge içerir. Her epitop ayrı bir antikor tipi tarafından tanınır. Bir antijen organizmaya girdiğinde her epi-



top için bir grup B-lenfosit hücresi özgül antikor üretmeye ve bölünerek çoğalmaya başlarlar. Böylece her epitop için özgül antikor üreten bir B-lenfosit kolonisi oluşur. Bir antijene karşı değişik B-lenfosit kolonileri oluştuğu için elde edilen antikora "poliklonal" (çok kolonili) antikor adı verilir.

Bakterilerin, virüslerin, hormonların ve proteinlerin bazı ortak epitoplara sahip olmaları, bağışıklık testlerinde ayırd etme olanaklarını önemli ölçüde kısıtlar. Örneğin insan LH, FSH, hCG, THH hormonlarının ortak bir epitop içermeleri, bu hormonlara karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlarla yapılan testlerde çapraz reaksiyonlara ve kuşku sonuçlara yol açabilmekte.

1972'li yılların ikinci yarısında Cambridge Üniversitesi'nden G. Kohler ve C. Milstein'in geliştirdikleri yeni bir teknik, bir tek epitopa özgü (monoklonal) antikorların, hem de sınırsız miktarlarda elde edilebilmelerine olanak sağlayarak, moleküler biyolojinin yüz yılının ikinci yarısında gösterdiği hızlı ilerlemede önemli bir kilometre taşı oluşturmuş durumda. Bu tekniğe hibri-

doma teknolojisi adı veriliyor.

Hibridoma teknolojisinin temelinde üç bilgi bulunur:

1- B-lenfositler tek bir epitopa özgü antikor üretilen salgılayan, yaşam süreleri birkaç günle sınırlı kan hücreleridir.

2- Tümör hücreleri bölünerek çoğalma kontrolünü kaybetmiş, hızla üreyen ölümsüz hücrelerdir.

3- Belli koşullarda aynı organizmaya ait değişik hücreler birleştirilerek her iki hücrenin özelliklerini taşıyabilen melez hücreler (hibridoma) elde edilebilir.

Bu teknik, bir antijenle bağışıklık sistemi harekete geçirilmiş (immünize edilmiş) bir hayvanın kan serumundan sınırlı miktarda antikor elde etmek yerine, bu hayvanların (genellikle fare) dalaklarında bulunan B-lenfosit hücrelerini ayırıp, özel koşullarda myeloma (kanseri B-lenfosit hücreleri) ile kaynaştırmaya (füzyona) tabi tutma temeline dayanır. Bu işlemde elde edilen melez (hibrid) hücreler antikor salgılamak özelliklerini B-lenfositlerinden, ölümsüzlük özelliklerini de tümör hücrelerinden almışlardır. Bu hibrid hücre-

Tedavi Amaçlı Antikorlar

İnsan monoklonal antikorlarının klinik-öncesi gelişme süresini ve maliyetleri önemli ölçüde azaltacağı hesaplanmakta :

Klinik-öncesi geliştirme süreci:

Yeni kimyasal ilaç : 6 yıl

Monoklonal antikor: 1.5 -2 yıl

Klinik-öncesi geliştirme maliyeti (milyon dolar):

Yeni kimyasal ilaç : 20 milyon dolar

Monoklonal antikor: 2-3 milyon dolar

Bunun nedeni insan monoklonal antikorlarının doğal proteinler olmaları, dolayısıyla kimyasal ilaçlardan daha az toksik ve daha etkin olmaları.



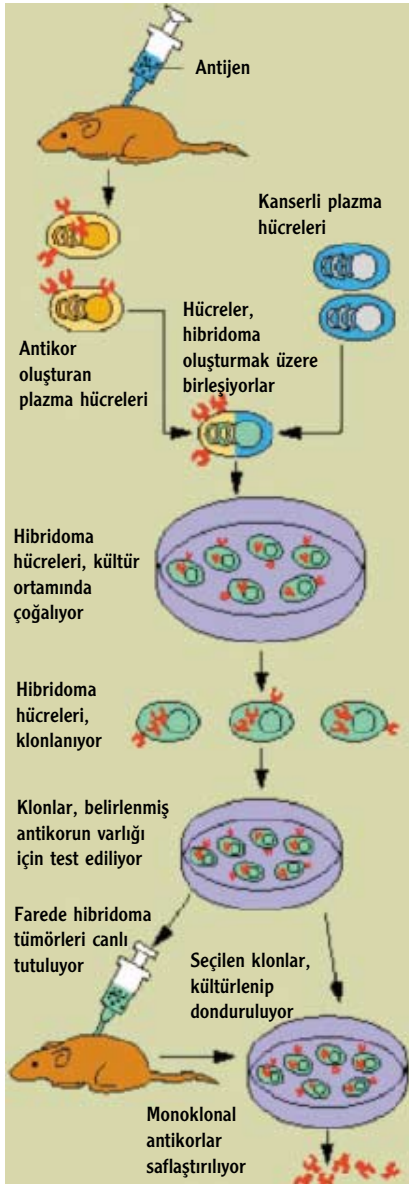
Kullanımda Olan Monoklonal Antikorlar

İlaç adı	Kullanıldığı Hastalık	Onay Tarihi
-Orthoclone		
OKT3	Doku reddi	Haziran 1986
-Rituxan	Non Hodgkin Lenfoma	Kasım 1997
-Simulect	Organ reddini önleme	Mayıs 1998
-Remicode	Romatoid Artrit	
	Chon hastalığı	Ağustos 1998
-Zenapax	Organ reddini önleme	Aralık 1997
-Synogis	Solunum syncytial virüsü	Haziran 1998
-Herceptin	Metastatik meme kanseri	Eylül 1998
-Mylotarg	Akut Myeloid Lösemi	Mayıs 2000
-Campath	Kronik Lenfosit Lösemi	Temmuz 2001

ANTİKORLAR

ler ELISA yöntemiyle antikor salgılama özelliklerine göre ayrılıp, sonra tek tek yeni kültür ortamlarına dağıtılarak, sadece bir tek epitopa karşı antikor (monoklonal antikor) salgılayan kolonilerin gelişmesi sağlanır. Monoklonal antikor salgılayan bu ölümsüz hibrid hücreler, istendiğinde sıvı azot içinde dondurularak yıllarca saklanabilir. Bir başka seçenek de hibrid hücrelerin farelerin karın boşluğuna enjekte edilerek ya da özel fermentörlerde çoğaltılarak, salgıladıkları monoklonal antikorları ticari boyutlarda elde etmek.

Monoklonal antikorların, antijenleri



özel epitoplarına göre son derece üstün bir duyarlılık ve özgünlükle tanıyabilme özellikleri, bu antikorların tıpta ve ziraatte yoğun şekilde kullanılmasına yol açmış bulunuyor. Günümüzde AIDS'ten sarılığa kadar birçok viral hastalık, kanser ve tümör oluşumları, hormon eksiklik veya fazlalıklarına bağlı hastalıklar ve hamilelik, hep monoklonal antikorların kullanıldığı immünolojik tanı yöntemleriyle tespit edilmekte.

Hastalıkların büyük bir kısmı, yanı sıra hamilelik, vücut sıvılarında bakteri ve virüslerin varlığı, protein ve hormonların miktarlarının, ELISA veya benzeri immünolojik testler yardımıyla saptanır. Tümörler de tümör hücrelerinin yüzey antijenlerine karşı geliştirilmiş ve radyoaktif işaretlenmiş monoklonal antikorlar yardımıyla, vücuttaki yerleri, boyutları ve tipleri açısından incelenebilmekte.

Tedaviye yönelik çalışmalardaysa özellikle tümöral hastalıklarda, tümör hücrelerinin yüzey antijenlerine karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar, laboratuvar da bağlandıkları kemoterapötik ajanı (ilacı), vücuttaki sağlıklı diğer hücreleri etkilemeden doğrudan tümöre yönlendirmede kullanılıyor. Tarım ve hayvancılıkta da bakteriyel veya viral hastalıklar tıptakine benzer immünolojik yöntemlerle, erken aşamada tespit edilebiliyor ve böylece büyük salgınlar, hasta tohumların, bitkilerin ve hayvanların bir ülkeden diğerine geçişi önleniyor. Tıpta ve tarımda yararlanılmak üzere, monoklonal antikor kullanılarak geliştirilmiş immünolojik tanı kitlerini üreten firmaların sayısı da her geçen gün artmakta. Tümör hücrelerinin yüzeyindeki almaçları (reseptör) bloke etmekle, bu hücrelerin büyüme, çoğalma sinyalleri olarak çoğalmalarını engellemek de mümkün. Son yıllarda monoklonal antikor temelli birçok ilaç, gerekli izinler alınarak hastaların tedavisinde kullanılmaya başlanmış durumda.

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

DNA Çip Teknolojisi

Genlerin DNA dizilerindeki bozulmaların ve değişikliklerin (mutasyon) bazı hastalıkların nedeni oldukları bilinse de bu mutasyonları tanımlamak kolay değil. Bir gende hastalıklara neden olabilecek çok sayıda farklı mutasyon bulunabilir. Örneğin meme ve yumurtalık kanserlerinin %60'ının temelindeki BRCA1 ve BRCA2 genlerinin çok sayıda mutasyon içerdikleri biliniyor. Sadece BRCA1 geninde bugüne kadar 500'den fazla mutasyon bulundu. DNA mikroçip bu mutasyonların hızlı ve etkin şekilde saptanmasında devrim yaratan bir yaklaşım olarak kabul edilmekte. DNA çipleri bir plakının yüzeyine aynı bilgisayar çiplerinin üretildiği yöntemle bir normal gen dizisine eş sentetik bir DNA dizisi bağlanmasıyla elde ediliyor.

Bir genin (örneğin BRCA 1'in) mutasyon içerip içermediğini belirlemek için bireyden bir kan örneği alınıyor ve kontrol olarak da her iki gen kopyası normal olan bir DNA kullanılıyor.

Bu DNA örnekleri denatüre edildikten (çift sarmal yapısı iki dizi haline getirildikten) ve küçük parçalara bölündükten sonra bu parçalar floresan boyalarla işaretleniyor.

Bireyin DNA'sı yeşil normal (kontrol) DNA kırmızı boyayla işaretleniyor. Her iki DNA'nın parçaları çipin üzerine sabitlenip yapay BRCA1 DNA'sıyla biraraya getirilerek birbirlerine bağlanmaları sağlanıyor (hibridizasyon).

Eğer birey, geninde mutasyon taşıyorsa, hem yeşil hem de kırmızı işaretli DNA parçaları çip üzerindeki DNA dizilerine bağlanıyorlar. Eğer bireyde mutasyon varsa, yeşil işaretli DNA bağlanmadığı için çip üzerinde sadece kırmızı işaretli DNA (ve renk) görülüyor.

Araştırmacı, bu yöntemle bir geni oluşturan çok sayıda küçük DNA dizisini bilgisayar programları da kullanarak kısa sürede ayrıntılı şekilde inceleyebiliyor.

Bugün için ağırlıklı olarak araştırma amaçlı kullanılan DNA mikroçipleri tanı yöntemi olarak da hayata geçirilmeye başlanıyor. Yakın gelecekte bu teknikle başta kanser, diyabet, kalp hastalıkları olmak üzere, birçok hastalığa yakınlık erken dönemde saptanabilecek.

www.cgen.com
www.bio.davidson.edu/courses/genomics/chip
www.ich.ucl.ac.uk/cmgs/chip98.htm

YENE BİLİR AŞILAR

Dünya Sağlık Örgütü'nün verilerine göre her yıl beş yaşın altında 12 milyon çocuk, bulaşıcı hastalıklar nedeniyle ölmekte. Bu ölümlerin büyük kısmı üçüncü dünya ülkelerindeki sağlık hizmetlerinin azlığından ve özellikle aşı yokluğundan kaynaklanıyor. Dünyanın yıllık aşı gereksinimi iki milyar doz. Her çocuğun yaşamının ilk yıllarında yaklaşık 15 doz aşıya gereksinim var.

Ulaştırma, sterilizasyon sorunları ve özellikle soğuk zincirin dünyanın her bölgesinde sağlanamaması, araştırmacıları daha pratik aşılar geliştirmeye yönlendirmekte. Yenilebilir aşılar bu çabaların bir ürünü. Muz, patates gibi, çocukların kolay kolay hayır demeyeceği bitkilere bulaşıcı hastalık unsurlarının (bakteri veya virüs) bağışıklık sistemini uyaracak bir proteinini kodlayan genini aktararak, muz veya patateste bu proteinin varlığını sağlamak, bu meyve veya sebze tüketen bireylerde aşı etkisi yapıyor.

Özellikle gelişmekte olan ülkelerde çok rastlanan Hepatit B, kolera, gibi hastalıklara karşı geliştirilen yenilebilir aşuların etkisi, uzun süre fareler üzerinde araştırıldı, 1998'de ağır bağırsak enfeksiyonlarına neden olan E. coli'ye karşı bağışıklık kazandırmak için ABD'de iki üniversite ve bir araştırma

Aşılı Patateslerin Üretimi



enstitüsü tarafından geliştirilen patates, gönüllüler üzerinde denendi. Gönüllülere bu özel patatesten ilk, 7. ve 21. günlerde 50 gram verildi. Aşının hiç bir yan etkisine rastlanmazken patates yiyerek aşılanan bireylerin %91'inin kan serumlarında ve %55'inin hem kan serumu hem de bağırsaklarında E. coli'ye karşı antikor düzeylerinin yükseldiği görüldü. Bu çalışma ucuz, taşıma ve saklamada özel koşullar gerektirmeyen, gelişmekte olan ülkelerin kolayca uygulayabilecekleri aşuların üretimi yolunda ilk adımdı.

Bugün dünyanın birçok bölgesindeki araştırmacılar, yenilebilir aşılar geliştirmek için çalışıyorlar. Genetik değişikliğe uğratılmış gıda maddelerine karşı çıkanlar, yenilebilir aşılara karşı daha ılımlılar. Bu çalışmaların amacı tüm insanları bir araya getiriyor: Çocuklar ölmesin (Şeker de yiye-bilsinler)!

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

Kaynaklar
www.sciam.com/2000/0900 issue/0900langridgebox2.html
www.thebody.com.niaid/edivac.html
www.sciencenews.org/sn_are98



Yenilen Aşıların Koruma Biçimi

Yenilen aşidaki antijen, bağırsaktaki M hücrelerce alınarak çeşitli bağışıklık hücrelerine aktarılır. Bu hücrelerin antijene "saldırarak" geliştirdikleri tepki, bellek hücrelerinin, gerçek hastalık etkeniyle karşılaştıklarında da doğru tepkiyi vermesini sağlar.



BİYOTEKNOLOJİ VE İNSAN SAĞLIĞI

Biyoteknoloji insan sağlığına yarar sağlayarak yaşam kalitesini yükseltir ve ömrün uzamasını sağlar. Geçen yüzyılın sonlarında gen teknolojisinin ilerlemesiyle, insan genlerinin kodlandığı proteinlerin bazıları bakteride üretilmeye başlandı. Bilindiği gibi, hücrelerimizin en az elli bin farklı protein yapabildiği tahmin ediliyor. Bazı proteinler acil durumlarda ilaç yerine kullanılabilir: örneğin önemli bir organda kan pıhtısının acilen çözülmesi gerektiğinde, işlevi pıhtı yoketme olan bir protein kullanılır. Başka proteinlerse bazı kişilerde genetik ya da başka nedenlerden yapılamadığından, eksikliğin giderilmesi ancak yine proteinin dışarıdan verilmesiyle mümkündür. Gen aşılama yoluyla başka bir canlıda üretilen ilk insan proteini, 1982 yılında bakteriden elde edilmeye başlanan insülini. Şeker hastaları için zorunlu olan bu proteini, büyüme hormonu ve başka proteinler izledi. Bakterilerin ucuz protein üreten fabrikaları olarak kullanılabilmesi, büyük avantajları sağlıyor. Ancak bakteri, bazı proteinleri insan hücrelerinde olduğu gibi son haline getiremediğinden, bu proteinlerin üretimi için insan hücreleri gibi ökaryot (çekirdekli hücre) olan maya hücreleri ya da koyun gibi memeli hayvanların hücreleri kullanılıyor. Kolesterolü düşürmek için kanda kolesterolü taşıyan proteinler, kan pıhtısını eriten proteinler ve kanın pıhtılaşmasını sağlayan proteinler de biyoteknolojiyle elde edilebilen proteinlere örnek olarak verilebilir. Biyoteknoloji ürünleri, kandan elden edilen proteinlerin aksine, sarılık (hepatit) ya da AIDS hastalığına neden olan HIV virüsü gibi kana bulaşabilen mikropların hastaya geçmesine aracılık etmez. İnsan geni taşıyan koyun ve ineklerin süt bezelerinde ürettikleri, dolayısıyla sütlerinden elde edilen proteinlerden sonra, gündemde bitkilerin kullanımı var. Yakın gelecekte, değişik insan proteinleri üretmek amacıyla yetiştirilen bitkilerden oluşmuş tarlalar görebileceğiz!

Bakterilerde artık aşı da üretilebiliyor. Geleneksel aşılarda üretiminde, öldürülmüş ya da hastalık yetisi yok edil-

miş mikroplar kullanılıyor. Şimdiyse virüs ya da bakterinin yüzey proteinlerini bir başka bakteride üretmek mümkün. Böylece mikrobun kendi değil de, yalnızca bir proteini aşı olarak kullanılıyor. Bu yolla, çok masraflı olan virüs üretimine gerek kalmıyor. Üstelik, verem aşısında olduğu gibi, hastalık yapabilen bakterin aşıda bulunma riski önleniyor. Rekombinant (yenibeleşen) DNA yöntemleriyle hepatit B aşısı eskiye göre çok ucuza mal edilebilir durumda ve artık yaygın bir şekilde uygulanabiliyor. Küçük çocuklara bu aşının yapılmasıyla, halen ülkemizde % 10-15 dolayında olan taşıyıcı sayısının, ileride azalması bekleniyor.



Genetik bilimi ilerleyip kalıtsal hastalıkların moleküler temelleri aydınlandıkça, sağlığa yapılabilecek katkılara zemin hazırlanıyor. Kalıtsal bir hastalıktan sorumlu bir gen bulunduğu, yani hastanın hangi geninde bozukluk olduğu anlaşıldığında, hem hasta, hem de ailenin diğer bireyleri için çok şey yapılabilir. Ailede başka kimlerin bu gen bozukluğunu taşıdığı belirlenip, riskli gebeliklerin ilk on haftasında fetusa tanı konulabilir. Bu doğum öncesi tanı işleminin yerini yakın gelecekte yaygın olarak uygulanabilecek "preimplantasyon tanı" alacak; yani tüp bebek aşamasında fetus, kalıtsal hastalığın varlığı bakımından incelenip, hasta olmayacak fetusların seçilmesi mümkün olacak.

Biyoteknolojinin hastaya yararıysa, yapısı bozuk gene bağlı olarak vücudun yapamadığı proteinin, hastaya verilmesi. Büyüme hormonu ve kanın pıhtılaşmasını sağlayan proteinler gibi kana verilebilen gen ürünleri için bu, kolay bir işlem. Diğerleri içinse gen tedavisi uygulamasına başlanıyor. Örneğin karaciğer belli bir enzimi üretmiyorsa, organın % 10'u kesilerek çıkarılıyor ve laboratuvarında hücrelere yapısı düzgün gen molekülleri (DNA) ekleniyor. Bu hücreler daha sonra karaciğere verilerek onların organla bütünleşmesi sağlanıyor. Halen deneysel aşamada olan bu tedavi yönteminin bütün hastalıklara uygulanmasının kaç yıl olacağını kestirmek zor.

Genetiğin bir yararı da risk altında olanların belirlenmesi. Örneğin genetik olarak kansere yakalanma riski yüksek olanlar belirlenebilirse, bu kişiler tanı açısından takibe alınabilir ve kansere başlangıç aşamasında müdahale edilebilir. Kanser tedavisi için doğrudan kanser hücrelerini hedef alan, dolayısıyla diğer dokulara hasar vermeyen bazı ilaçlar da deneme aşamasında.

Eskiyen dokuların yenilenmesi ya da organların tamiri amacıyla kök hücrelerin kullanılmasına yönelik bilimsel araştırmalar sürmekte. Kök hücreler yeni doku oluşturma potansiyeline sahip olduklarından, örneğin beyin ya da kalpte hasar görmüş dokunun yenilenmesi amacıyla bu tür hücrelerin kullanımı hedefleniyor. Ayrıca biyoteknoloji yöntemleriyle laboratuvarında (yani insan vücudunun dışında) idrar torbası gibi organların üretilmesine çalışılıyor. Hayvandan insana organ nakli de geleceğin hedeflerinden. Ama bu amaç için hayvanın bazı genlerini değiştirmek gerekiyor. Bu genler, bağışıklık sisteminin dokuları yabancı olarak tanımasını sağlayan proteinler kodluyorlar. Biyoteknoloji öyle bir hızla geliyor ki, gelecek on yılda bile sağlığa ne tür yeni katkılar olacağını kestirmemiz olanaksız.

Prof. Dr. Aslı Tolun
Boğaziçi Üniversitesi Moleküler
Biyoloji ve Genetik Bölümü
Türkiye Bilimler Akademisi Üyesi

KLONLAMA

Üremenin aseksüel (eşeysiz) şekli olan klonlama, aynı genetik yapıya sahip (birbirinin aynısı) canlıların oluşturulması anlamına geliyor. Memelilerde döllenmiş yumurtanın anne rahminde bölünmesi ve ayrı ayrı gelişmesi sonucu oluşan tek yumurta ikizleri, doğal klonlar. 1980'li yıllarda araştırmacılar bu doğal olayı kopya ederek ilk kez koyunu klonladılar. Burada uygulanan yöntem, bir embriyonun hücrelerini dağıtarak ayrı ayrı gelişmelerini sağlamaktı. Ancak bu yöntem, birbirinin aynı olan embriyo sayısının 4'ü geçmesine olanak tanımıyordu. Sayıyı artırmak amacıyla daha fazla sayıda hücreye sahip embriyonun her bir hücresi, çekirdeği alınmış yumurta hücreleriyle birleştirilerek ilk nükleer (çekirdek) transfer çalışmaları başlatıldı. Bu yöntemle 1988 yılında ilk klon tavşanlar elde edildi ve bunu takip eden birkaç yıl içinde de bu yöntem çiftlik hayvanlarında uygulanmaya devam edildi. Bunun ardından 1996 yılında kültüre edilen embriyonik kök hücrelerin çekirdek transferiyle koyunlar elde edildi. Bu tarihe kadar sadece embriyonik hücre çekirdeğinin klonlamada kullanılabileceği ve bir canlıyı oluşturabileceği görüşü

hakimdi. Bu nedenle 1997 yılında 6 yaşındaki bir koyunun meme hücresi kullanılarak bir klon kuzunun elde edilmesi, klonlamanın tarihinde bir dönüm noktası oldu. Artık sadece bir embriyonun benzeri birkaç embriyo oluşturulmakla kalınmayacak, erişkin bir canlının kopyaları üretilebilecekti. Öyle de oldu ve günümüze kadar birçok koyun, keçi, sığır ve domuz bu yolla klonlandı.

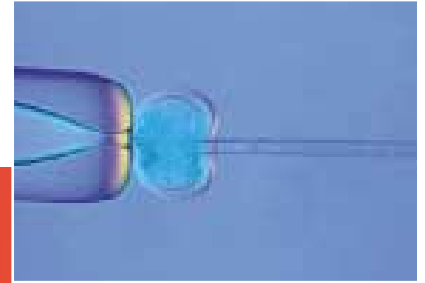
Ancak klonlama tekniği tüm memelilerde aynı oranda başarıya ulaşamadı. Örneğin ilk kez embriyonun hücreleri kullanılarak elde edilen klon tavşanlardan bu yana, hâlâ erişkin bir



Klonlamanın Uygulama Alanları

Hayvancılıkta klonlama

Olgun vücut hücresi kullanılarak yetiştirilen bir hayvanın klonlanmasının ardından, klonlama hayvancılıkta önemli bir yer edindi. Bu teknoloji sayesinde kaliteli çiftlik hayvanlarının bir anda



klonlanarak çoğaltılabileceği düşünülüyor. Klasik yöntemlerle çiftlik hayvanlarının genetik ıslahı ve iyi kalitede bir sürünün pazara ulaşması 5 ila 25 yıl alırken, klonlamayla bu süre 3 ila 5 yıla kadar düşebilecek.

ABD'de yapılan bir araştırma, kesilmiş sığırlardaki et dağılımının standart olmamasının, sığır başına yaklaşık 250 dolarlık bir kayba neden olduğunu göstermekte. Bu nedenle et sanayiindeki milyon dolarlık kaybın, iyi kalitede sığır ırklarının klonlanarak tektip sürülerin oluşturulmasıyla önleneceği vurgulanmakta. Yine bu teknoloji sayesinde yaşlandığı için artık yavru veremeyen iyi kalitede bir hayvan, klonlanarak çoğaltılabilir ve yeniden üretimde kullanılabilir. Bu şekilde ABD'de bir çiftlik sahibinin isteği üzerine, 13 yaşında ve artık döl vermeyen etçi ırktan bir ineğin sekiz adet klonu üretilerek ilk ticari sığır klonlaması gerçekleştirildi. Klonlama şirketi ProLina Inc., bu ilk klonlamanın ardından yedi farklı etçi ineği aynı çiftlik sahibi adına klonladı. Bu teknolojinin hayvancılık açısından diğer bir önemi, hayvanlarda genetik değişiklik yapılmasına da

tavşanın klonu elde edilebilmiş değil. Aynı şekilde insana benzerliğiyle tanınan maymun da, bir embriyonun bölünmesiyle veya bir embriyonun her bir hücresinin yumurta hücrelerine transfer edilmesiyle klonlanmaya çalışıldı ve bugüne kadar ancak üç tane klon maymun elde edilebildi. Ancak bunların hiçbiri erişkin bir maymunun klonları değil. Texas A & M Üniversitesi'nde kedi ve köpeklerin klonlanması üzerinde çalışan grup, yıllar süren uğraşları sonucunda geçtiğimiz aylarda bir kediyi klonladıklarını ilan ederken hâlâ köpeklerde bu başarıyı sağlayabilmiş değiller. Fakat teknolojinin son 6 yıl içerisinde aldığı yol düşünüldüğünde çok yakın bir gelecekte aynı başarılı klonlama çalışmalarını çeşitli hayvan türleri için duymak hayal olmaktan çıkacak!



izin veriyor olması. Yapılan araştırmalar, yetişkin hayvandan elde edilen hücrelerin kültür ortamında büyütülürken, istenilen genetik değişikliklere uğratabileceğini ve bu hücrelerin, çekirdeği çıkartılmış yumurta hücrelerine verilmesiyle transgenik klon embriyoların oluşabileceğini gösterdi. Bundan sonraki adımın, gen transferi ve klonlama tekniklerinin bu ortaklığıyla hastalıklara direnci sağlanmış, süt verimi veya kas dokusu artırılmış transgenik klon çiftlik hayvanları üretmek olması planlanıyor.

İlaç sanayiinde klonlama

Hemofili gibi birçok insan hastalığı proteinlerin üretimindeki yetersizlik sonucu oluşuyor. Bu hastalıkların tedavisi için, eksik olan bu proteinlerin hastalara verilmesi gerekiyor. Ancak bunların elde edilmesi güç ve pahalı. Bu nedenle bazı ilaç firmaları bu proteinleri transgenik hayvanların sütünden elde etme yoluna gitti. PPL ve Genzyme bu uygulamanın öncüsü olan iki firma. PPL bunun için koyunu, Genzyme ise keçiyi seçti. Ancak klasik gen transferi tekniğiyle transgenik çiftlik hayvanları elde etmek gücü ve bir o kadar da pahalıydı. İşte bu sırada PPL ilk klon koyunu, bu sorunu çözmek için üretti. Böylece üretilen bir transgenik hayvan, klonlarak çoğaltılabilecekti. Bu amaç güdülerek üretilen Dolly, bu teknolojinin bir anda bilim dünyasının gündemine yerleşmesine ve hızlı bir tırmanışa geçmesine öncü oldu. Şu anda transgenik hücreler kullanılarak, sütünde in-

san proteinleri salgılayan klon transgenik çiftlik hayvanlarının üretildiği firmaların sayısı hızla artmakta.

Organ naklinde klonlama

Bugün tüm dünyada organ nakli için sırada bekleyen onbinlerce insan var ve bunların büyük çoğunluğu uygun organ bulamadıkları için hayatını kaybetmekte. Biyolojik ve fizyolojik olarak insana yakınlığı ve organ büyüklüğünün uygunluğu dolayısıyla domuz, organ naklinde en iyi aday hayvan olarak görülüyor. Gerek doğmamış do-



muz yavrusunun, gerekse yetişkin domuzun hücrelerinin kullanılmasıyla klon domuzlar üreten araştırmacılar, klonlama teknolojisinin hücreler üzerinde istenen geni hedefleyerek değişiklik yapma olanağı sağlamasından yararlanarak, özel bir gen üzerinde yoğunlaştılar. Bu gen domuz hücrelerinin yüzeyinde a-1,3-galaktoz adı verilen bir şekerin birikmesine ve dolayısıyla

domuz hücre ve dokularının reddine neden olmaktadır. Ancak geçtiğimiz aylarda iki ayrı araştırma grubu, bu geni ortadan kaldırmış transgenik klon domuzlar üretmeyi başardılar. Bu transgenik domuzların organ ve hücrelerinin, insan vücudunda herhangi bir reaksiyona sebep olmayacağı iddia edilmesine karşın, bir grup araştırmacı, tek bir gen değişikliğinin sorunu tam çözemeyeceğini öne sürüyor.

Nesli tükenmekte olan hayvanların klonlanması



Evcil hayvanların ataları olan yabani türler gerek hayvanlarda gerekse bitkilerde büyük önem taşırlar. Genetik açıdan birbirine çok benzer olan evcil hayvanlar hastalıklara çok daha açıktırlar. Yabani türlerse genetik çeşitlilik açısından gen depoları olmalarından dolayı, evcil türlerin yaşamının sigortalarıdır. Bu nedenle klonlama teknolojisinin hedeflerinden biri de nesli tükenmekte

Türkiye’de Klonlama

Türkiye bu alandaki ilk somut adımını 2000 yılında attı. Klonlama teknolojisi öncelikli çalışma alanı olarak seçildi ve TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü, bir elemanını bu alanda eğitmek üzere 2 yıllığına ABD’ye yolladı. Bu iki yıl içerisinde Enstitü elemanının içinde bulunduğu grup, bu alanda birçok çalışma yaptı ve dünyadaki ilk ticari klonlama çalışmasını, bir ineğin sekiz klonunu yaparak gerçekleştirdi. Şimdi Enstitünün hedefi, bu teknolojiyi ülkemiz hayvancılığının hizmetine sunmak. Bu amaçla ilk klonlama çalışması bu yılın ikinci yarısından itibaren Enstitünün Transgen ve Deneysel Hayvanları Laboratuvarı’nda başlatılacak. Bu projeyi takiben laboratuvar ekibi, ülkemizde iyi kalitede, coğrafi koşullarımıza uyum sağlamış, hastalıklara direnç geliştirmiş kültür ve yerli ırk çiftlik hayvanlarını klonlayarak çoğaltmayı planlıyor.





olan hayvanları koruma altına almak amacıyla onları klonlamak oldu. İlk olarak 1998 yılında anavatanı Hindistan ve Çin olan yabancı bir sığır türünden (gaur) elde edilen hücre, çekirdeği çıkarılmış evcil sığır yumurtasına transfer edildi ve doğan gaur yavrusu 48 saat yaşadı. Araştırmacılar klon yavrunun, klonlamadaki bir sorundan değil, genelde yeni doğanlarda gelişen bir enfeksiyon sonucu öldüğünü söylediler. Başka bir grup, 2001 yılında bir yabancı koyununun, evcil koyunun yumurta hücrelerini kullanarak başarıyla klonladı. Şu an yalnızca hayatta olan veya yeni ölmüş hayvanların hücreleri alınarak klonları oluşturuluyor; ama yıllar veya yüzyıllar önce ölmüş bir hayvanın klonlama yöntemiyle tekrar günümüz dünyasına kazandırılması da, yakın bir gelecekte gerçekleştirilebilir.

İnsanların geleceğinde klonlama

Klonlama üzerinde çalışan birkaç bilim adamının düşlerini süsleyen insan klonlanmasına ne derece yakın ve hazır olduğumuz tartışılabilirken, bunun için erken olduğunu düşününlerin sayısı bir hayli fazla. Bu araştırmacılar hayvanlarda karşılaşılan sorunlara dikkat çekiyorlar. Hayvan klonlanmasında anormal plasenta ve kalp-akciğer gelişimi, bunun sonucu olarak da gebeliğin erken veya ilerleyen dönemlerindeki düşükler, yavrunun normalden aşırı büyük olması veya doğumdan kısa bir süre sonra meydana gelen ölümler, sıklıkla rastlanan sorunlar. Klonlama üzerinde çalışan birçok araştırmacı, bu sorunların farklılaşmış hücre DNA'sının tam olarak geriye programlanamamasından kaynaklandığı konusunda birle-

şiyor. Halâ embriyonik hücre DNA'sının mı, yoksa erişkin hücre DNA'sının mı daha iyi geriye programlanabilir olduğu konusu tartışılırken ve birbiriyile çelişen çeşitli araştırma raporları bilimsel dergilerde yayınlanırken hiç kimse bu anormal durumun insan klonlanmasında gelişmeyeceğini garanti edemiyor. Bu konuda geçtiğimiz aylarda erişkin hücreden ilk klon insan embriyosunu ürettiğini açıklayan Advanced Cell Technology firmasının raporunda, elde edilen embriyonun altı hücre aşamasına kadar geliştiği bildirildi. Oysa bu alanda çalışan saygın ve tanınmış bilim adamları döllemiş veya döllememiş yumurta hücrelerinin, aktive edildiğinde 4-6, hatta 8 hücreli aşamaya kadar oto kontrolde bölündüğünü ve bu nedenle elde edilen bu sonucun çok da bilimsel bir değer taşımadığı görüşündeler. Bu teknik sorunların yanı sıra, insan klonlama çalışmaları birtakım etik, sosyal ve yasal engellemelerle karşı karşıya ve birçok ülkede de yasak. Ancak bu teknoloji uygulanarak bir canlıyı yaratmak yerine, sadece klon embriyonun oluşturulması ve bu embriyodan kök hücrelerin elde edilmesi fikri çok daha fazla kabul görüyor. Hiç kuşkusuz kök hücre uygulamaları, günümüzde tedavisi mümkün olmayan birçok hastalığın çözümü olacak. Bugün kök hücreler göbek kordonu, kemik iliği gibi vücutun bazı bölgelerinden elde edilebilmesine karşın, bunların sınırlı sayıda dokuya dönüşebilmeleri uygulama alanlarını kısıtlamakta. Oysa embriyodan elde edilen kök hücreler, her türlü dokuya dönüşebilme özelliğine sahip. Ancak bilim adamları bu kök hücrelerin vücut tarafından reddedilebileceğini, bu nedenle kök hücrelerin, hasta insanın hücreleri kullanılarak oluşturulan klon embriyolardan geliştirilmesinin daha iyi sonuç vereceğini iddia etmekte.

Dr.Sezen Arat

TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü

DNA Klonlanması

Bir genin yapı ve işlevleri üzerine yapılan çalışmalarda yeterli miktarda DNA elde etmek için DNA'nın klonlanması gerekir.

Bir DNA parçasının birçok kopyasının yapılmasına klonlama adı verilir. Klonlama yapmak için öncelikle DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi ve klonlanacak DNA parçasının bu şekilde ortaya çıkarılması gerekir. Bu parça, daha sonra bir vektöre (taşıyıcı) bağlanarak vektörle beraber bakteriyeye aktarılır ve bu şekilde üretimi sağlanır.

1. DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilmesi: 1970'li yıllarda bakterilerde DNA'yı özgül baz dizisinden kesen enzimler, restriksiyon enzimleri izole edildi. İzole edildikleri bakteriyeye göre isimlendirilen bu enzimlerden, örneğin EcoRI, *E. Coli*'den elde edilmişti. Bu enzim, GAATTC dizilerini tanıyarak bunları diziden ayırır ve tek iplikli, yapışkan uçlu ve birbirlerini tamamlayıcı DNA parçaları oluşturur. İki DNA parçası, bu tamamlayıcılık özelliğine bağlı olarak, DNA ligaz enzimiyle birbirlerine bağlanırlar. Bu uygulamayla farklı iki DNA parçası aynı restriksiyon enzimiyle kesilerek birbiriyile birleştirilebilir.

2. Klonlama: Çoğaltılmak istenilen DNA parçasının bakteriyeye aktarılması, yani bir-

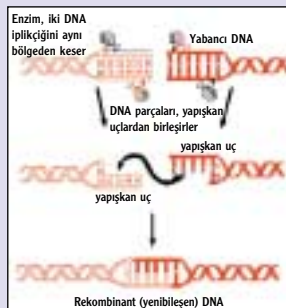
den fazla kopyasının oluşması sağlanır.

Vektör: Aracı bir vektör, örneğin plazmid ile klonlanmak istenen DNA parçası bakteriyeye aktarılır. Plazmid, bakterilerde bulunan, kendi başına replike olabilen (kendi kopyasını oluşturabilen) ve antibiyotige direnç genleri taşıyan halkasal DNA molekülüdür. 100-1000 kb (kb=kilobaz=1000 baz) büyüklüğündeki DNA parçaları, maya kromozomlarından yapılan yapay kromozomlar (YAC=yeast artificial chromosome), vektör olarak kullanılarak bakteriyeye aktarılabilir.

Aynı restriksiyon enzimiyle kesilen plazmid ve klonlanacak DNA parçası, ligaz enzimi aracılığıyla bir araya getirilerek "rekombinant DNA" oluşturulur. Rekombinant DNA'yı içeren bakterilerin, tanıması için seçici olarak üretilmeleri sağlanır. Seçicilik, plazmidin taşıdığı antibiyotik direncine göre, sadece istenilen plazmid DNA'lı bakterilerin üremesine uygun besiyeri hazırlanarak sağlanır. Bakterilerde her 20-30 dakikada bir gerçekleşen hücre bölünmesine bağlı olarak, klonlanmış DNA

parçası da çoğalmış olur. Bu şekilde kısa sürede çok miktarda klonlanmış DNA elde etmek mümkündür.

Prof. Dr. Ayşe Özer
Marmara Üniv. Tıp Fakültesi
<http://esg-www.mit.edu:8001/esg-bio/rdna/cloning.html>
<http://www.ultranet.com/~jkimball/BiologyPages/R/RestrictionEnzymes.html>
<http://crystal.uah.edu/~carter/engineer/bacteria.htm>
<http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch9A.htm>



Kaynaklar

- Arat, S., Rzcudlo SJ, Gibbons, J., Miyoshi, K., Stice, SL. (2001). Production of transgenic bovine embryos by transfer of transfected granulosa cells into enucleated oocytes. *Mol.Reprod.Dev.*: 20-26.
- Arat S., Gibbons, J., Rzcudlo SJ., Miyoshi K., Venable A., Waltenburg R., Stice, SL. (2001). Bovine cloning using adult donor cells treated with roscovitine. *Biol.Reprod.Suppl* 1:173.
- Gibbons, J., Arat S., Rzcudlo SJ., Miyoshi K., Waltenburg R., Respass D.S., Venable A.M., Stice, SL.(2002). Enhanced survivability of cloned calves derived from roscovitine-treated adult somatic cells. *Biol. Reprod.*66: 895-900.
- <http://www.rigeb.gov.tr/sib1/transgen/klonlama.htm>
<http://www.newscientist.com/hottopics/cloning/>
<http://genomics.pharma.org/cloning.html>

BİYOLOJİK SİLAHLAR VE BİYOTERÖRİZM

Biyolojik silahlar (BS) bakteri, virüs, protozoa, küf gibi mikroorganizmalar, bitkiler veya hayvanlar tarafından üretilen toksinleri içeren kitle imha silahları olarak tanımlanmaktadır.

Biyolojik silahlar yaklaşık 25.000 yıldan bu yana kullanılmaktadır. MÖ 6. yüzyılda Asurların düşman kuyularını çavdar mahmuzuyla, Atinalı Solon'un da kuşattığı Krissa kentinin su kaynaklarını kokarca lahanasıyla zehirledikleri biliniyor.

1346'da Tatar ordusunun, kuşattığı Kaffa (Kırım) kentini ele geçirmek için vebadan ölenlerin cesetlerini mancınıklarla surların üzerinden kent içine atarak, veba salgını başlatmaları başka bir biyolojik silah uygulaması olarak kabul edilmekte.

Biyolojik silahların sistematik üretimi 20. yüzyılda başladı. 1918'de Japonya'nın kurduğu özel ordu birimi (731. birim) BS konusunda uzmanlaştı ve 1931'de Mançurya'da ilk BS fabrikasını kurdu. ABD ve SSCB başta olmak üzere diğer ülkelerde geliştirilen BS üretim altyapısı, zamanla bu si-



lahların korkunç etkileri göz önüne alınarak bir dizi protokol ve anlaşmayla kontrol altına alınmaya çalışıldı. 1972 Biyolojik Silahlar Konvansiyonu, bu konuda çok sayıda ülkenin imzaladığı en önemli belgedir.

Biyolojik silahların konvansiyonel, nükleer, kimyasal silahlara oranla düşük olan maliyetleri, üretim kolaylığı, etkinliği ve uluslararası denetimden gizlenebilme avantajları 1980'lerden sonra giderek artan sayıda ülkenin biyolojik silah üretimine başlamalarına neden oldu. Uluslararası kaynaklar BS üreticisi ülke sayısının 20'yi aştığını bildirmekteler.

Ancak günümüzde BS üreticilerinin, sınırlı bölgesel çatışmalarda bile bu tür kitle imha silahlarının kullanılmasının yaratacağı tepkiyi göze alabilecekleri düşünülmekte. Bunun yerine üretilen silahların bir kısmının terör örgütlerine satıldığı, yine uluslararası kuruluşlarca bildirilmekte. Bunun dışında terör örgütlerinin kendi olanaklarıyla da BS ürettikleri görülüyor.

Moleküler biyoloji ve genetikte son yıllarda kaydedilen gelişmeler ve bu alandaki bilgilere özellikle Internet aracılığıyla her isteyen ulaşabileceği hale gelmesi, mikroorganizma ve virüs bankalarının alıcısı incelemelerden satış yapmaları, tehlikeyi daha da artırmakta.

Biyoterörizmin hedefi sadece toplum değil. Tarımsal ürünler, hayvanlar gibi ekonomik kaynaklar, doğal zenginlikler de biyoterörizmin hedefi olabilir.

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

Terör Örgütlerinin Biyolojik Silahlara İlgili Duymalarının Nedenleri

- * Küçük boyutlarda üretim oldukça kolaydır.
- * Maliyet çok azdır.
- * Küçük miktarlar, çok büyük etki yapabilirler.
- * Patlayıcı ve ateşli dedektörleri saptayamaz.
- * İz bırakmadan kolayca kullanılabilirler.
- * Hava akımıyla çok geniş alanlara yayılabilirler.
- * Pahalı temizleme süreçleri gerektirirler.
- * Toplum üzerindeki psikolojik etkisi ağır ve uzun sürelidir.
- * Güvenlik güçleri ve sağlık örgütleri henüz tam hazırlıklı değildir.
- * Çok değişik hedeflere karşı kullanılabilirler.

Önemli Biyoterörizm Olayları

- * 1978 Bulgar rejim muhalifi G.Markof'un ricin ile öldürülmesi.
- * 1984 Rajnaashee tarikatının Oregon'da salata barlarına tifo bulaştırmaları.
- * 1995 Aum Shinkyö tarikatının Tokyo metrosuna Sarin gazı saldırısı ve 1991-1993 başarısız biyoterörist saldırılarının ortaya çıkması.
- * 1997 Bir Musevi cemaat liderinin Washington'daki ofisine postayla şarbon bakterisi (anthrax) gönderilmesi.
- * 2001 11 Eylül sonrası ABD'de birçok kişinin postayla gelen şarbonndan etkilenmesi ve bir bölümünün ölmesi.

BİTKİLERE GEN



Bitkilerde gen aktarımı, bazı özel DNA dizilerinin, bitki hücrelerinin genetik yapılarına eklenmesi anlamına gelir. "Genetik transformasyon" da denilen bu süreç, yabancı DNA'nın bir vektör (taşıyıcı) aracılığıyla genom içine yerleşmesi, genin kodladığı proteinin üretilmesi (genin anlamı) ve kazanılan yeni özelliklerin yavru döllere aktarımı aşamalarından oluşur.

Gen aktarımıyla, bitkilerin çeşitli çevresel baskılara, bakteri, virüs ve mantar kökenli hastalıklara, herbisitler ve pestisitler gibi çeşitli kimyasal bileşiklere direnç özelliği kazanması sağlanabilir. Tahılların besin kalitesinin artırılması, bitkilerin ikincil metabolizma artıkları, antibiyotik ve aşı gibi ilaç endüstrisinde kullanılan maddeleri bol miktarda üretmeleri, gen aktarımının diğer hedefleri arasında. Gen aktarımında dolaylı ve dolaysız olarak tanımlanan iki yöntem uygulanıyor.

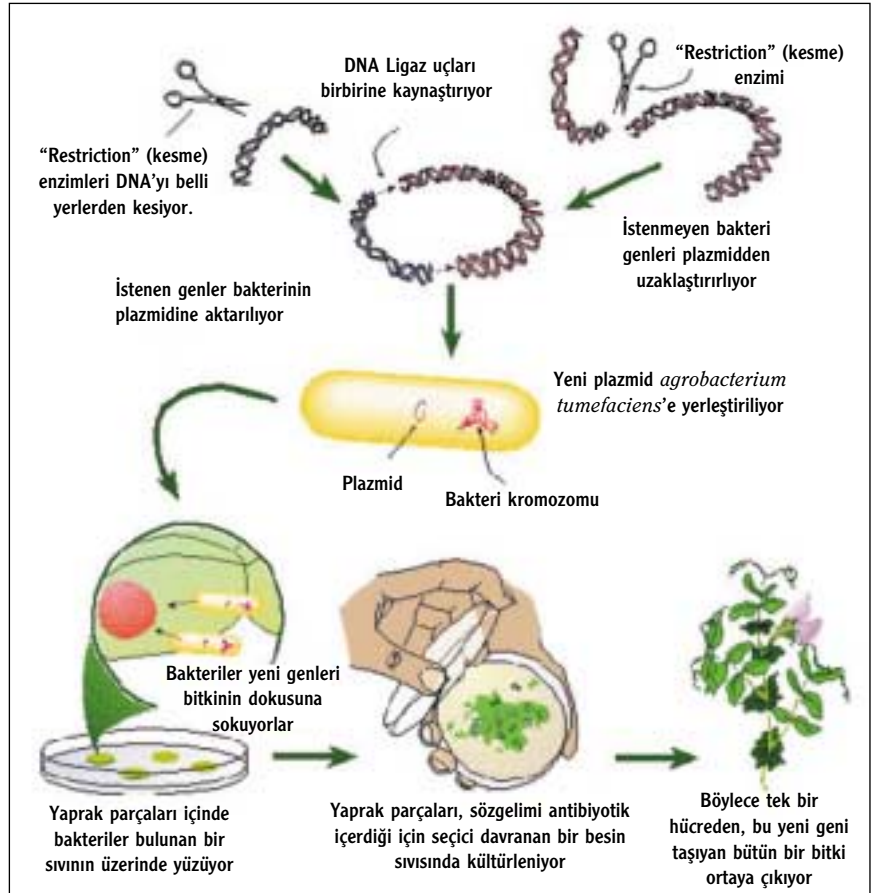
Dolaylı Gen Aktarımı

Dolaylı gen aktarımında en fazla kullanılan teknik, *Agrobacterium* bakterisi aracılığıyla yapılan gen aktarımı. Bu bakteri toprakta doğal olarak bulunan gram-negatif bir bakteri. *Agrobacterium tumefaciens*, yaralanmış bitki dokularından girerek "taç tümör" olarak adlandırılan tümör oluşumuna neden olurken, *Agrobacterium rhizogenes* ise bitkilerde "saçak kök"

oluşumuna neden olur. Birçok bitki grubu, *Agrobacterium* ile gelişen taç tümör ve saçak kök oluşumuna karşı oldukça duyarlıdır. Ancak transformasyon oranları bitki türüne, kullanılan *Agrobacterium* türüne ve yöntemine göre farklılık gösterir. *Agrobacterium* için konak hücreler çoğunlukla çift çenekli bitkiler olmakla birlikte, bazı açık tohumlu bitkiler ve tek çenekli bitkiler de olabilir. *Agrobacterium* ile transferde ilk adım, bakterinin yaralı bitki bölgesine tutunmasıdır. *Agrobacterium*'un bağlandığı bitki hücre almamacının (reseptör) yapısı tam olarak bilinmemekle birlikte, böyle bir almamacın, *Agrobacterium*'un konak tarafından tanınmasına yardımcı olduğu biliniyor. Bitki hücresi bu işlev sırasında daha pasif bir rol alırken, *Agrobacterium* daha

aktif bir rol oynar ve bazı genlerin (vir genleri) sürekli anlatımı yapılır.

Agrobacterium ile bitki transformasyonu, bakteri ve bitki yapısıyla ilgili olarak birçok optimizasyon denemelerinin yapılmasını gerektiriyor. Bu işlemler, bitki genomunu enfekte edecek olan uygun *Agrobacterium* suşunun seçilmesi, transfer edilen T-DNA'nın bitki hücrelerindeki varlığının gösterilmesi, transforme edilen bitki hücrelerinin seçiminin yapılması ve rejenerasyonunun sağlanmasını içeriyor. Yabancı genlerin bitkilere transferinde ilk çalışmalar, bitki hücrelerinin *Agrobacterium* ile birlikte kültürlenmesiyle (eş-kültür) yapılmış bulunuyor. Transformasyonda en büyük sorunsal, bitki örneklerinin *Agrobacterium* ile eş-kültürden sonra transgenik bitkilerin rejenerasyonu. Her bir bitki örneği *Agrobacterium* ile aşılansak transgenik bitkiler elde edilebilir.



GEN AKTARIMI

Dolaysız Gen Aktarım Teknikleri

Dolaysız gen aktarım teknikleri arasında en yaygın olarak kullanılanları, biyolistik (gen tabancası), elektroporasyon ve mikro-enjeksiyon'dur.

1. Biyolistik

Bu yöntemin temeli, bir ateşleme mekanizmasından yararlanılarak, yüksek derecede hızlandırılmış, mikrotaşıyıcı adı verilen 1-2 mm çapındaki altın ya da tungsten parçacıklar aracılığıyla, bir ateşleme mekanizmasından yararlanılarak DNA'nın hedef dokulara aktarılması. Yöntemin temel araştırmalarda ve genetik mühendisliğindeki kullanımı son yıllarda oldukça artmış ve birçok bitki türünün başarılı şekilde transformasyonu gerçekleştirilmiş durumda. Transform edilebilecek bitki dokuları arasında hücre süspansiyonları, olgunlaşmamış embriyolar, olgun embriyo kısımları, yaprak parçaları, mikrosporlar sayılabilir.

Biyolistik, oldukça küçük hücre tiplerinin transformasyonunda da etkili olduğundan, mikrobiyal türlerin transformasyonunda da başarıyla kullanılmakta.

2. Elektroporasyon

Elektroporasyonun temel prensibi, protoplastları veya diğer bitki dokularını elektrik akımı etkisinde bırakarak zarın kararlılığını kısa süreli bozmak ve hücre yüzeyinde oluşan yarıklardan DNA'nın hücre içine alınmasını sağlamak. 30 µm çapındaki bu yarıklar, akım verildikten birkaç dakika sonrasına kadar varlıklarını koruyorlar. Elektroporasyon, en az düzeyde müdahale gerektirdiğinden, bitki hücrelerinin canlılık oranını koruyan oldukça güvenilir bir yöntem. Embriyo dokularına da doğrudan elektroporasyon yapılarak çeşitli gen dizileri aktarabiliyor.



3. Mikro-enjeksiyon

Doğrudan gen aktarımı yöntemleri arasında, hücrenin istenilen bölümüne DNA'nın en kesin biçimde enjekte edilmesini sağlayan mikro-enjeksiyon, kılcal mikropipetler yardımıyla ve mikroskop altında gerçekleştiriliyor. Mikro-enjeksiyonla protoplastlara, izole edilmiş hücrelere, zigotik ve mikrospor türevli ön-embriyolar gibi çok hücreli dokulara DNA aktarımı mümkün. DNA, mikromanipülatör sistemine bağlı kılcal bir mikropipet aracılığıyla doğrudan hücrenin çekirdeğine aktarılıyor. Her enjeksiyonla sadece bir hücreye DNA aktarabilmesi ve deneyim gerektirmesi gibi güçlükleri olmakla birlikte, yöntemin avantajları şöyle sıralanabilir: aktarılan DNA'nın miktarı, istenen düzeye getirilebilir; istenilen hücreye DNA aktarılabilir; DNA'nın, istenilen hücre kısmına aktarımı görsel olarak kontrol edilebilir; mikrosporlar ya da birkaç hücreli proembriyolar gibi küçük boyutlu hedef dokular kullanılabilir; zigotik embriyo kültürü ve mikro-enjeksiyon yöntemleri birlikte kullanılarak her bitki türüne gen aktarımı yapabilmek mümkün olabilir.

Bitkilere dolaysız gen aktarımı, yukarıda anlattığımız yöntemler dışında, makroenjeksiyon, protoplastlara kim-

yasal yöntemlerle ve lipozomlarla gen aktarımı, elektroforez ve mikrolazer, polen transformasyonu, polen tüpü yoluyla DNA aktarımı, zigotik embriyoya DNA emdirilmesi, fiberler aracılığıyla DNA aktarımı, sonikasyon (ses dalgalarını uygulama) gibi yöntemlerle de yapabilir.

Bitkilere gen aktarımı daha verimli, kuraklık gibi çevre koşullarına daha dirençli, pestisitlere daha az bağımlı türlerin geliştirilmesi gibi avantajlar getirmekle beraber, bu genlerin istenmeyen yabancı bitkilere de yanlış tozlaşma yoluyla geçmesi gibi riskler de taşımaktadır. Bu nedenle genetik yapıları değiştirilmiş organizmalar geniş ölçekte ticari kullanımdan önce uzun süre laboratuvar ve çevreden soyutlanmış, kontrol altındaki alanlarda izleniyorlar. Bütün bu aşamaları başarıyla tamamlayan bitkilere üretim izni veriliyor.

Doç. Dr. Kasım Bajroviç
TÜBİTAK, GMBAE, Bitki Biyoteknolojisi

Kaynaklar

- Horsch, R.B., Fry, J.E., Hoffman, N.L., Eicholtz, D., Royers, S.G., Fraley, T.A. (1995) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1221231.
- Bajrović, K., Ari, Ş., Arcan, E., Kazan, K., Güzükırmızı, N. (1995) Transformation of potato (*Solanum tuberosum*, L.) using tuber discs and stem explants. *Biotechnology and Biotechnological Equipment* 9:29-32.
- Sule, A. (2001) Doğrudan gen aktarım teknikleri. In *Bitki Biyoteknolojisi, genetik mühendisliği ve uygulamaları*. Edited by S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu. Konya. <http://ceprap.ucdavis.edu/links.htm>
<http://www.cirad.fr/presentation/programmes/biotrop/resultats/biositecivad/tg.htm>

ENZİMLER: HARI

Enzimler biyolojik hızlandırıcılar (katalizör). Kendileri herhangi bir değişime uğramadan canlı sistemlerde oluşan kimyasal tepkimelerin hızını artırır. Biyokimyanın tarihsel gelişiminde enzimlerle ilgili araştırmalar önemli yer tutar. Biyolojik kataliz, ilk kez 1700'lü yılların sonunda mide salgılarıyla etin sindirilmesi çalışmalarıyla tanımlandı. 1800'lü yılların başlangıcında çeşitli bitki özleri ve tükürkle nişastanın şekerleştiği gösterildi. 1850'li yıllarda Louis Pasteur, maya hücreleri ile şekerin alkole mayalanmasının (fermentasyon), "fermentler" olarak tanımladığı maddelerce katalizlendiğini ileri sürdü. Pasteur, fermentleri canlı maya hücrelerinin ayrılmaz bir parçası olarak düşündü ve bu görüş "vitalizm" olarak uzun yıllar yürürlükte kaldı. 1897'de Eduard Buchner, maya hücreleri özütlerinin de şekeri alkole mayalayabildiğini gösterdi. Böylelikle, mayalanmayı sağlayan moleküllerin, hücre dışına çıkarıldıktan sonra da işlevsel oldukları anlaşıldı. Frederick W. Küche bu molekülleri Yunanca "enzymos" kökünden olan ve "maya içinde" anlamına gelen enzim olarak tanımlandı.

İnsanoğlunun enzimlerle tanışıklığı antik çağdan bu yana süregelmekte. Mikroorganizmaların enzim kaynağı olarak mayalamada kullanılmaları, antik çağdaki toplumlarda çok yaygındı.

İlk yazılı kaynaklardan biri MÖ 2100'lü yıllara kadar uzanan ve şarap yapımını açıklayan Hammurabi Yasalarıdır. Peynir yapmak üzere sütün pıhtılaştırılması için incir ağacı özütünün (fisin) ve çok mideli hayvanların dördüncü midesinin özütünün (rennin) peynir mayası olarak kullanılması, antik çağlardan beri uygulanan yöntemler. Fisin'in sütü pıhtılaştırma özelliği Homeros'un İlyada Destanı'nda aşağıdaki satırlarla ifade ediliyor (Çev. A. Erhat & A. Kadir, V. 899-906, sayfa 171, Can Yayınları, 10. Basım, 1998):

Ak sütle incir özütü karıştırılırsa hani, çarçabuk koyulaşverir sulu süt, mayalanverir göz önünde.

Enzimolojinin hızlı gelişimiye 20. yüzyılda gerçekleşti. 1903'te Victor Henri ve 1913'te Michaelis ve Menten'in, enzimatik hidrolizin kinetik modellerini geliştirmelerinden sonra, enzimlerin özelliklerinin belirlenmesine ilişkin çalışmalarda patlamalar gözlemlendi. Bugüne kadar çeşitli canlı sistemlerden yüzlerce farklı enzim saflaştırıldı, bunların birçoğunun aminoasit dizileri belirlendi, genleri klonlandı, kristalleri elde edilerek üç boyutlu yapıları aydınlatıldı. Bazı enzimlerin en-

düstriyel süreçlerde kullanılmaları gerçekleşti ve enzim teknolojisi denen bir alan doğdu.

Bütün enzimler protein molekülüdür. Bununla birlikte bazıları katalitik etkinlik göstermek için yapısında protein olmayan bir bileşene de gereksinim duyarlar, ki bu bileşen "kofaktör" olarak adlandırılır. Böyle bir enzimde inaktif protein bileşeni "apoenzim", kofaktörle birlikte aktif enzim ise "holoenzim" olarak tanımlanır. Kofaktör, bir organik molekül (koenzim) ya da bir metal iyonu olabilir. Enzim molekülünde protein ve kofaktör bileşenlerinin her ikisi de katalizde işlevseldir.

Enzimlerin katalizledikleri tepkimelerde tepkimeye giren bileşenler "substrat" olarak adlandırılır. Enzimler, katalizör olarak kimyasal tepkimelerin dengeye ulaşmasını çabuklaştırır. Örneğin canlı bir sistemde, bir asit ve alkolden ester oluşum tepkimesinde dengeye ulaşma, ortamda enzim yokluğunda son derece yavaş olur. Asit ve alkol molekülleri (substratlar), ester oluşum tepkimesini verebilmek için, öncelikle kararlılığı düşük olan geçiş hali ürünü (enzim-substrat kompleksi) oluşturur. Ester oluşumu için bu ara ürünün, geçiş haline karşılık gelen bir enerji tepesini aşması gerekir. Eğer ara ürün enerji tepesini ya da engelini aşacak yeterli enerjiye sahipse tepkime gerçekleşir. Bu enerji enzimatik tepkimenin "aktivasyon enerjisi" olarak tanımlanır. Aktivasyon (harekete geçme) enerjisi ne kadar küçükse tepkime o kadar kolay ve hızlı olur. İşte enzimler, kolaylaştırdıkları tepkimenin hızını onun aktivasyon enerjisini düşürerek artırır.

Enzimlerin üç boyutlu katlanmış protein moleküllerinden oluşan yapı-

Enzimlerin IUBMB Tarafından Yapılan Uluslararası Sınıflaması

No	Sınıf	Katalizlediği Tepkime Tipi
1	Oksidoredüktazlar	Elektron transfer tepkimeleri
2	Transferazlar	Grup transfer tepkimeleri
3	Hidrolazlar	Hidroliz tepkimeleri
4	Liyazlar	Çifte bağlara grup katılımı ya da çifte bağ oluşturan tepkimeler
5	İzomerazlar	Molekül içinde grup transferiyle izomerleri oluşturan tepkimeler
6	Lipazlar	ATP yıkımıyla birlikte C-O, C-S, C-N, C-C bağları yapan tepkimeler

KAMOLEKÜLLER

sında, ancak özgün substrat moleküllerinin bağlanabildiği, katalizden sorumlu bir bölge vardır. Bu bölgeye enzimin aktif bölgesi denir. Bu nedenle enzimler özgünlüğü oldukça fazla olan katalizörlerdir. Her enzim, gösterdiği aktiviteyle değerlendirilir. Enzim aktivitesi; tanımlanmış koşullarda, birim zamanda gerçekleşen kataliz ya da katalitik tepkimenin hızı olarak tanımlanır.

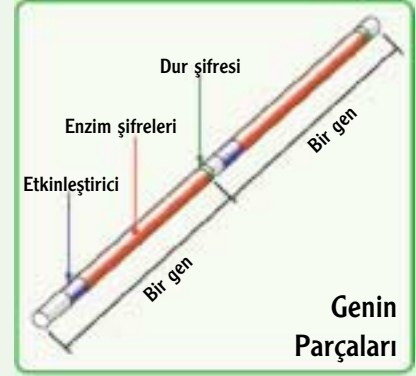
Bu sınıflama göz önünde tutularak endüstride ve organik kimyada enzimlerin kullanıldığı çok önemli uygulama alanları oluşmuş durumda.

1995'te dünyada yaklaşık 1 milyar dolarlık enzim satışı oldu. 2005 yılında dünya enzim pazarının 1,7-2 milyar dolarlık bir boyuta ulaşacağı tahmin ediliyor. Diğer endüstri sektörleri grubunu alkol, hayvan yemi, fırıncılık, kimyasal biyodönüşümler, tanı kitleri, hayvansal ve bitkisel yağlar, gıda tatlandırıcıları, meyve suyu ve şarapçılık, deri, protein kağıtçılık, ilaç ve atık gi-derme sektörleri oluşturuyor.

Enzimler mikrobiyal, bitkisel ve hayvansal kökenli olabilirler. Endüstriyel öneme sahip bitkisel enzimlere, papain ve fisin gibi protein hidrolizleyiciler örnek verilebilir. Pankreatik lipazlar, pepsinler ve peynir mayası olarak da adlandırılan rennin, hayvansal kökenli enzimlere örnek. Mikrobiyal

enzimler endüstriyel enzim pazarının %90'ını kapsar. Bunlar bakteriyel ve fungus (küf, mantar ve mayalardan oluşan mikroorganizmalar) kökenlidir. Kontrollü ortamda kolaylıkla ve hızlı olarak üretilibilmeleri, çok zengin enzim çeşitliliğine sahip olmaları, mikroorganizmaların enzim üretiminde en çok kullanılan kaynak olmalarına neden olur. Doğadan taranmış enzim üreticisi mikroorganizmalara, son zamanlarda genetik mühendisliği teknikleriyle geliştirilmiş olan rekombinant (yenibileşenli) mikroorganizmalar da katılmış durumda.

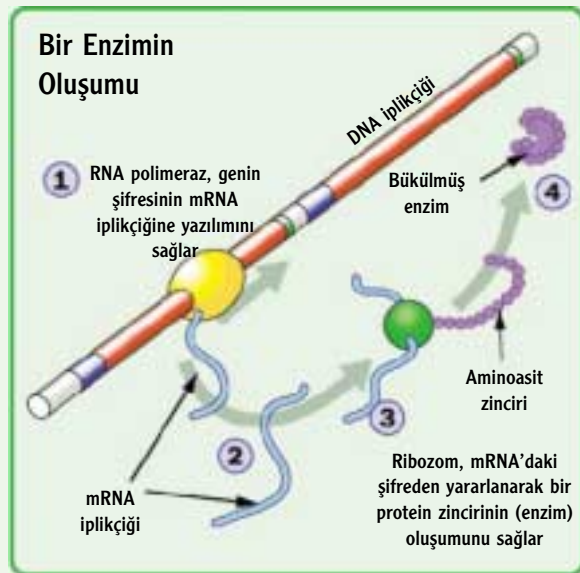
Bazı mikrobiyal enzimler, hücreler tarafından sentezlendikten sonra hücre dışına salgılanırlar, bazılarıysa hücre içinde kalırlar. Endüstriyel enzimlerin çoğu, hücre dışına salgılanan enzimler. Hücre içi enzimlerden yararlanmak için hücrelerin parçalanarak enzim moleküllerinin hücrelerden özütlenmesi gerekir. Özellikle deterjan, tekstil, deri ve kağıt sektörlerinde kullanılan enzimlerde, enzimin ileri derecede saflaştırılması gerekmez; ancak gıda ve ilaç endüstrisinde, tıpta ve tanı kitlerinde kullanılan enzimlerin çok ileri derecede saflaştırılması zorunlu. Saflaştırma, enzim maliyetini artıran en önemli unsur. İleri derecede saflaştırılmış enzimlerin endüstriyel uygulamalarında, işlem maliyetini



düşürmek için enzimlerin yinelenen kullanım formuna getirilmesi temel alınıyor. Bu amaçla enzimler, hızlandırdıkları tepkime ortamından kolaylıkla ayrılabilmesi için, taşıyıcı olarak adlandırılan organik ya da inorganik parçacıklara kimyasal olarak bağlanarak ya da ağ yapıdaki polimer moleküller içinde tutuklanarak hareketsiz kalırlar. Bazı endüstriyel ürünler hareketsiz (immobilize) enzimler kullanılmasıyla son derece ekonomik olarak üretilbilir hale gelmiş durumdalar.

Son yıllarda enzimlere olan en büyük gereksinim, biyokimyasal transformasyonların yoğun olarak kullanıldığı kimya ve ilaç sektöründe yaşanıyor. Biyokimyasal transformasyonlara yönelik uygulamalar, literatürde çok geniş yer tutuyor. Yarı sentetik penisilinlerin ve sefalosporinlerin üretiminde, öncül moleküller olarak 6-amino-penisillanik asit (6-APA) ve 7-asetamidodeasetoksisefalosporanik asit (7-ADCA) gerekiyor. Bu moleküller, penisilin G ya da V ve sefalosporin G ya da V'nin hareketsiz formda penisilin asilaz enzimiyle hidrolizi yoluyla elde ediliyor. Bu öncüllerin üretiminde, enzimatik hidroliz süreci tek adımlı tepkimeyle ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden ve çevre kirliliğine yol açmadığından, sert koşullarda gerçekleşen ve birkaç adımdan oluşan kimyasal üretim sürecinin terkedilmesine neden olmuş durumda.

Kimyasal olarak sentezlenen açıl-DL-amino asit karışımlarından L-ami-



1- RNA polimeraz enzimi (sarı) DNA zincirine "etkinleştirici" bölgesinden bağlanır. Daha sonra DNA boyunca ilerleyerek haberci RNA (mRNA) üzerinde DNA'nın kopyasını oluşturur.

2- Serbest durumdaki mRNA, bir ribozom bulur.

3- Ribozom (yeşil) mRNA'ya bağlanır ve üzerinde ilerleyerek, genin temsil ettiği enzim için gerekli aminoasit zincirini oluşturur.

4- Aminoasit zinciri, enzime özgü şekli alarak işlev görmeye başlar.



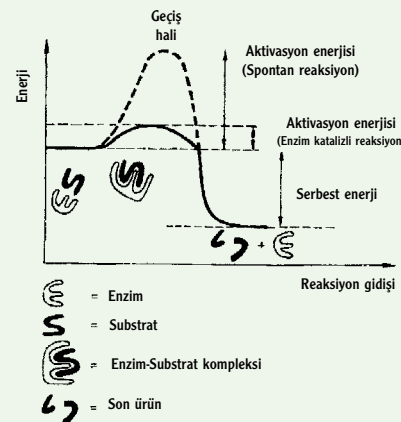
noasitlerin ayrılmasında, hareketsiz formdaki aminoasilaz enzimi kullanılıyor. Optikçe aktif aminoasitlerin çeşitli dekarboksilaz, dehidrojenaz, sentaz, hidrolaz gibi hareketsiz formda enzimlerin kataliziyle üretimi, özellikle Japonya'da yoğun olarak gerçekleştiriliyor. Bu ülkede nükleosid içeren virüslere karşı etkin bileşiklerin, ribo ve deoksiribonükleosidlerin öncül moleküllerinden nükleosid fosforilaz enzimleri kullanılarak üretimi de gerçekleştiriliyor.

Farmasötik endüstrisinde kiral ("solak ya da sağlak" yani, moleküllerin farklı ayna görüntülerinden yalnızca belli birini temel alan) ilaçların üretimine olan ilgi gittikçe artıyor. Günümüzde üretilen ilaçların bir kısmı, rasemat denilen kiral karışımlar halinde üretilerek satılmakta. Bu karışımdaki kiral formlardan yalnız biri tedavi için etkin olduğunda, etkin formun diğerinden ayrılması gerekiyor. Klasik kimyasal ayırma yöntemleri bu ayırma işleminde çoğu zaman yetersiz kaldığından, enzimlerin kullanıldığı ayırma işlemlerinden yararlanılıyor. Bu amaçla lipaz enzimlerinin kullanıldığı kiral alkollerin ve sülfidril esterlerinin ayrımını sağlayan süreçler, proteazların kullanıldığı karboksilli asitlerin ayrımını sağlayan süreçler geliştirilmiş bu-

lunuyor. Tedavi değeri olan bazı peptidlerin sentezinde de peptidaz ve lipaz enzimleri kullanılmakta.

Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmeler, enzim teknolojisinde yeni bir çığır açtı. Yüksek ökaryotik canlılardaki bazı enzim genlerinin prokaryotlarda ya da maya hücreleri gibi tek hücreli ökaryotlarda anlatımının başarılmasıyla, hayvansal ve bitkisel kökenli enzimlerin, klonlandıkları mikrobiyal hücrede daha verimli bir şekilde üretilmesinin yolu açıldı. Biyoteknolojik uygulaması olan genleri klonlanmış az sayıda enzim, polisakarazlar ve proteazlar olarak iki ana grupta toplanır.

Enzim teknolojisinin gelişimi, farklı kimyasal tepkimeleri katalizeyebilen



yüksek performanslı ve çeşitli ekstrem koşullara karşı yüksek kararlılığa sahip yeni enzim moleküllerinin bulunmasıyla mümkün. Bu özellikleri taşıyan enzimleri üreten mikro-organizmalar doğada çok değişik ekosistemlerde keşfedilmeyi bekliyor. Gelişmiş ülkelerde endüstriyel enzimleri üreten mikroorganizmaların doğadan tarandığı, tanımlandığı ve enzim endüstrisinin kullanımına sunulduğu ulusal Mikroorganizma Kaynak Merkezleri bulunur. Enzim üretiminde önde gelen ülkeler Hollanda, Danimarka, Almanya, Fransa, ABD, Japonya, Kanada, Avustralya ve İngiltere. Bazı Uzak Doğu ve Doğu Avrupa ülkelerinde de endüstriyel enzim üretimi yapılmakta. Türkiye'de gıda, tekstil, deterjan, deri ve ilaç sektörlerinde, enzim kullanımı her yıl gittikçe artmakta ve gereksinim büyük ölçüde ithalatla karşılanmakta olup yıllık ithalatın 50 milyon dolar civarında olduğu tahmin ediliyor. Bu kadar büyük tüketime karşın ülkemizde endüstriyel enzim üreten yalnızca bir kuruluş bulunuyor.

TÜBİTAK, Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde ilaç endüstrisinde kullanılan penisilin asilaz'ın hareketsiz formda üretildiği laboratuvar ölçekli bir teknoloji geliştirilmiş, enzimin kararlılığı artırılmış, geni klonlanmış ve anlatımı sağlanmış olup bu çalışmaların sonuçları uluslararası saygın dergilerde yayınlanmış bulunuyor. Yerel ekosistemlerden ısıya dirençli a-amilaz ve alkalen proteaz üreticisi bakteri soylarının taranması, bunlarla enzim üretimi, tanımlanması ve genlerinin klonlanmasına, bulunan ve geliştirilen özgün soyların patentlenmesine yönelik araştırmalar yapılıyor. Bu çalışmalarla ülkemizde endüstriyel enzim üreticisi bakterilerin tanımlandığı, korunduğu, akademik ve endüstriyel kuruluşların kullanımına sunulduğu ulusal nitelikte bir mikroorganizma kaynak merkezinin nüvesinin de oluşturulması hedefleniyor. Ayrıca kağıt endüstrisinde enzim uygulamalarına yönelik EUREKA destekli bir araştırma projesi de başlatılmış bulunuyor.

Prof. Dr. Altan Erarslan
Kocaeli Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi,
Kimya Bölümü, Biyokimya Ana Bilim Dalı
TÜBİTAK, Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE
e-mail: erarslan@kou.edu.tr & erarslan@rigeb.gov.tr

GELECEK

21. yüzyılda teknoloji de bir yol ayrımına gelmiş durumda. Gelişen yeni teknolojiler sadece yaşam biçimimizi değil, kendimize ve dünyaya bakışımızı da önemli oranda değiştirecek potansiyel içeriyorlar. Bunlardan biri de gen teknolojisi ve bundan destek alan biyoteknoloji.

Global ısınmaya bağlı iklim değişiklikleri dünya nüfusunun yüksek bir ivmeyle artması, doğal kaynakların hızla tüketilmesi ve çevre kirliliğinin bazı bölgelerde bugünden tehlikeli boyutlara ulaşması, toplumların biyoteknolojiden beklentilerini de giderek artırıyor.

Bu teknolojinin kısa ve orta erimde sağlaması beklenen gelişmelerin, yaşamın hemen her alanını artan şekilde etkilemesi bekleniyor.

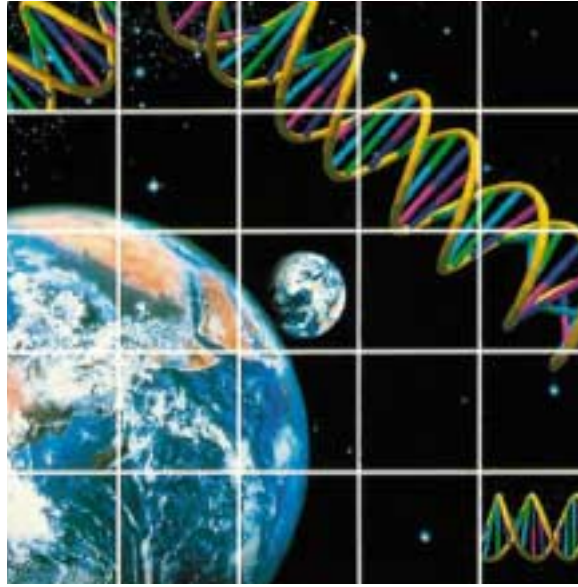
-Giderek artan açlık ve iklim değişikliği sorunları, tarımsal biyoteknolojiyi, önemi giderek artan bir konuma getirmiş durumda. Besince yetersiz çevre ve iklim koşullarına, bitki zararlılarına karşı dirençleri artırılmış, daha uzun süre bozulmadan korunabilen transgenik bitkilerin sayısı sürekli artmakta. Gelecekte bu ürünlerin sayısının daha da artması ve bugün uygulandığı şekliyle bir veya az sayıda gen aktarmak yerine, çoklu gen aktarımıyla birçok özelliği içeren "multitransgenik" bitkilerin geliştirilmesi beklenmekte. Aynı yaklaşımın tüm besi hayvanlarına uygulanması da tarımsal biyoteknolojinin bir başka hedefi.

- Bir türden diğerine gen aktarım yöntemlerinin gelişmesiyle istenen özelliklere sahip ilaçların bakteri, bitki ve hayvanlarca üretilmesinin sağlanması, oldukça kısa geçmişi olan bir biyoteknolojik uygulama. Gelecekte bu tür ilaçların sayısının hızla artması ve bireyin genetik özelliklerine göre değişik ilaçlara ulaşabilmesi hedeflenmekte.

- İlk örnekleri görülmeye başlanan biyoalgılayıcılar ve biyoçipler, gıda

maddelerinin daha kaliteli olarak tüketiciye ulaştırılmasını sağlayacaklar. Gen aktarımı yoluyla farklı tüketici grupları için allerji yapmayan, özel vitaminler ve aşılardan içeren gıda maddelerinin geliştirilmesi beklenmekte.

- İnsan Genomu Projesine paralel olarak yürütülen diğer projeler kapsamında, tüm canlıların metabolik süreçlerinin genetik ve biyokimyasal temellerinin anlaşılması, yeni endüstriyel açımları getirecek. Örneğin lipit biosentezinin her yönüyle anlaşılması, sadece bitkilerden daha fazla yağ elde



edilmesi amacıyla değil, endüstride kullanılabilecek yeni yağların elde edilmesine de katkı sağlayacak. Madencilikten, kozmetik sanayiine kadar her üretim alanında biyoteknolojinin etkisinin daha da artması, doğal karşılımları.

- Geliştirilen yeni mikroorganizma ve bitkilerle çevre kirliliğinin önlenmesi, biyoteknolojinin yüzyılımızdaki önemli hedeflerinden biri. Polimer atıkların yok edilmesi için, gen aktarılmış mikroorganizmaların, toprak ve havadaki ağır metallerin temizlenmesi için de benzer araçların geliştirilmesi öncelikle ele alınan projeler.

- İnsan Genom Projesinin sonuçları

doğrultusunda hastalıkların tanı ve tedavisinin kolay ve etkin hale gelmesinin (bkz. Bilim ve Teknik, Nisan 2002) toplum sağlığına önemli katkılar sağlayacağı bugünden görülmekte. Belirtilen ve beklenen gelişmeler bazı sorular da beraberlerinde getiriyorlar.

- Milyonlarca yıldan bu yana kendi doğal devinimi içinde oluşmuş ekolojik denge, genetik değişikliğe uğratılmış organizmaların doğaya yayılmasıyla bozulacak mı?

- Genetik yapıları değiştirilmiş gıda maddeleri, tüketiciler için tümüyle güvenli olacaklar mı?

- Genetik yapıları değiştirilmiş organizmaların patentlenmesi nasıl sorunlar getirecek? Bir yaşamın patentlenmesi etik açıdan doğru mu?

- Kişilerin ve toplumların genetik özelliklerine göre ayrımcılığa tabi tutulması önlenebilecek mi?

- Üretim amaçlı klonlama teknikleri insana uygulandığında ortaya çıkacak sosyal, yasal ve etik sorunlar çözümlenecek mi?

-Hızla gelişen gen teknolojisi ve biyoteknoloji, bu teknolojiye sahip gelişmiş ülkelerle gelişmekte olan ülkeler arasındaki ekonomik ve sosyal uçurumları daha da derinleştirecek mi?

- Bu teknolojinin silah üretimi için kullanılması nasıl önlenecek?

Ortaya çıkabilecek bu tür sorunları çözmek amacıyla UNESCO başta olmak üzere bir çok uluslararası kuruluş, bugünden yoğun çalışmalar yürütülmektedir. Bu çalışmalar doğrultusunda birçok ülkede yasal düzenlemeler yapılmakta ve bu teknolojinin sadece toplumun yararına, barışçıl amaçlarla ve işbirliğiyle kullanılması için çalışılmaktadır.

Prof. Dr. Beyazıt Çırakoğlu
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi,
TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi, GMBAE

Kaynaklar
www.arts.unimelb.edu.au/amu/ucr.htm
www.unclenicks.net/drugs/Current_Concerns