

# Biyoteknoloji ve Sentetik Biyoloji

Prof. Dr. Bektaş TEPE

Mikrobiyoloji

Bölüm 12

# Minimal Bir Hücrenin Tasarlanması: Yaşamın Genetik Temeli

- Bir hücrenin genomu, hücrenin yaşamını sürdürebilmesi için gerekli tüm bilgileri içeren temel bir plan görevi görür.
- Mikrobiyologlar, özgürce yaşayabilen bir hücreyi sürdürebilmek için gerekli en az sayıda genin ne olduğunu anlamaya çalışmıştır.
- Bu soruya yönelik çalışmalar özellikle genomları doğal olarak küçük olan *Mycoplasma* türlerinin 1990'larda dizilenmesiyle başlamıştır.
- Ancak bu araştırmanın bilimsel merakı giderecek sonuca ulaşması 20 yılı aşkın bir süre almıştır.



# *Mycoplasma* Türleri ve Minimal Hücre İçin Uygun Zemin

- *Mycoplasma* türleri parazitik yaşadıkları için küçülmüş genomlara sahiptir ve bu nedenle minimal bir hücre tasarımı için uygun bir başlangıç noktası sunar.
- JCVI ekibi, çalışmalara doğal genomları manipüle ederek değil, daha kontrollü ilerleyebilmek için farklı bir yaklaşım ile başlamıştır.
- Araştırmacılar, yaşamın genetik gereksinimlerini çözmek amacıyla öncelikle sentetik, kendini kopyalayabilen bir *Mycoplasma* hücresi üretmiştir.
- Bu ilk sentetik hücrenin genomu, bilinen dizisi temel alınarak laboratuvarında tamamen sentezlenmiş bir genomdur.



# Sentetik Hücrenin Ortaya Çıkışı ve Teknolojik Atılım

- Üretilen bu ilk sentetik hücre, minimal ya da tasarım genomu taşıyor olsa da tamamen laboratuvar ortamında oluşturulmuş kendi genomuna sahip bir yaşam formuydu.
- Bu atılım, sentetik biyoloji alanında tasarım genomlarının üretilebilmesini mümkün kılan temel teknolojiyi sağlamıştır.
- Araştırmacılar bundan sonra yaşamı sürdürebileceğini düşündükleri çeşitli minimal genomları tasarlayıp sentezlemiştir.
- Ancak bu tasarlanan genomların hiçbiri başlangıçta yaşayabilen bir hücre oluşturmayı başaramamıştır.

# Modüler Genomlar ve JCVI-syn3.0'ın Doğuşu

- Ekip, daha sonra *Mycoplasma* genomunu temsil eden DNA modülleri oluşturarak bunları farklı kombinasyonlarla birleştirmiştir.
- Bu modüllerden oluşturulan genomların hücrelere aktarımı ile elde edilen canlı hücreler üzerinden transpozon mutagenezi yapılarak gereksiz genler belirlenmiştir.
- En küçük genomdan çıkarılan bu gereksiz genlerin ardından JCVI-syn3.0 adı verilen sentetik minimal hücre üretilmiştir.
- JCVI-syn3.0, 531 kilobazlık ve 473 gen içeren genomuyla bilinen tüm özgür yaşayan hücrelerden daha küçük bir genom taşımaktadır.

# Minimal Hücrenin Sırrı: Bilinmeyen Genlerin Varlığı

- Sentetik biyolojideki bu ilerlemeler, özgün işlevlere sahip tasarım hücrelerin üretilebileceğini göstermektedir.
- Ancak JCVI-syn3.0'ın genomundaki genlerin yaklaşık üçte birinin işlevinin hâlâ bilinmiyor olması şaşırtıcı bir bilimsel gizem yaratmaktadır.
- Bu durum, hücresel yaşamın genetik temelleri hakkında öğrenmemiz gereken pek çok şeyin olduğunu işaret eder.
- Minimal hücre çalışmaları, yaşamın sürdürülebilmesi için gereken asgarî gen seti konusundaki anlayışımızı derinleştirmeye devam etmektedir.

# Endüstriyel Mikrobiyoloji ile Biyoteknolojinin Ayrımı

- Endüstriyel mikrobiyoloji, doğal olarak yüksek verimde ürün üreten mikroorganizmaların büyük ölçekli üretimde kullanılmasını esas alır.
- Bu amaçla genellikle yabancı tipten seçilmiş doğal olarak aşırı ürün üreten suşlar kullanılır ve bu mikroorganizmalar genetik olarak değiştirilmez.
- Biyoteknoloji ise, mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilerek doğal olarak üretmedikleri yüksek değerli ürünleri üretmesini sağlar.
- Bu bölümde genlerin klonlanması, değiştirilmesi ve farklı konaklarda verimli şekilde ifade edilmesini sağlayan temel genetik mühendisliği teknikleri tanıtılmaktadır.

# Genetik Mühendisliğinin Temel İlkeleri

- Genetik mühendisliği, canlı organizmaların sınırlamalarını aşmak için DNA'nın *in vitro* ortamda manipüle edilmesine dayanır.
- Değiştirilmiş genler, aynı organizmaya ya da farklı bir konağa geri aktarılabilir.
- Bir organizmanın geninin farklı bir konak içinde ifade ettirilmesine heterolog ekspresyon denir.
- Bu süreçlerin tümü için hedef DNA'nın izole edilmesi, saflaştırılması ve işlenmesi gerekir.

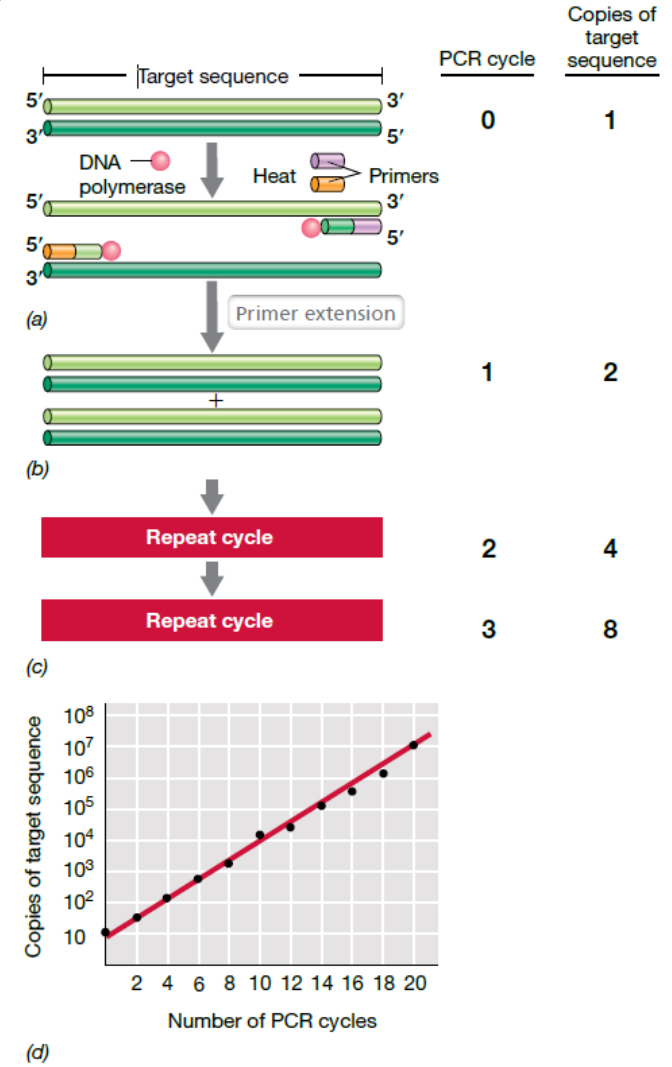


# Genetik Mühendisliğinde Kullanılan Araçlara Genel Bakış

- Genetik mühendisliğinin araçları arasında DNA'nın çoğaltılması, nükleik asitlerin elektroforez ile ayrılması ve hibridizasyon yer alır.
- Ayrıca genlerin klonlanması, yabancı genlerin bakterilerde ifade edilmesi ve hedefli mutagenез yöntemleri de bu araçlar arasındadır.
- Bu teknikler, karmaşık genetik sistemlerin amaç doğrultusunda düzenlenmesine olanak tanır.

# DNA'nın Manipülasyonu: PCR'in Temel Rolü

- Genetik mühendisliğin ilk adımı, spesifik genlerin saf ve çoğaltılabilir bir hâlde elde edilmesidir.
- Bu amaçla kullanılan en önemli yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'dur.
- PCR, hedef DNA bölgesini *in vitro* çoğaltarak milyar katına kadar artıran bir DNA replikasyonu sürecidir.
- Her döngüde DNA miktarı ikiye katlanır ve bu nedenle hedef DNA'nın miktarında eksponansiyel (üssel) bir artış gerçekleşir.

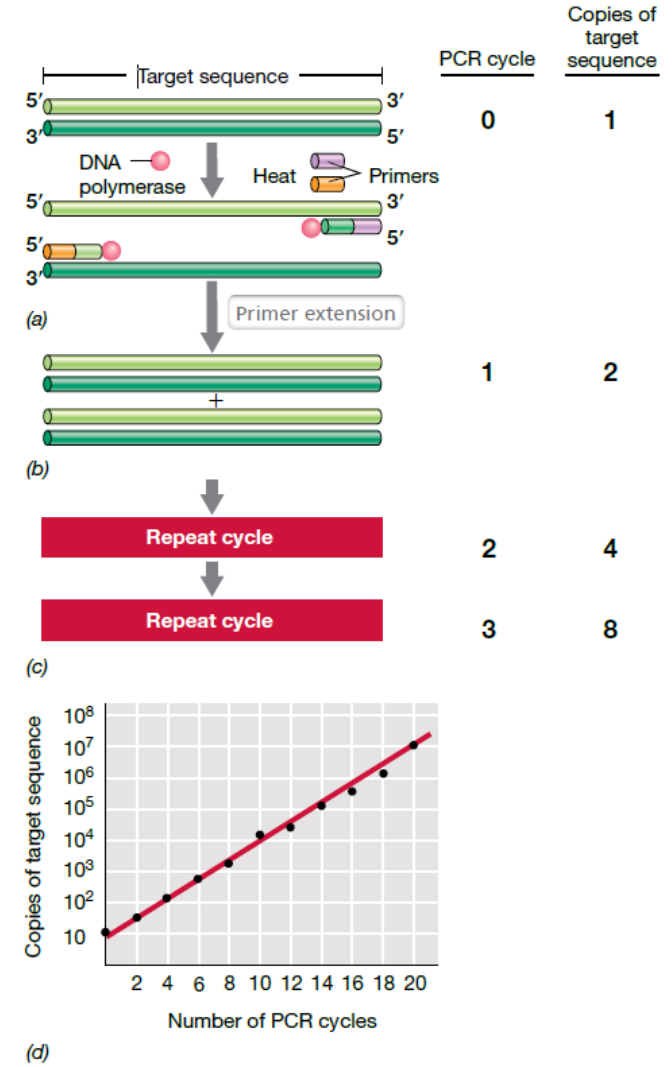


# PCR'ın Uygulamaları ve Varyasyonları

- Otomatik çalışan termal döngü cihazları sayesinde çok az miktarda hedef DNA'dan büyük miktarda çoğaltılmış DNA elde edilebilir.
- Hedef DNA'nın başlangıç miktarının ölçülmesi gerektiğinde kantitatif PCR (qPCR) yöntemi kullanılmaktadır.
- PCR'ın bir diğer varyasyonu, RNA'nın önce DNA'ya dönüştürülmesinin ardından bu DNA'nın çoğaltılmasını sağlayan tekniktir.

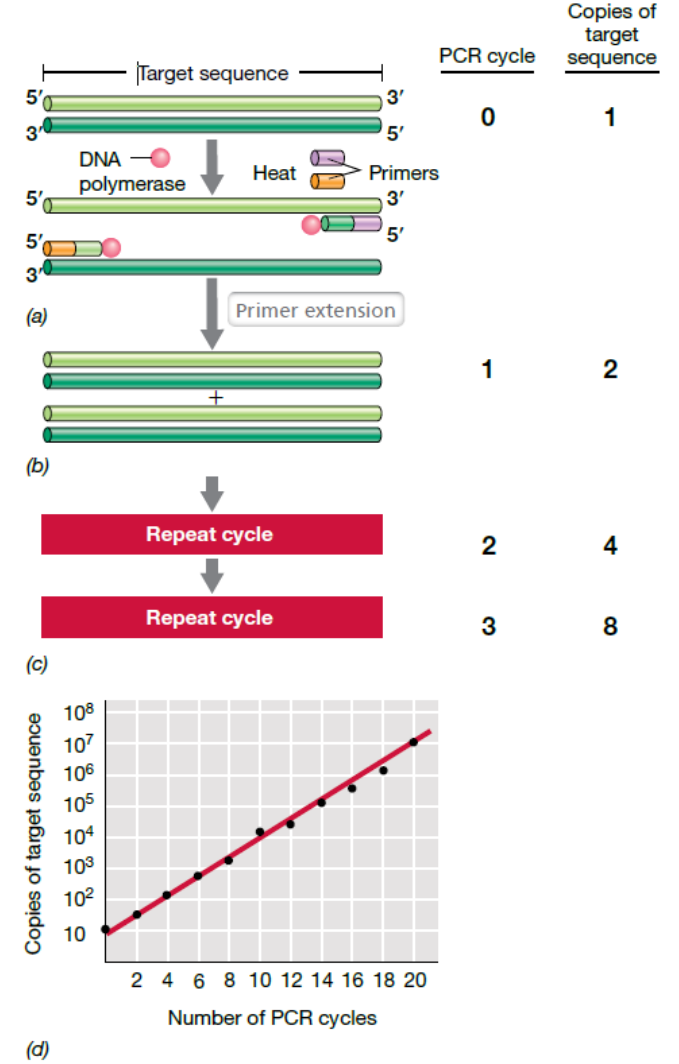
# PCR'ın Temel Bileşenleri

- PCR, doğal DNA kopyalama enzimleri olan DNA polimerazlar ile yapay olarak sentezlenmiş DNA oligonükleotid primerlerine ihtiyaç duyar.
- PCR, tam DNA moleküllerini değil, daha büyük bir DNA molekülü içinde yer alan birkaç bin baz çifti uzunluğundaki hedef bölgeleri çoğaltır.
- Bu işlemde hedef bölgeyi sınırlayan iki primer kullanılır.



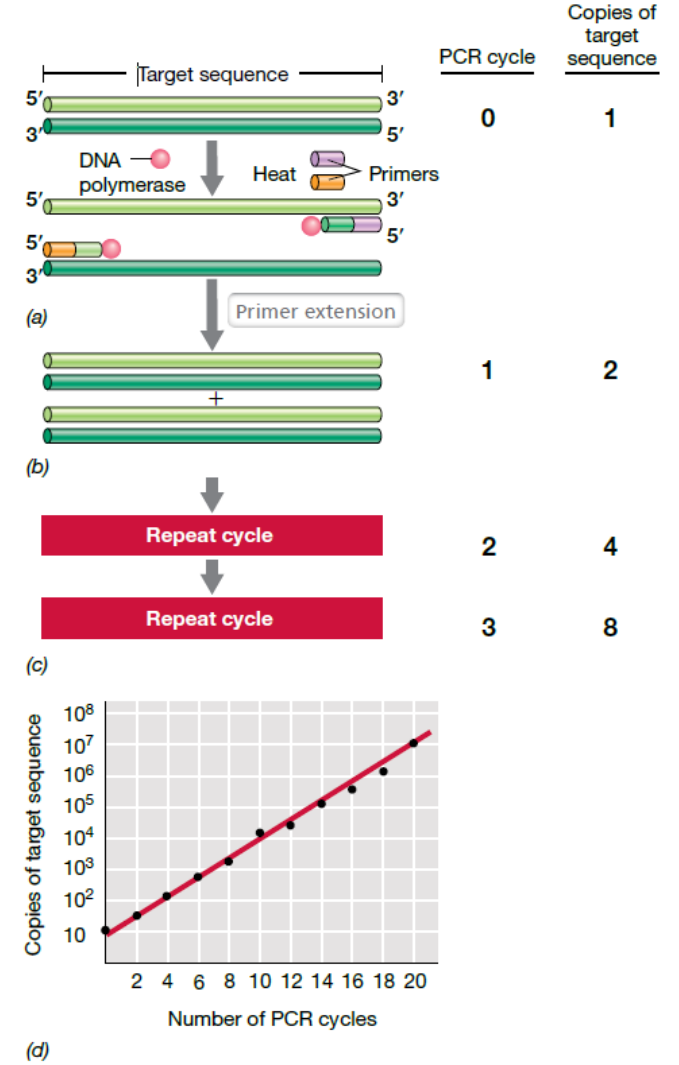
# PCR'in İlk Aşaması: Denatürasyon ve Primer Bağlanması

- İlk adımda, kalıp DNA yüksek ısı ile denatüre edilerek iki zincir birbirinden ayrılır (Figür a).
- Hedef bölgenin iki yanına gelecek şekilde tasarlanmış DNA primerleri ortama fazla miktarda eklenir.
- Soğuma aşamasında, kalıp DNA parçalarının birbirleriyle eşleşmesi yerine primerlerle eşleşmesi sağlanır (Figür a).



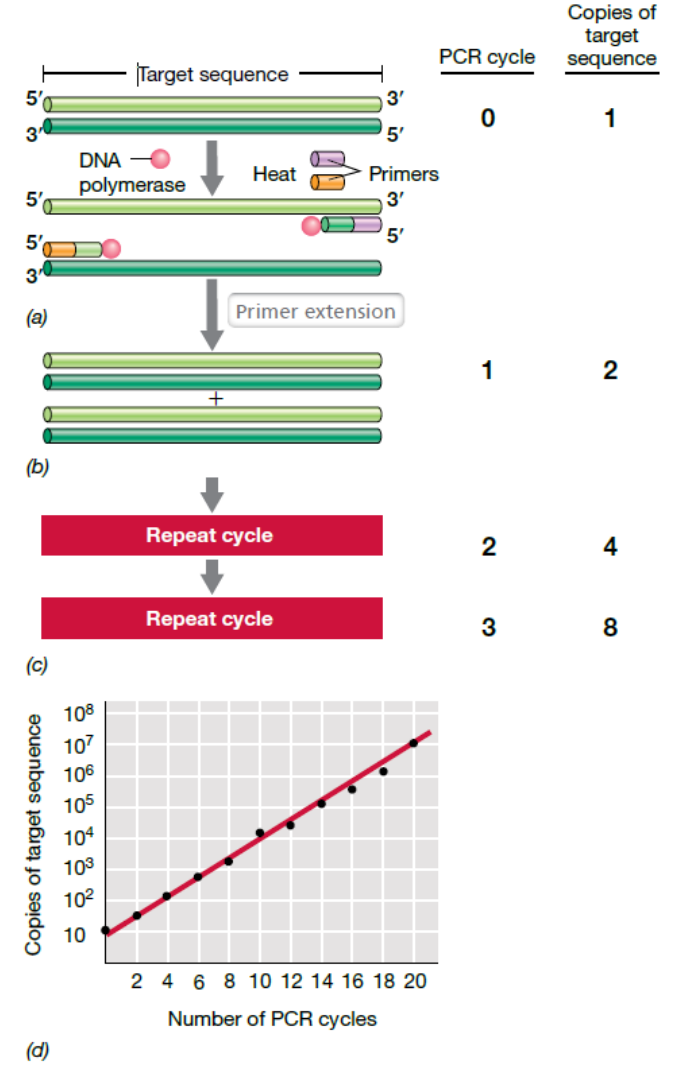
# PCR'in İkinci Aşaması: Uzama

- DNA polimeraz, bağlanan primerleri uzatarak yeni DNA zincirlerinin sentezini başlatır (Figür b).
- Bu süreçte kalıp olarak orijinal DNA kullanılır ve hedef bölge enzim tarafından kopyalanır.
- Elde edilen ürünler bir sonraki döngü için kalıp görevi görmeye hazır hâle gelir.



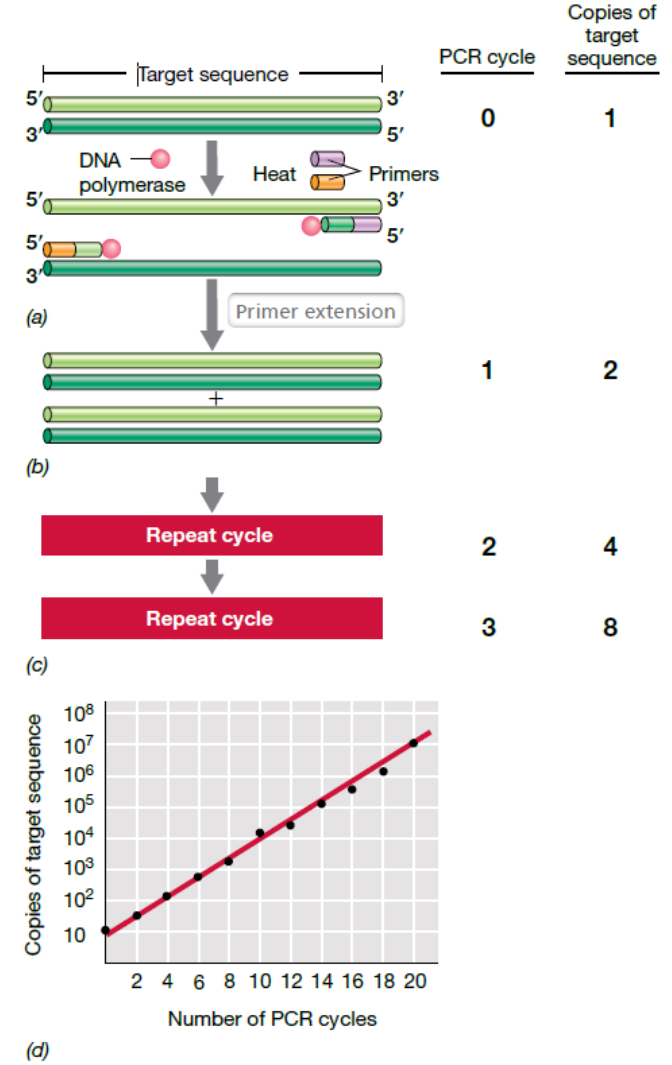
# PCR Döngülerinin Tekrarlanması ve Ürün Artışı

- Uygun inkübasyon süresinin ardından karışım tekrar ısıtılarak zincirler ayrılır ve hedef bölgenin miktarı her döngüde iki katına çıkar (Figür c).
- Karışım soğutulduğunda primerler hem yeni sentezlenen hem de orijinal DNA zincirlerine yeniden bağlanır.
- Genellikle 20–30 döngü uygulanır ve hedef dizinin miktarı  $10^6$ – $10^9$  kat artar (Figür d).



# Termostabil DNA Polimerazların Önemi

- PCR'da yüksek sıcaklıklar kullanıldığı için enzimin 95°C'de stabil kalabilen bir DNA polimeraz olması kritiktir.
- Taq polimeraz, *Thermus aquaticus*'tan izole edilmiş olup denatürasyon adımından etkilenmeden çalışabilir.
- *Pyrococcus furiosus* kaynaklı Pfu polimeraz, Taq'tan daha yüksek ısıya dayanıklıdır ve ayrıca hata düzeltme (proofreading) aktivitesine sahiptir.



# Termostabil Polimerazların Üretimi

- Termostabil DNA polimerazlara duyulan yüksek talep nedeniyle bu enzimleri kodlayan genler *E. coli* içine klonlanmıştır.
- Böylece Taq ve Pfu gibi polimerazlar ticari olarak büyük miktarlarda üretilebilmektedir.
- Bu yaklaşımla hem verim hem de araştırmalarda enzimlere erişilebilirlik artırılmıştır.

# PCR'in Kullanım Alanları

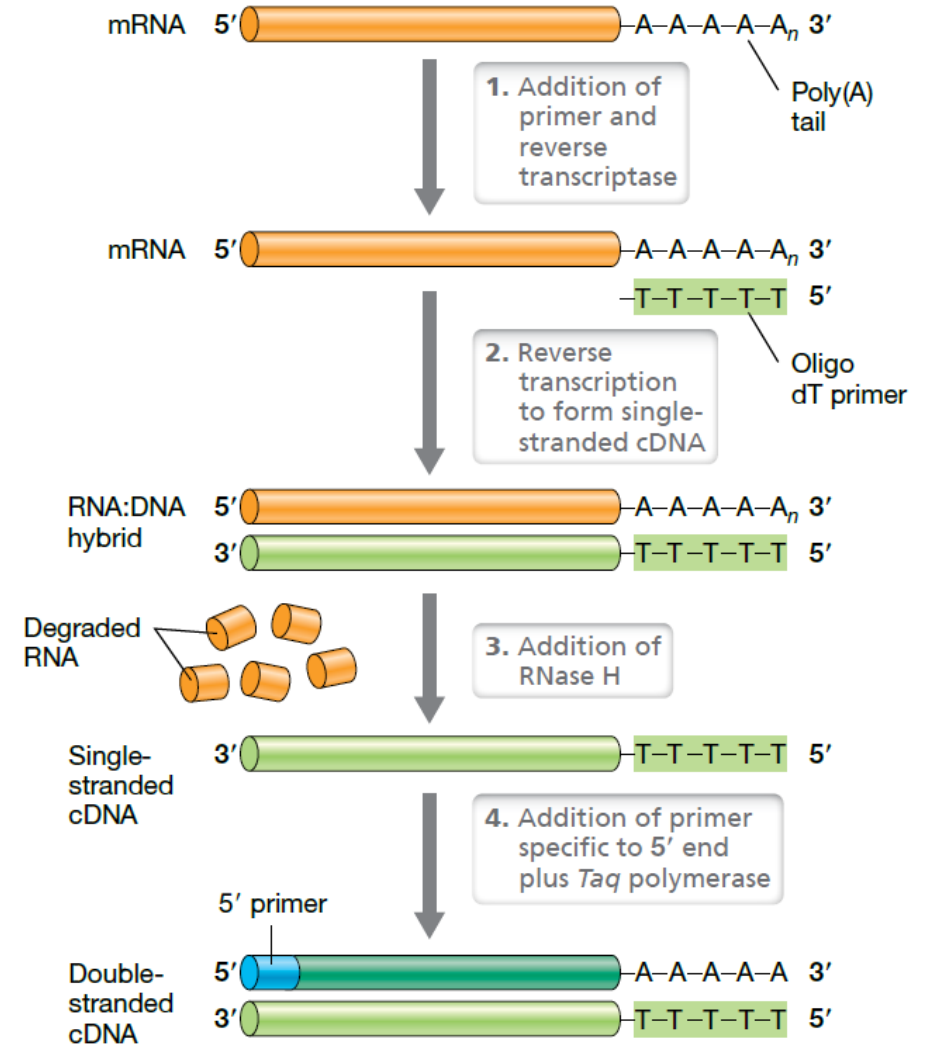
- PCR, gen klonlaması veya dizileme için gerekli DNA'nın kolayca elde edilmesini sağlar.
- Karşılaştırmalı ya da filogenetik çalışmalarda, geniş organizma gruplarında korunan dizilere uygun primerler kullanılarak genler çoğaltılır.
- Bu yöntem, SSU rRNA gibi hem korunan hem değişken bölgeler içeren moleküllerle habitatlardaki mikrobiyal çeşitliliğin incelenmesine olanak tanır.

# PCR'ın Hassasiyeti ve Çeşitli Örneklerde Kullanımı

- PCR, çok az miktardaki DNA'yı bile çoğaltabilecek kadar yüksek duyarlılığa sahiptir.
- Mumyalanmış insan kalıntıları, fosilleşmiş bitki ve hayvan örnekleri ve tek bir mikrobiyal hücre gibi çok çeşitli kaynaklardan DNA elde edilmesini sağlar.
- Klinik tanıda ve adli bilimlerde, kan, semen veya doku gibi örneklerden kimlik tespitinde yaygın olarak kullanılır.

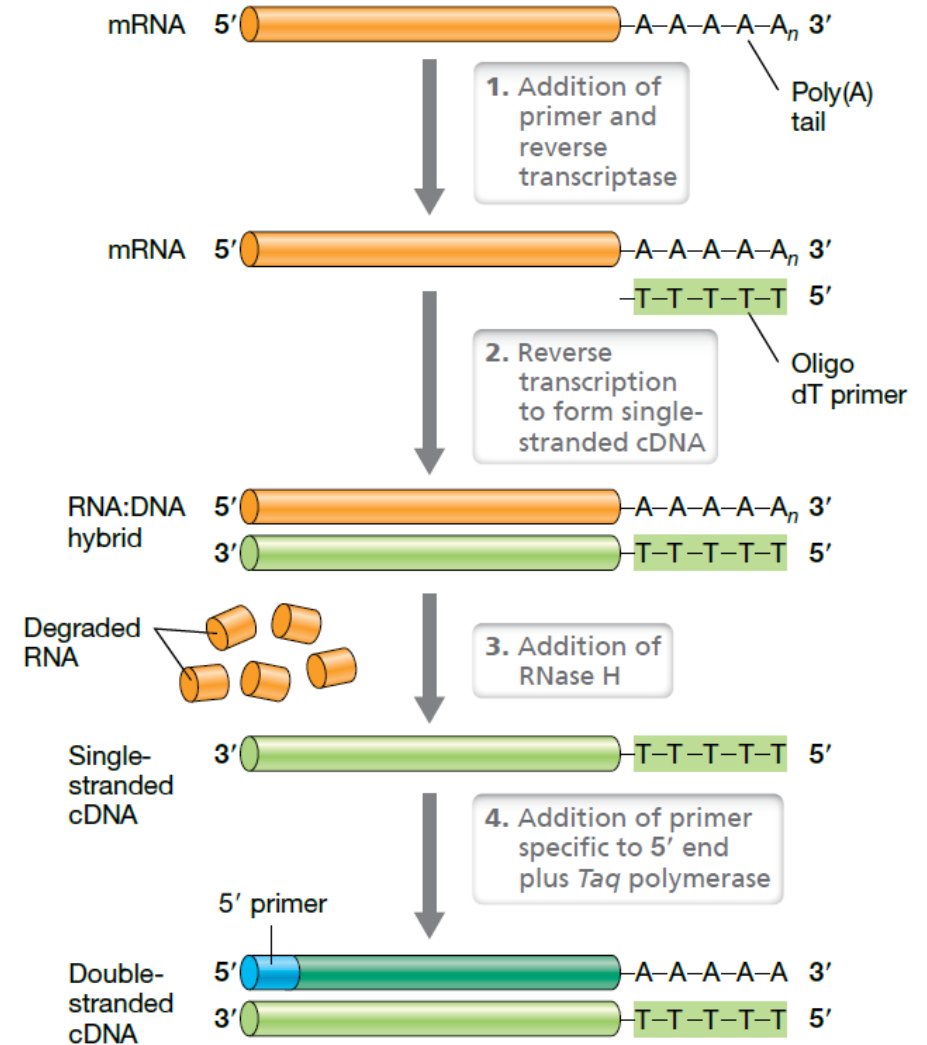
# RT-PCR'in Temel Mantığı

- RT-PCR, standart PCR'in bir uzantısı olup mRNA'dan DNA sentezlenmesini sağlar.
- Bir genin ifade edilip edilmediğini belirlemek veya ökaryotik bir geni intronsuz biçimde bakterilerde ifade ettirmek için kullanılabilir.
- Bu yöntemde retroviral bir enzim olan revers transkriptaz, RNA'yı tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) dönüştürür.



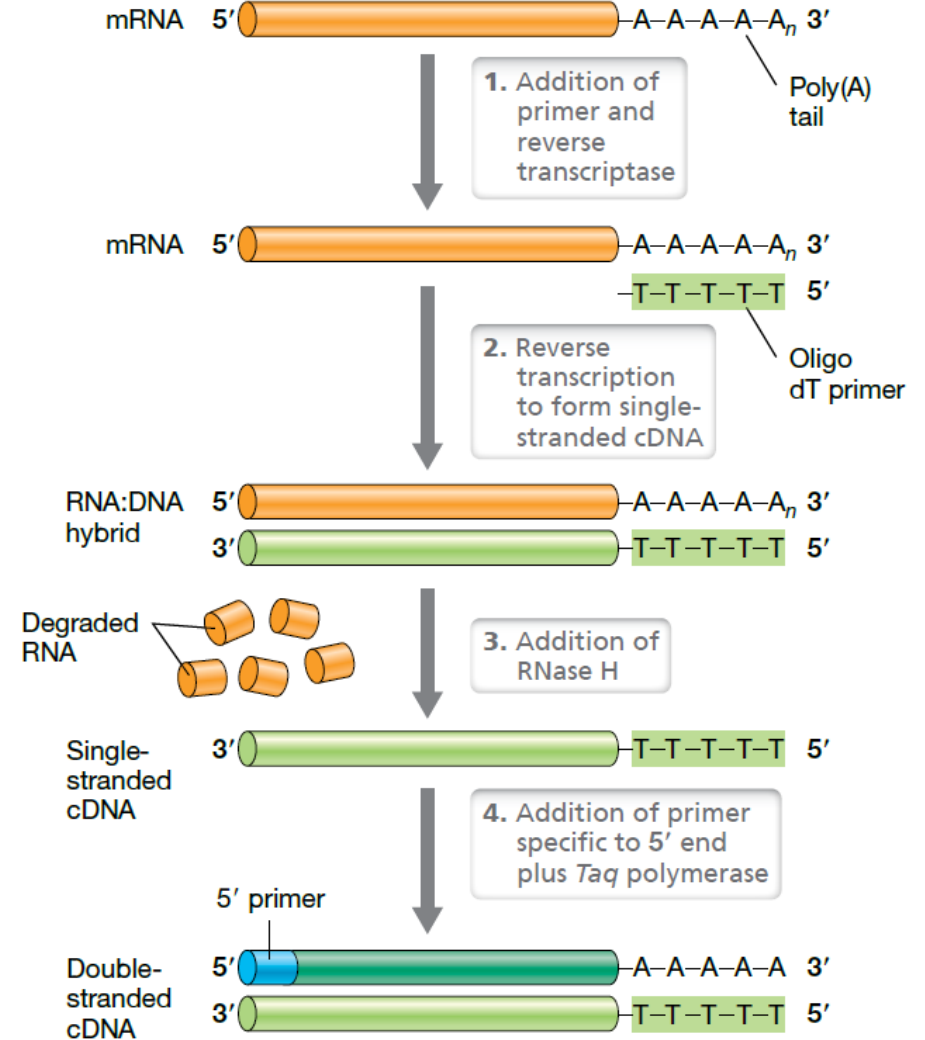
# RT-PCR'da cDNA Sentezi

- cDNA sentezi, hedef RNA'nın 3' ucuna bağlanan bir primer aracılığıyla revers transkriptaz tarafından başlatılır.
- Kalıp ökaryotik mRNA'da ise, poli(A) kuyruğuna karşılık gelen bir primer kullanılabilir.
- Revers transkriptazın aktivitesi DNA-RNA hibrit molekülünü oluşturur ve RNaz H bu hibritten RNA'yı uzaklaştırarak tek iplikli cDNA'yı bırakır.



# RT-PCR ve İkinci Primerin Kullanımı

- RNaz H ile RNA uzaklaştırıldıktan sonra elde edilen tek iplikli cDNA standart PCR için kalıp hâline gelir.
- Bu aşamada cDNA'nın 5' ucuna bağlanan ikinci bir primer kullanılarak PCR döngüleri başlatılır.
- Böylece RNA kökenli bir gen bölgesi DNA formunda çoğaltılabilir.

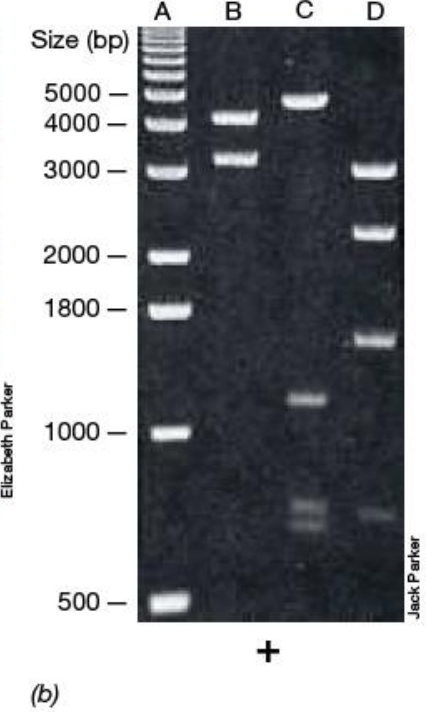


# Jel Elektroforezi ile Nükleik Asit Ayrımı

- Nükleik asit amplifikasyonunun başarılı olup olmadığını doğrulamak için jel elektroforezi kullanılır (Figür a).
- Agaroz jelde DNA ve RNA, boyut ve yük farklarına göre ayrılır ve negatif yüklerinden dolayı pozitif elektroda doğru hareket eder.
- Küçük moleküller jelde daha hızlı ilerleyerek büyük moleküllerden daha uzak noktalara ulaşır.



(a)



(b)

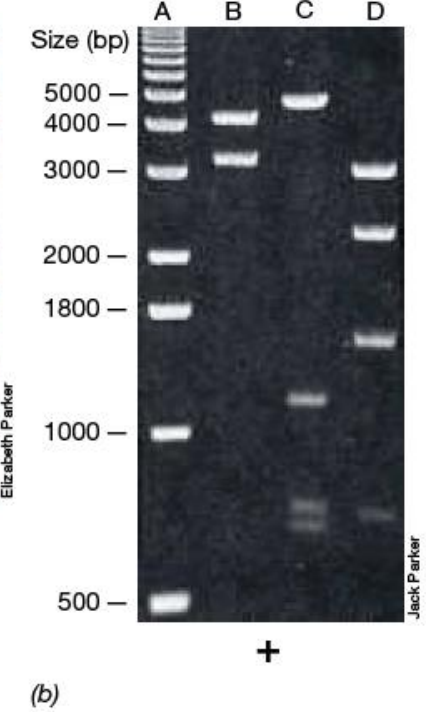


# Jel Boyama ve Örnek Boyutlarının Belirlenmesi

- Jel elektroforezinin ardından jel, nükleik asitlere bağlanarak floresans veren etidyum bromür ile boyanır (Figür b).
- Hedef DNA veya RNA'nın boyutu, bilinen büyüklükte fragmentlerden oluşan bir merdiven (ladder) ile karşılaştırılarak belirlenir.
- Ayrılan DNA parçaları daha sonra klonlama veya hibridizasyon gibi çeşitli işlemlerde kullanılmak üzere jelden saflaştırılabilir.



(a)



(b)



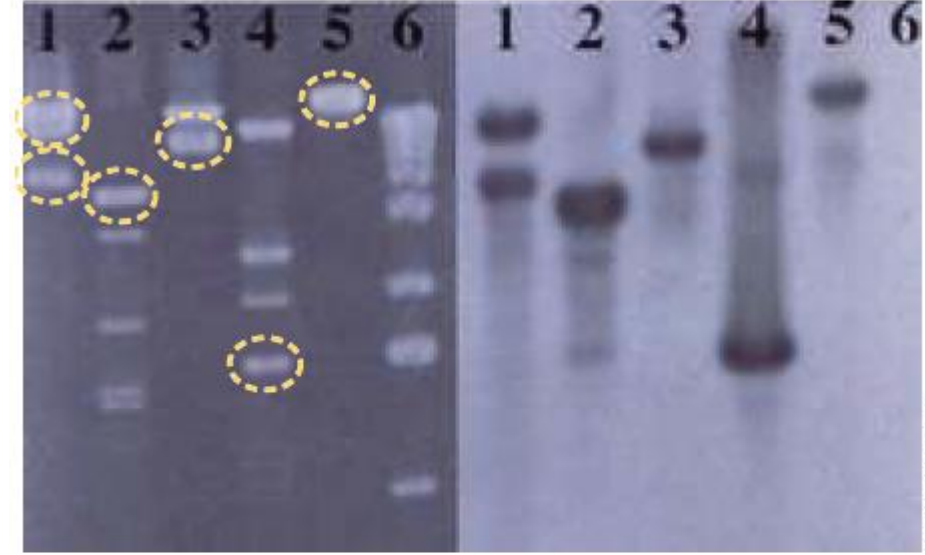
# Nükleik Asit Hibridizasyonunun Temeli

- Denatüre edilmiş tek iplikli DNA veya RNA molekülleri, tamamlayıcı baz eşleşmesiyle hibrit çift iplikli yapılar oluşturabilir.
- Bu süreç nükleik asit hibridizasyonu olarak adlandırılır ve DNA ile RNA segmentlerinin tespit ve karakterizasyonunda yaygın bir yöntemdir.
- Kimyasal olarak işaretlenmiş veya radyoaktif prob molekülleri, hedef dizilere bağlanarak hibridizasyonun görünür hâle gelmesini sağlar.

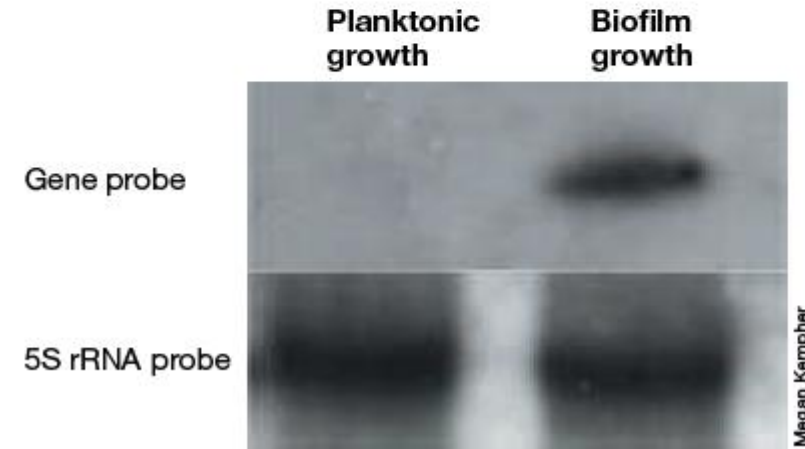


# Southern ve Northern Blot Yöntemleri

- Southern blot tekniğinde, jel elektroforez ile ayrılmış DNA parçalarına dizisi bilinen prob molekülleri bağlanır.
- Northern blot yöntemi ise RNA'yı hedef alır ve prob olarak DNA veya RNA kullanılabilir.
- Her iki teknikte de nükleik asitler tek iplikli hâle getirilir, membrana aktarılır ve prob sadece tamamlayıcı dizilerin bulunduğu bölgelere bağlanır.



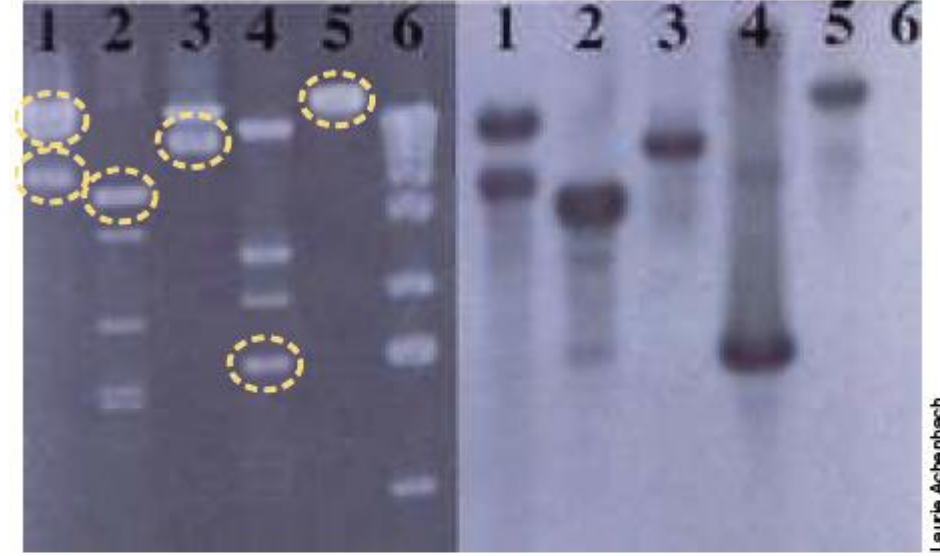
(a) Southern blot



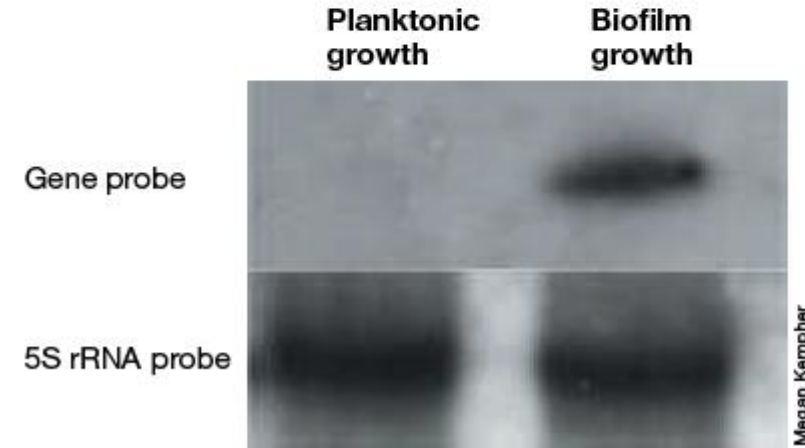
(b) Northern blot

# Blotların Yorumu ve Sinyal Şiddeti

- Southern blotlarda probun bağlandığı bölgeler, hedef diziyi içeren fragmentlerin konumunu gösterir.
- Northern blotlarda sinyal yoğunluğu, hedef genin mRNA bolluğuna dair yaklaşık bir fikir verir.
- Bu yöntemler, gen tespiti ve gen ekspresyon seviyelerinin değerlendirilmesinde düzenli olarak kullanılır.



(a) Southern blot

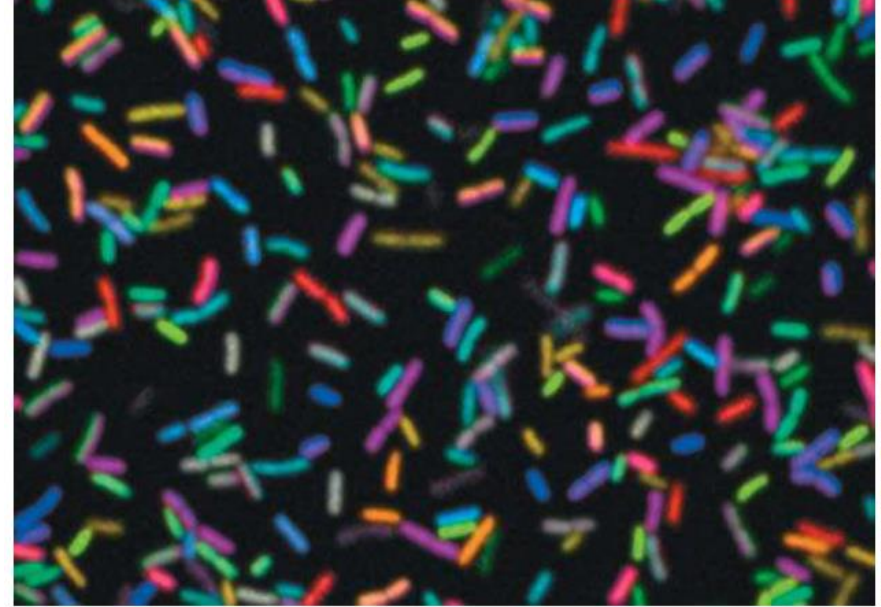


(b) Northern blot



# FISH Tekniği ve Uygulamaları

- FISH, floresan işaretli prob moleküllerinin hücre içindeki belirli DNA veya RNA dizilerini hedeflemesine dayanır.
- Klinik örneklerde patojenlerin veya çevresel örneklerde belirli bakterilerin tanımlanmasını sağlar.
- Yandaki figür, sekansları yalnızca küçük farklılıklar gösteren 28 farklı *E. coli* suşunun sekiz farklı prob kombinasyonu ile ayırt edilmesini göstermektedir.



Alex Valm and Gary Borsy, Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA

# Hibridizasyonun Omik Çalışmalardaki Rolü

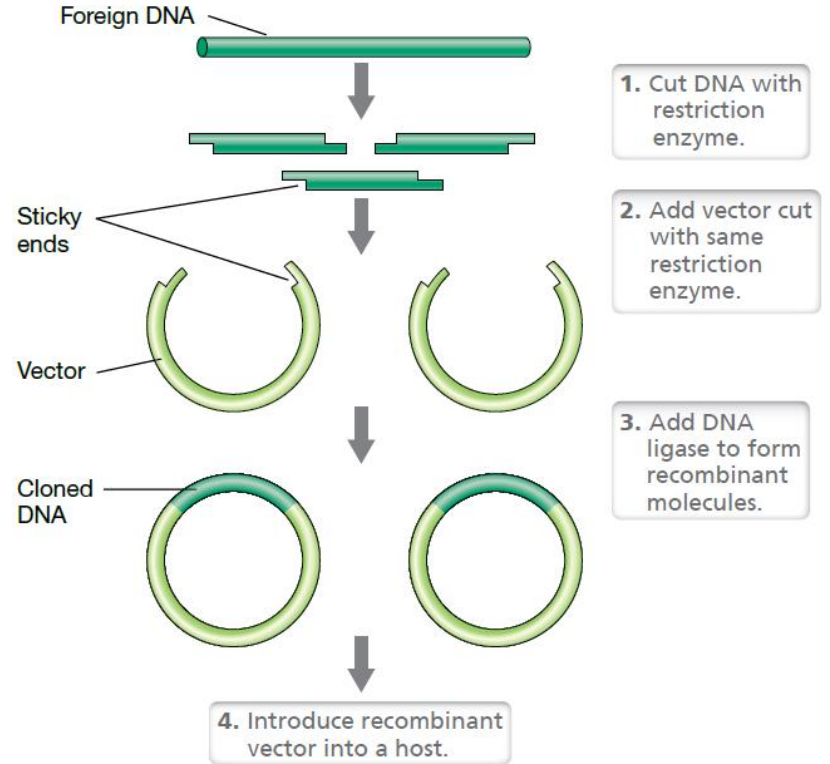
- Hibridizasyon, transkriptomik ve meta-transkriptomik gibi omik yaklaşımlarda gen ifadesinin geniş ölçekli izlenmesinde önemli bir araçtır.
- Saf kültürlerde ve doğal popülasyonlarda mikroarray teknolojisi ile genom çapında ifade profilleri incelenebilir.
- Bu teknik, çok sayıda genin aynı anda analiz edilebilmesine olanak tanıyarak modern moleküler biyolojide önemli bir yer tutar.

# Moleküler Klonlamaya Giriş

- Moleküler klonlama, istenen genlerin orijinal kaynağından alınarak küçük ve kolay manipüle edilebilir bir genetik elemana taşınmasıyla gerçekleşir.
- Bu süreç sonunda farklı kaynaklardan DNA içeren rekombinant DNA molekülleri oluşur.
- Rekombinant vektör uygun bir konağa aktarılınca klonlanmış DNA çoğalır ve genetik mühendisliğin temelini oluşturur.

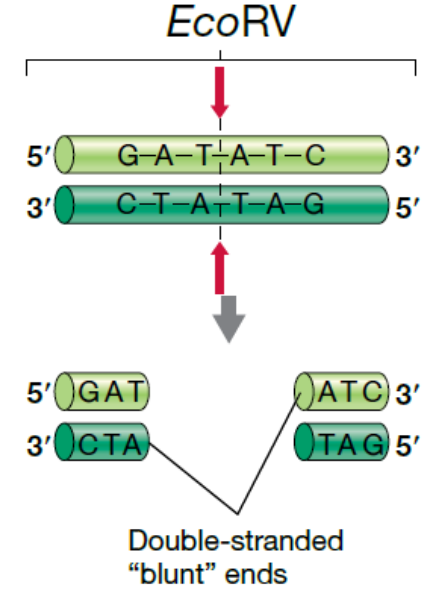
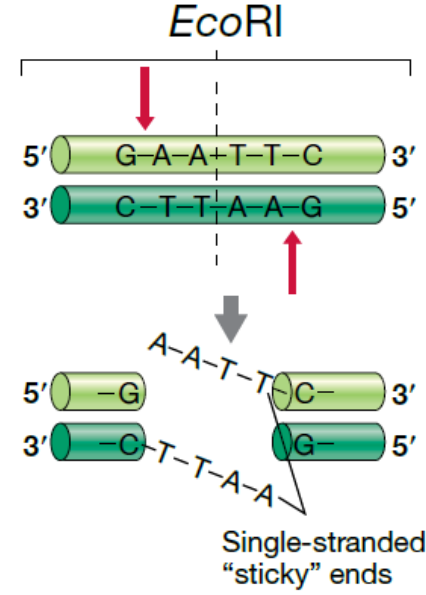
# Gen Klonlamasının Genel Çerçevesi

- Kaynak DNA izole edildikten sonra ilk adım DNA'nın bir klonlama vektörüne yerleştirilmesidir.
- İkinci adım, vektörün uygun bir konağa aktarılmasıdır.
- Kaynak DNA, PCR ile çoğaltılmış bir gen, revers transkriptaz ile sentezlenmiş DNA ya da tamamen sentetik olarak üretilmiş DNA olabilir.
- Klonlama vektörleri bağımsız çoğalabilen küçük genetik elementlerdir ve yabancı DNA'nın taşınmasına olanak sağlar.



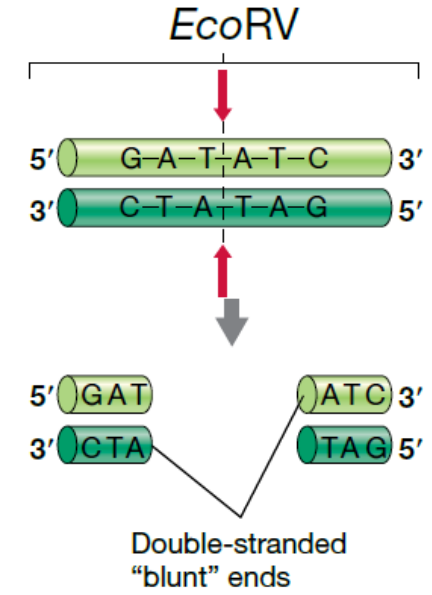
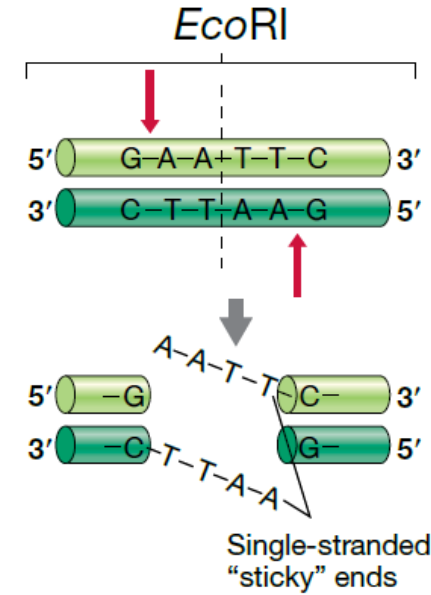
# Restriksiyon Enzimleri ve Kesim Mekanizması

- Klonlama vektörleri genellikle yabancı DNA'nın bir restriksiyon bölgesine eklenmesini mümkün kılacak şekilde tasarlanır.
- Restriksiyon endonükleazlar belirli baz dizilerini tanır ve fosfodiester bağınyı keserek çift iplikli kırıklar oluşturur.
- Bu tanıma dizileri genellikle ters tekrarlar şeklindedir ve palindrom olarak adlandırılır.



# Bakterilerde Restriksiyon Enzimleri ve Kesim Tipleri

- Farklı özgülüklere sahip restriksiyon enzimleri Bacteria aleminde yaygındır ve hücreyi viral DNA'ya karşı korur.
- Hücre kendi genomundaki olası restriksiyon bölgelerini çoğunlukla metilasyon yoluyla modifiye ederek kendi enzimlerinden korunur.
- EcoRI enzimi çift iplikte kademeli kesik oluşturarak “yapışkan” uçlar meydana getirir, EcoRV ise doğrudan karşılıklı keserek küt uçlar oluşturur.

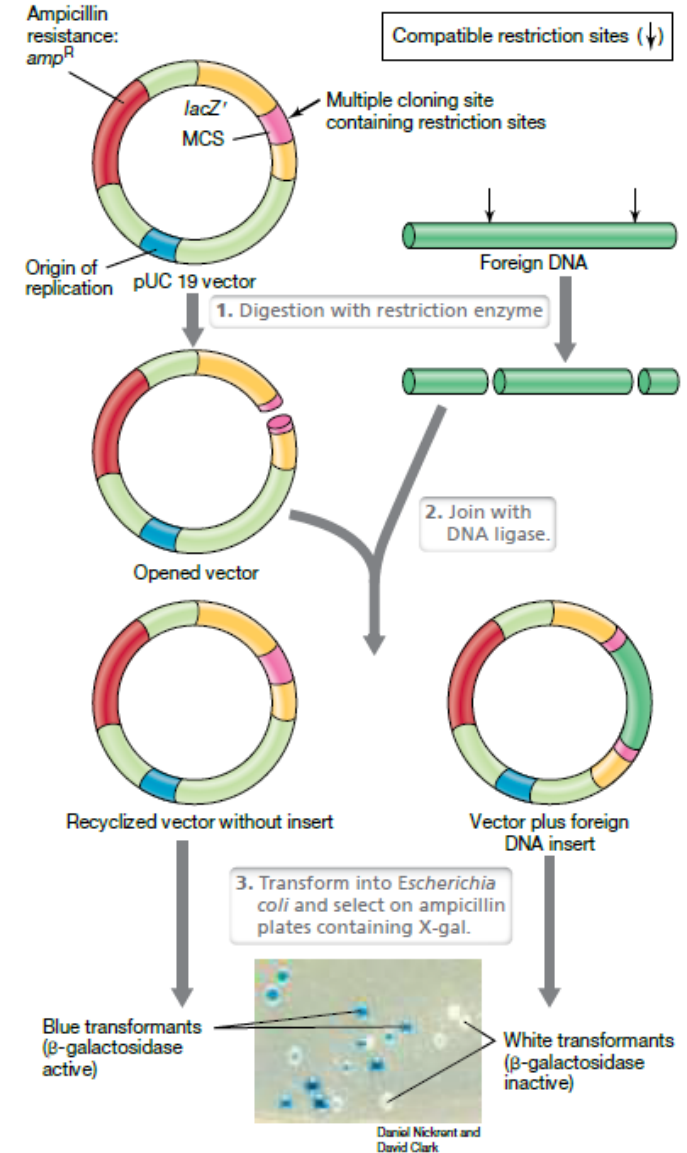


# Kaynak DNA ve Vektörün Birleştirilmesi

- Kaynak DNA ve vektör aynı restriksiyon enzimiyle kesildiğinde oluşan tamamlayıcı yapışkan uçlar DNA ligaz ile birleştirilebilir.
- PCR ile elde edilen DNA ürünlerinin vektöre eklenmesinde de DNA ligaz görev alır.
- Böylece gen veya DNA fragmenti vektörün uygun bölgesine yerleştirilmiş olur.

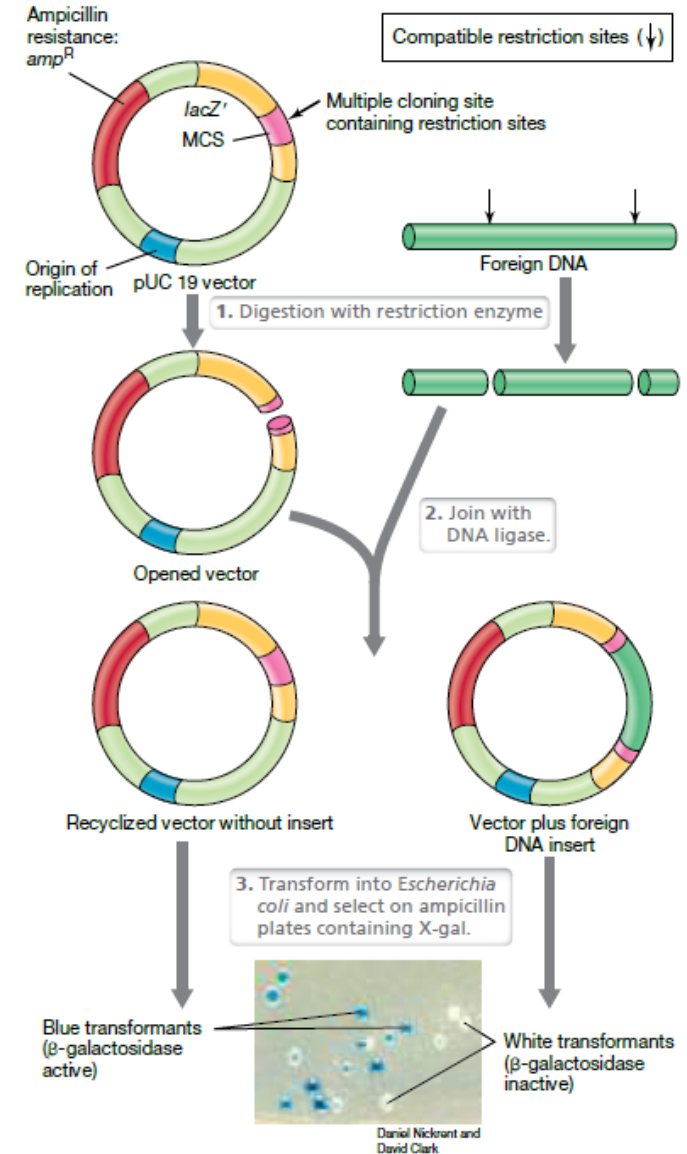
# Rekombinant DNA'nın Konağa Aktarılması

- Klonlamanın son aşamasında rekombinant DNA uygun bir konak organizmaya aktarılır ve burada çoğalır.
- Uygulamada bu işlem farklı rekombinant yapıların karışımını oluşturabilir ve yalnızca bazı hücreler hedef geni taşır.
- Doğru rekombinantı içeren konakları belirlemek için genellikle antibiyotik direnci gibi vektör kaynaklı belirteçler kullanılır.
- Ayrıca yabancı DNA eklenmesiyle inaktive olan vektör genlerine bakılarak koloniler taranabilir.



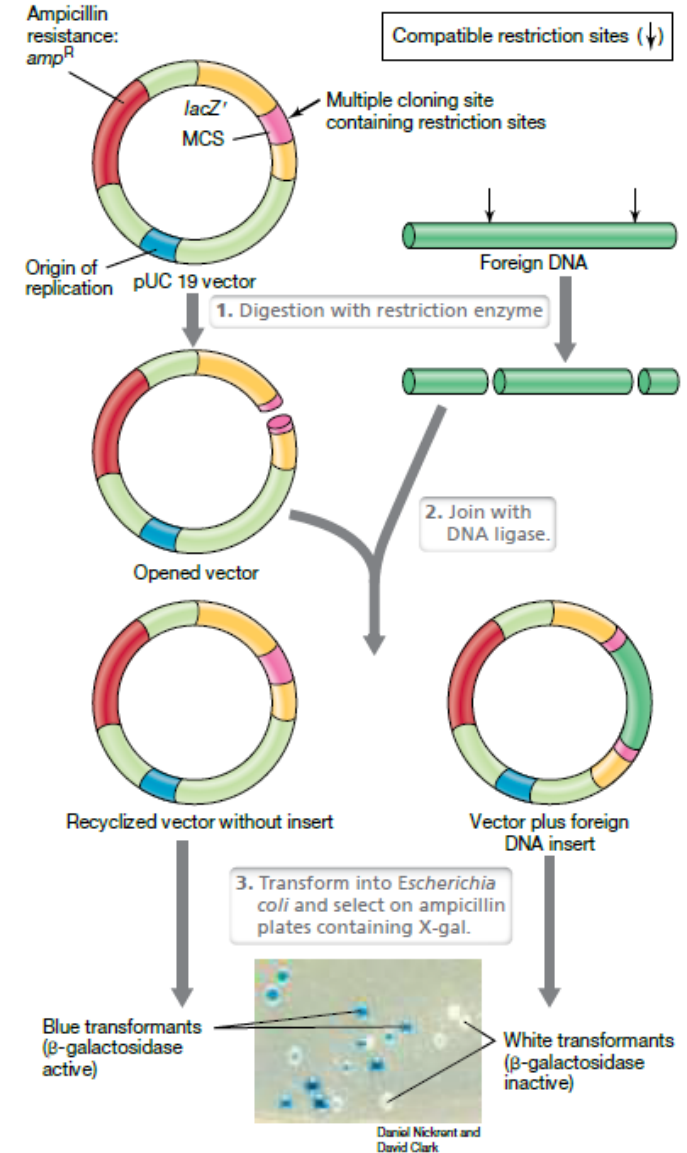
# Klonlama Vektörlerinin Temel Özellikleri

- Klonlama vektörleri arasında virüsler, kozmidler ve yapay kromozomlar bulunur ve seçim yapılırken fragment boyutu ve konak tipi dikkate alınır.
- Plazmitler yaygın kullanılan vektörlerdir ve pUC19 buna iyi bir örnektir.
- pUC19, seçim için ampisilin direnci genine ve rekombinantların saptanmasını sağlayan mavi–beyaz tarama sistemine sahiptir.
- Ayrıca lacZ genine yerleştirilmiş çoklu klonlama bölgesi (MCS) birçok restriksiyon enzimi için kesim bölgesi içerir.



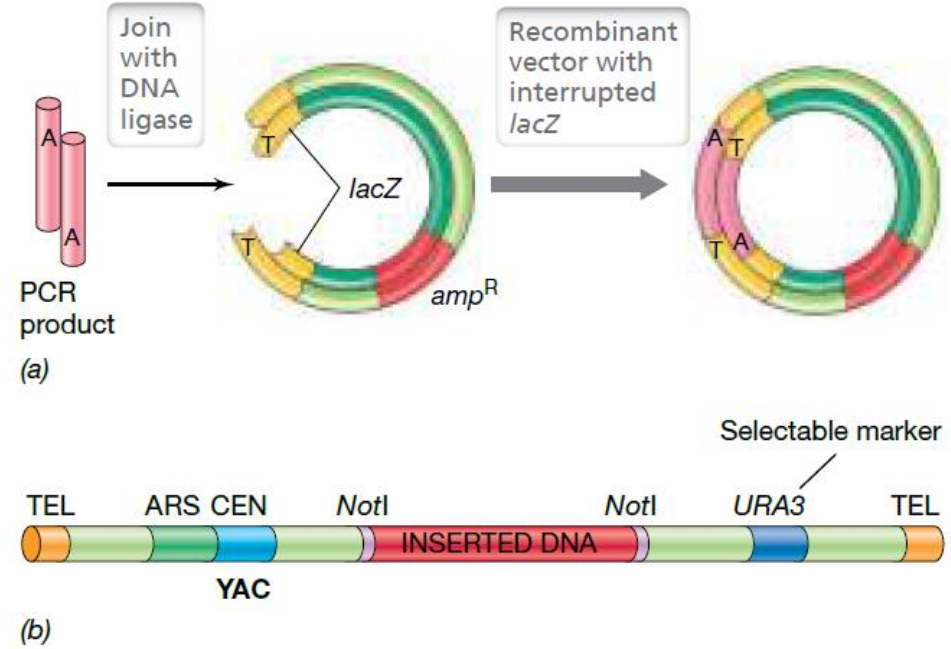
# pUC19 ile Gen Klonlama Süreci

- Uygun bir restriksiyon enzimi MCS içindeki kesim bölgesinden seçilir ve hem vektör hem yabancı DNA bu enzimle kesilir.
- Kesimle lineerleşen vektöre yabancı DNA eklenir ve DNA ligaz ile uçlar birleştirilir.
- Bu ekleme lacZ genini bozarak eklenen DNA'nın varlığını gösteren bir "insesiyonal inaktivasyon" oluşturur.
- *E. coli* hücrelerine taşınan plazmitler ampisilin ve X-gal içeren ortama ekildiğinde mavi koloniler vektörün boş olduğunu, beyaz koloniler ise rekombinant DNA taşıdığını gösterir.



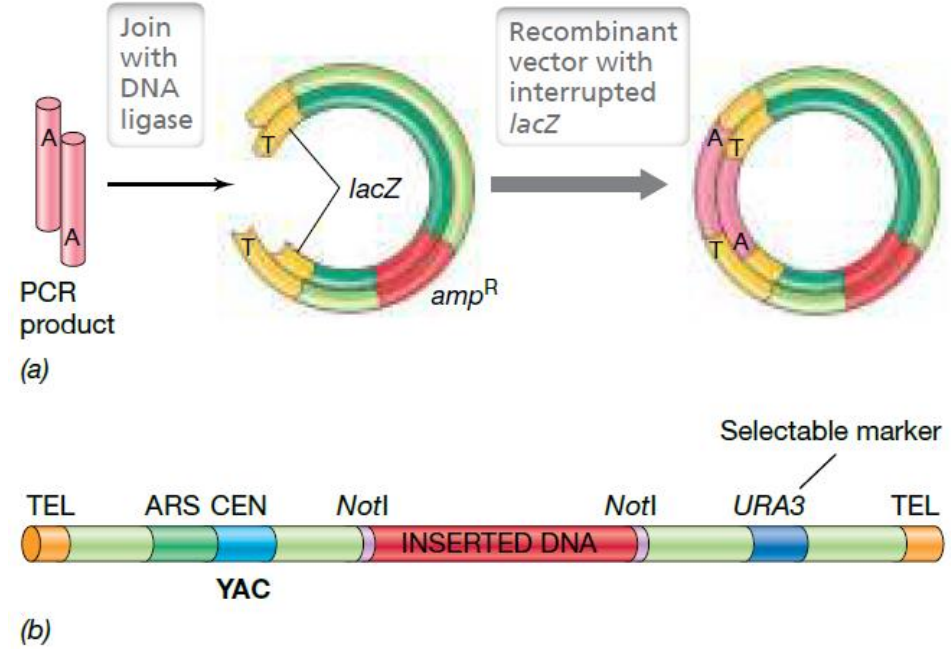
# PCR Ürünlerinin Klonlanması ve Taq Polimerazın Rolü

- Taq polimerazın enzimatik özelliği nedeniyle PCR ürünlerinin 3' ucunda şablondan bağımsız bir adenin kalıntısı bulunur.
- Bu nedenle 3' ucunda timin çıkıntıları taşıyan özel linear vektörler geliştirilmiştir (Figür a).
- Taq ürünleri bu timin çıkıntılarıyla eşleşir ve DNA ligaz yardımıyla vektöre kolayca eklenebilir.




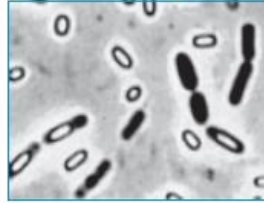

# Yapay Kromozomlar ve Maya Sisteminde Klonlama

- *Saccharomyces cerevisiae* için geliştirilen maya yapay kromozomları (YAC) büyük DNA fragmentlerini taşıyabilen lineer vektörlerdir (Figür b).
- YAC'lar, normal ökaryotik kromozomlar gibi davranabilmek için bir replikasyon başlangıç bölgesine, telomerlere ve bir sentromere sahiptir.
- Ayrıca klonlama bölgesi ve transformasyon sonrası seçim yapılmasını sağlayan bir gen içerir.



# Klonlama İçin Uygun Konakların Özellikleri


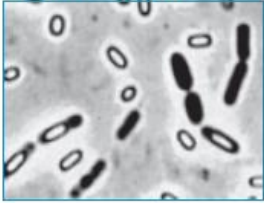

- Klonlama çalışmalarında tercih edilen konaklar kolay yetiştirilebilen, DNA ile kolay dönüştürülebilir ve kültürde genetik olarak stabil kalabilen mikroorganizmalardır.
- Bu konakların ayrıca vektörün çoğalmasına izin verecek uygun enzimlere ve iyi tanımlanmış bir genetik altyapıya sahip olmaları önemlidir.
- *E. coli*, *Bacillus subtilis* ve maya *S. cerevisiae* bu özellikleri taşıyan yaygın klonlama konaklarıdır.
- Bu organizmaların tüm genom dizilerinin çözümlenmiş olması ve genetik manipülasyon araçlarının bol olması araştırmaları kolaylaştırmaktadır.

Bacteria		Eukaryote
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		
Well-developed genetics Many strains available Most-studied bacterium	Easily transformed Nonpathogenic Naturally secretes proteins Endospore formation simplifies culture	Well-developed genetics Nonpathogenic Can process eukaryotic mRNAs Easy to grow
Potentially pathogenic Periplasm traps proteins	Genetically unstable Genetics less developed than in <i>E. coli</i>	Plasmids unstable Will not replicate most bacterial plasmids
Advantages	Disadvantages	



# Bakteriyel ve Ökaryotik Konakların Tercih Nedenleri

- İnsan bağırsağında bulunan bazı doğal *E. coli* suşları zararlı olabilse de, klonlama için özel olarak güvenli ve modifiye edilmiş suşlar geliştirilmiştir.
- Ancak gram-negatif olan *E. coli*'nin dış zar yapısı, ifade edilen bazı proteinlerin salgılanmasını zorlaştırabilir.
- Bu nedenle protein salgısının istenmesi durumunda gram-pozitif *B. subtilis* tercih edilebilir.
- Ökaryotik proteinlerin doğru katlanması ve işlenmesi gerektiğinde ise maya *S. cerevisiae* en yaygın kullanılan ökaryotik konaktır.

Bacteria		Eukaryote
<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
		
Well-developed genetics Many strains available Most-studied bacterium	Easily transformed Nonpathogenic Naturally secretes proteins Endospore formation simplifies culture	Well-developed genetics Nonpathogenic Can process eukaryotic mRNAs Easy to grow
Potentially pathogenic Periplasm traps proteins	Genetically unstable Genetics less developed than in <i>E. coli</i>	Plasmids unstable Will not replicate most bacterial plasmids
Advantages	Disadvantages	



# Ökaryotik Konaklara DNA Aktarımı

- Bazı uygulamalarda bitki dokuları, böcek hücre hatları veya memeli hücre kültürleri gibi daha karmaşık ökaryotik konaklar kullanılabilir.
- Ökaryotik ortamda klonlanmış DNA'nın hücre içine alınması için transfeksiyon, mikroenjeksiyon veya elektroporasyon gibi çeşitli yöntemler uygulanır.
- Hangi ökaryotik konak seçilirse seçilsin, klonlanmış DNA'nın hücreye etkin bir şekilde aktarılması temel gerekliliktir.
- Bu yöntemler, gen ifadesinin doğru şekilde gerçekleştirilebilmesi için konak hücreye gereken genetik materyali kazandırır.

# Bakteride Yabancı Gen İfadesinin Zorlukları

- Klonlanan genlerin bakteride ifade edilmesi için genin bakteriyel bir promotör kontrolüne alınması gerekir.
- Genin intronlar içermesi durumunda, bu intronların bakteride doğru bir protein üretimi için mutlaka çıkarılması gerekir.
- Konak ile uyumsuz kodon kullanımı, ifadenin verimini düşürebilir ve gen dizisinde düzenleme gerektirebilir.
- Ayrıca birçok ökaryotik protein, aktif forma ulaşmak için bakterilerin gerçekleştiremediği translasyon sonrası modifikasyonlara ihtiyaç duyar.

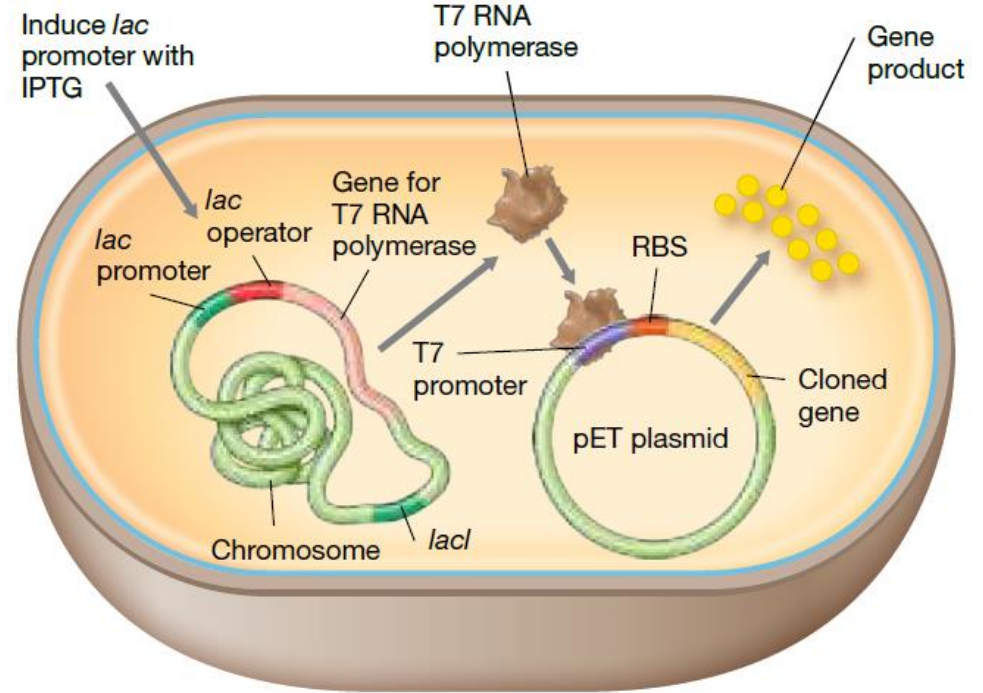


# Ekspresyon Vektörlerinin Amacı

- Ekspresyon vektörleri, klonlanan genlerin kontrollü şekilde ifade edilmesini sağlayacak şekilde tasarlanır.
- Yeni konakta genin kendi promotörünün yetersiz çalışabilmesi veya aşırı protein üretiminin konak hücreye zarar verebilmesi nedenleriyle düzenlenebilir sistemler kullanılır.
- Yüksek düzeyde transkripsiyon için RNA polimeraza güçlü bağlanan promotörler tercih edilir.
- Bu tasarım, hem genin etkin transkripsiyonunu hem de hücre büyümesinin yönetilebilir olmasını sağlar.

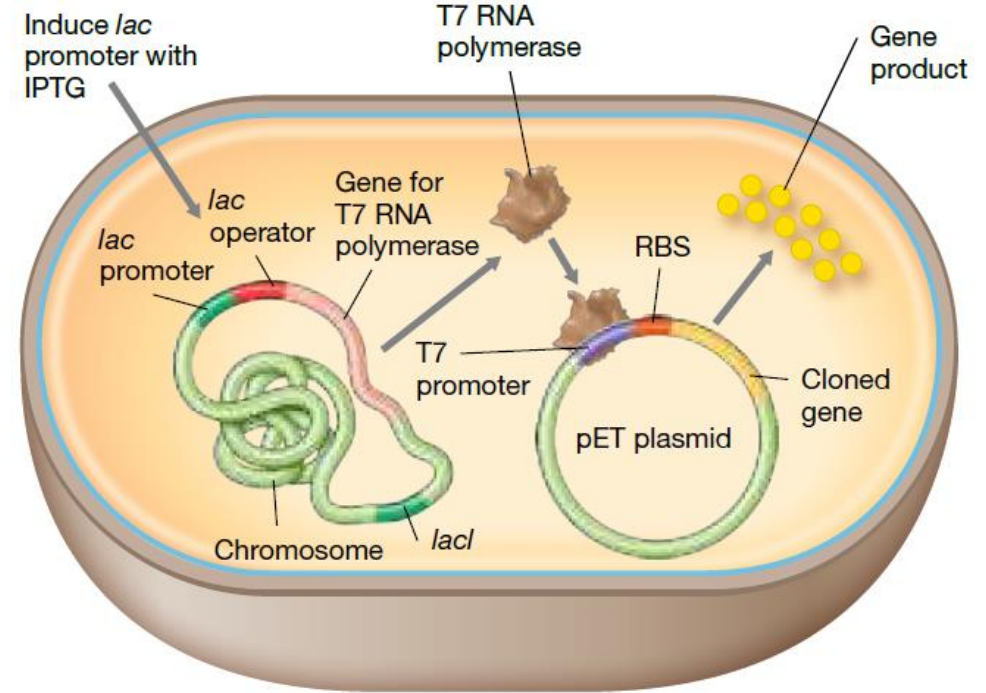
# T7 Promotörüyle Kontrollü Gen İfadesi

- T7 bakteriyofajı, yalnızca T7 promotörlerini tanıyan kendi RNA polimerazını kodlar ve bu özellik ekspresyon sistemlerinde kullanılır.
- T7 ekspresyon vektörlerinde klonlanan gen, T7 promotörü kontrolüne alınır ve konakta T7 RNA polimeraz geninin bulunması gerekir.
- Bu polimeraz geni, lac gibi kolay düzenlenebilir bir sistem altında konak kromozomuna entegre edilir.
- Böylece araştırmacı, klonlanan genin ifade zamanını ve düzeyini hassas bir biçimde kontrol edebilir.



# BL21 ve pET Sisteminin Çalışma Prensipleri

- BL21 serisi *E. coli* suşları, pET vektörleri ile uyumlu olarak T7 tabanlı ekspresyon için özel geliştirilmiştir.
- IPTG gibi bir lac indükleyicisi eklendiğinde T7 RNA polimeraz aktifleşir ve yalnızca T7 promotörüne bağlı klonlanmış genleri transkribe eder.
- T7 RNA polimerazın yüksek etkinliği, RNA öncüllerinin çoğunu kullanarak konak genlerinin transkripsiyonunu büyük ölçüde sınırlar.
- Böylece hücre büyümesi durma noktasına gelir ve yapılan translasyon esas olarak hedef proteini üretir.



# mRNA'nın Etkili Translasyona Uğraması İçin Gerekenler

- Bir mRNA'dan etkin protein üretimi için ribozomların doğru bölgeye bağlanması ve doğru okuma çerçevesinde başlaması gerekir.
- Bakteriyel ribozom bağlanma bölgeleri (RBS) ökaryotik genlerde bulunmaz ve bu nedenle vektöre mühendislik yoluyla eklenmelidir.
- Ökaryotik kökenli genlerin bakteride yüksek seviyede ifade edilebilmesi için bu RBS ve uygun başlangıç kodonlarının yerleştirilmesi zorunludur.
- Bu düzenlemeler translasyon verimliliğini artırarak hedef proteinin yeterli miktarda üretilebilmesini sağlar.



# Kodon Kullanımı ve Site-directed Mutagenез

- Kodon kullanımı, konak hücredeki ilgili tRNA'ların bolluğuna bağlı olduğundan translasyon verimini önemli ölçüde etkiler.
- Genetik kodun fazlalığı nedeniyle birçok amino asit için birden fazla kodon bulunur ve her konak bu kodonları farklı sıklıklarla kullanır.
- Klonlanan gen konakla uyumsuz bir kodon paternine sahipse protein üretimi verimsizleşebilir.
- Bu durumda seçilen kodonların site-directed mutagenез ile düzenlenmesi ifadenin artırılması için etkili bir çözümdür.

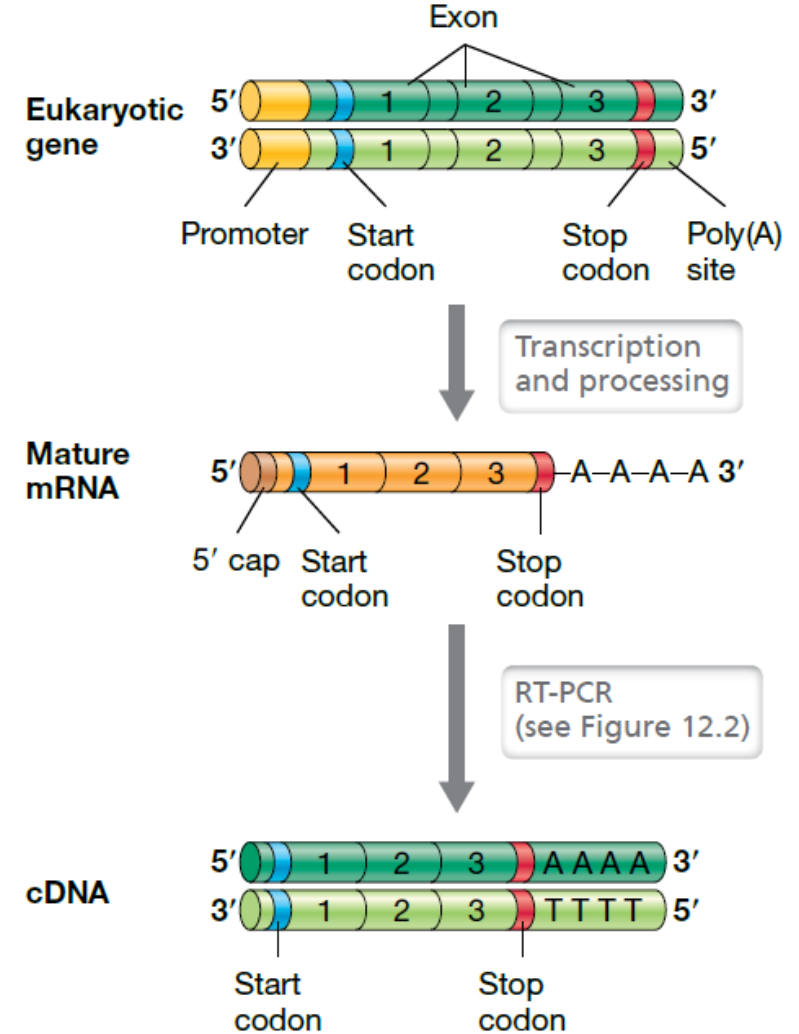


# mRNA Üzerinden Gen Klonlama Yaklaşımı

- Ökaryotik genlerde intron bulunduğundan, bu genlerin bakteride doğru proteini üretmesi için intronların çıkarılması gerekir.
- Ökaryotik mRNA'ların 3' uçlarındaki poli(A) kuyrukları, bunların diğer RNA türlerinden ayrılmasını kolaylaştırır ve saflaştırmada avantaj sağlar.
- Poli(T) içeren kromatografi kolonları, poli(A) kuyruklarıyla eşleşerek mRNA'yı seçici biçimde bağlar ve ayırır.
- Böylece düşük bolluklarına rağmen hücre ekstraktlarından zenginleştirilmiş bir mRNA fraksiyonu elde edilir.

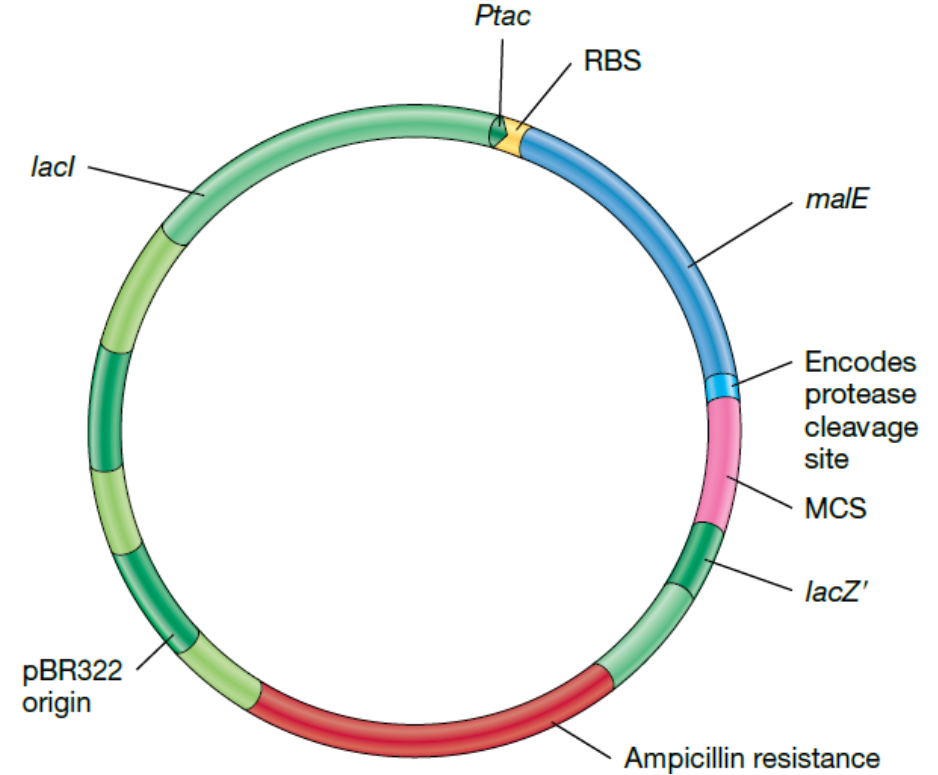
# mRNA'dan cDNA Sentezi ve Klonlama

- İzole edilen mRNA, RT-PCR kullanılarak intronsuz bir cDNA'ya dönüştürülür.
- Elde edilen çift sarmallı cDNA yalnızca kodlayıcı dizileri içerir ve intron barındırmadığı için bakteriyel ifade için uygundur.



# mRNA'dan cDNA Sentezi ve Klonlama

- Ancak bu cDNA'da promotör gibi yukarı düzenleyici bölgeler bulunmadığından ifadenin gerçekleşmesi için ekspresyon vektörlerine ihtiyaç vardır.
- Bu vektörler, bakteriyel promotörler ve ribozom bağlanma bölgeleri ekleyerek genin yüksek seviyede ifade edilmesini sağlar.



# Yapay Gen Tasarımı ile Klonlama

- Küçük proteinler için genin baştan sona yapay olarak sentezlenmesi mümkündür.
- Bazı memeli proteinleri büyük öncü proteinlerden proteolitik işleme üretildiğinden, doğrudan aktif formu kodlayan kısa genlerin tasarlanması avantaj sağlar.
- Yapay genler intronsuz oldukları için ek RNA işleme basamaklarına ihtiyaç duymaz.
- Ayrıca promotörler, düzenleyici diziler ve konak uyumlu kodon kullanımı gen dizisine baştan itibaren eklenebilir.

# Protein Stabilitesi ve Ekspresyon Sonrası Sorunlar

- Yeni bir konak hücrede sentezlenen proteinler bazen proteazlarca parçalanmaya ya da konağa toksik etki göstermeye yatkın olabilir.
- Aşırı üretim durumlarında bazı proteinler çözünmeyen agregalar oluşturarak inklüzyon cisimciklerine dönüşebilir.
- İnküzyonlar kolayca saflaştırılabilir de içerdikleri protein genellikle zor çözünür ve kısmen denatüre olabilir.
- Bu nedenle protein stabilitesi ve çözünübilirliğine ilişkin sorunlar üretim ve saflaştırmayı önemli ölçüde etkileyebilir.

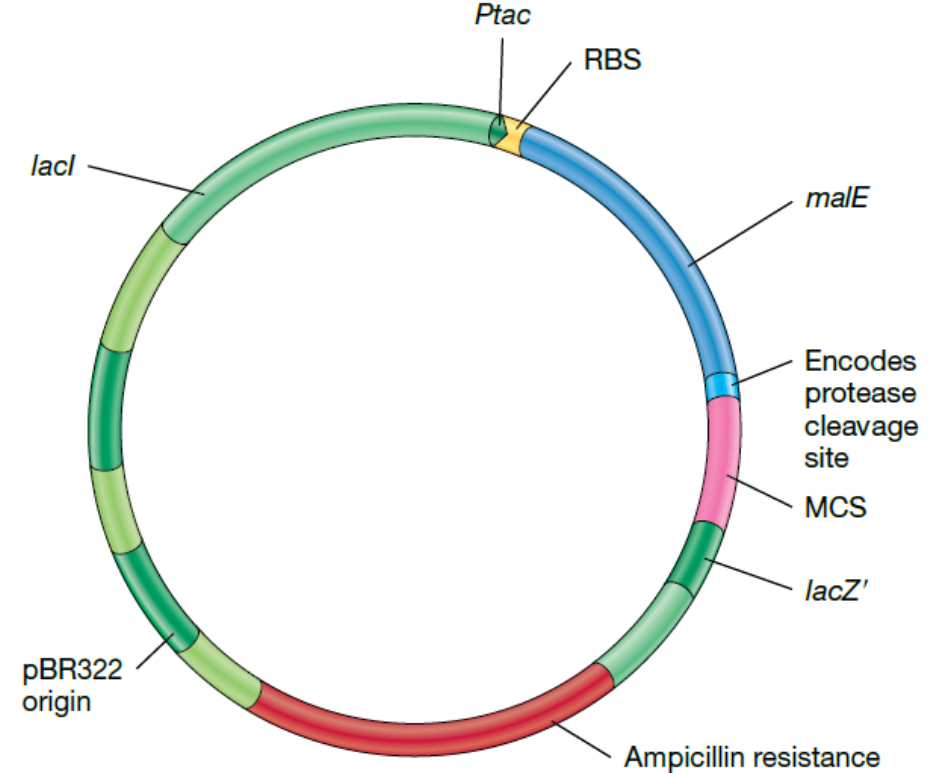


# Füzyon Proteinleri ile Saflaştırmanın Kolaylaştırılması

- Protein saflaştırması, hedef proteinin vektörde kodlanan bir taşıyıcı proteinle füzyon hâlinde üretilmesiyle önemli ölçüde kolaylaşır.
- Bu amaçla iki gen birleştirilerek tek bir okuma çerçevesi hâline getirilir ve araya ticari bir proteaz tarafından tanınan kısa bir kesim bölgesi eklenir.
- Transkripsiyon ve translasyondan sonra tek bir füzyon proteini üretilir ve saflaştırma taşıyıcı proteine özgü yöntemlerle yapılır.
- Proteaz uygulaması, saflaştırılmış füzyon proteinini ikiye ayırarak hedef proteinin taşıyıcıdan serbest kalmasını sağlar.

# Taşıyıcı Protein Seçiminin Avantajları

- Taşıyıcı protein, inklüzyon oluşturmayan ve kolay saflaştırılabilen bir protein türünden seçildiğinde hedef proteinin elde edilmesi daha verimli olur.
- Çeşitli füzyon vektörleri mevcuttur ve yandaki figür bu vektörlerden aynı zamanda ekspresyon vektörü olan bir örneği göstermektedir.
- Bu örnekte taşıyıcı protein, maltoza yüksek afinitesi nedeniyle kolay saflaştırılan *E. coli* maltoz-bağlama proteinidir (malE).
- Füzyon yapısının kesilmesiyle hedef protein elde edilir ve bu yöntem zaman, maliyet ve emek açısından önemli tasarruflar sağlar.



# Sinyal Dizisi İçeren Taşıyıcı Proteinlerin Sağladığı Ek Avantajlar

- Taşıyıcı protein, hidrofobik amino asitlerce zengin bakteriyel sinyal dizisini içerdiğinde protein sitoplazmik zar üzerinden taşınabilir.
- Bu özellik, bakteriyel sistemlerin memeli proteinlerini yalnızca üretmekle kalmayıp aynı zamanda hücre dışına salgılamasını mümkün kılar.
- Böyle bir sistemde hedef protein diğer salgılanan proteinlerden, maltoz-bağlama proteinine özgü bağlanma reçineleriyle kolayca ayrıştırılabilir.
- Bu nedenle taşıyıcı proteinler, istenen ürüne ulaşmak için kullanılan stratejilerde hem verim hem de pratiklik sağlar.

# Mutagenез Yöntemlerine Genel Bakış

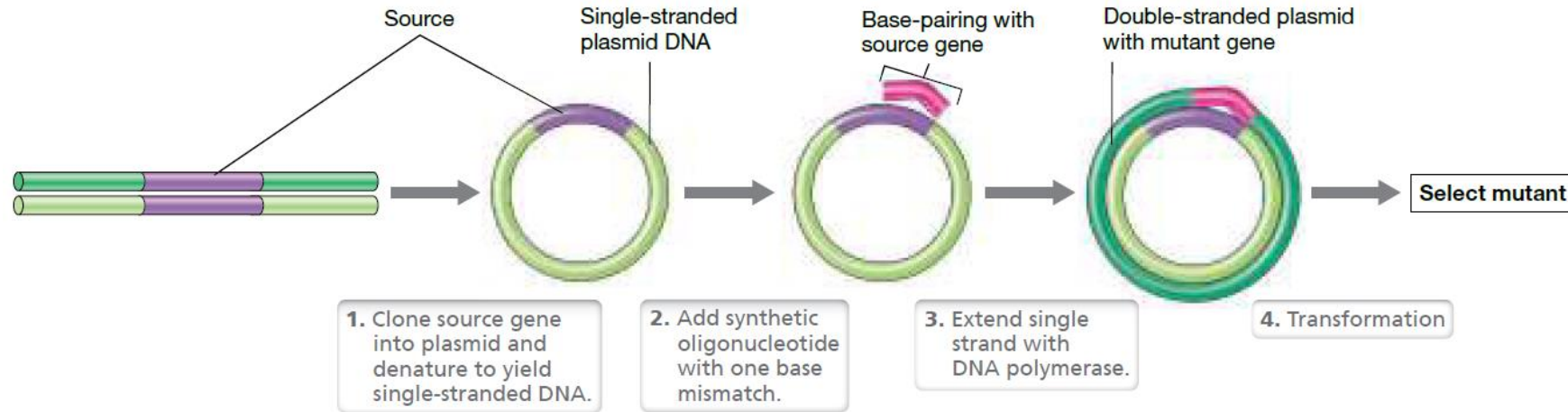
- Konvansiyonel mutajenler mutasyonları canlı organizmanın bütün DNA'sında rastgele oluştururken site-directed mutagenез mutasyonları tam belirlenmiş konumlarda oluşturur.
- Bu teknik, genlere yalnızca birkaç baz eklemek veya çıkarmakla değil büyük DNA parçalarını belirlenmiş noktalara yerleştirmekle de kullanılabilir.
- Site-directed mutagenез, sentetik DNA ve klonlama tekniklerinden yararlanarak mutasyonların kontrollü biçimde yapılmasını sağlar.
- Böylece araştırmacılar genlerin ve proteinlerin yapı-işlev ilişkilerini hassas noktalarda inceleme imkânı bulur.

# Site-Directed Mutagenez İçin Oligonükleotidler

- Bu yöntemde gerekli kısa DNA dizileri (oligonükleotidler) kimyasal olarak sentezlenir ve PCR ile hibridizasyonda primer veya prob olarak kullanılabilir.
- Uzunluğu 12–40 baz arasında olan oligonükleotidler ucuz ve yaygın olarak bulunurken gerektiğinde 100 bazdan uzun diziler de sentezlenebilir.
- Bu teknik, belirli bir gendeki herhangi bir baz çiftinin hedeflenerek değiştirilebilmesine imkân verir.
- Mutasyon içeren gen ifade edildiğinde amino asit dizisi değişmiş bir protein elde edilir ve bu da belirli amino asitlerin işlevsel önemini test etmeyi sağlar.

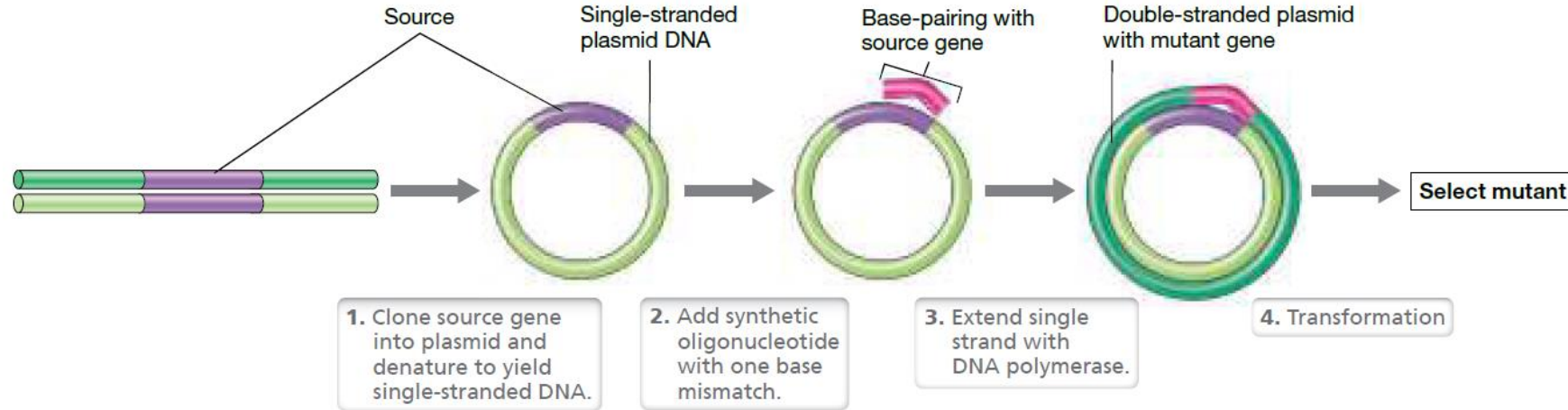
# Mutagenез Süreci

- Bir süreçte, klonlanmış hedef gen tek zincirli hâle getirilir ve tek baz uyumsuzluğu taşıyan mutagenез oligonükleotidiyle hibritleşmesi sağlanır.
- DNA polimeraz senteziyle oluşan tamamlayıcı zincirde mutasyon taşınır ve bu vektör konak hücreye aktarıldığında yarı-korunumlu replikasyon gerçekleşir.



# Mutagenез Süreci

- Bölünme sonrası oluşan iki kardeş hücreden biri mutasyonu taşıırken diğeri yabancı tip hâlinde kalır.
- Ardından, mutasyonu taşıyan kolonilerin belirlenmesi için tarama yapılır.



# PCR Tabanlı Site-Directed Mutagenez

- PCR yönteminde mutasyon içeren kısa oligonükleotid, hedef DNA'ya ortadaki uyumsuzluğu içerecek şekilde bağlanacak biçimde primer olarak tasarlanır.
- Primerin, bağlanmanın stabil olabilmesi için uyumsuzluğun her iki yanında yeterli sayıda eşleşen nükleotid bulunması gerekir.
- Mutant primer normal bir primerle birlikte kullanıldığında PCR amplifikasyonu sırasında mutasyon DNA ürününe dâhil edilir.
- Böylece PCR, mutasyonun hedef diziye doğrudan yerleştirilmesini sağlayan güçlü bir araç olarak kullanılabilir.



# Site-Directed Mutagenezin Uygulamaları

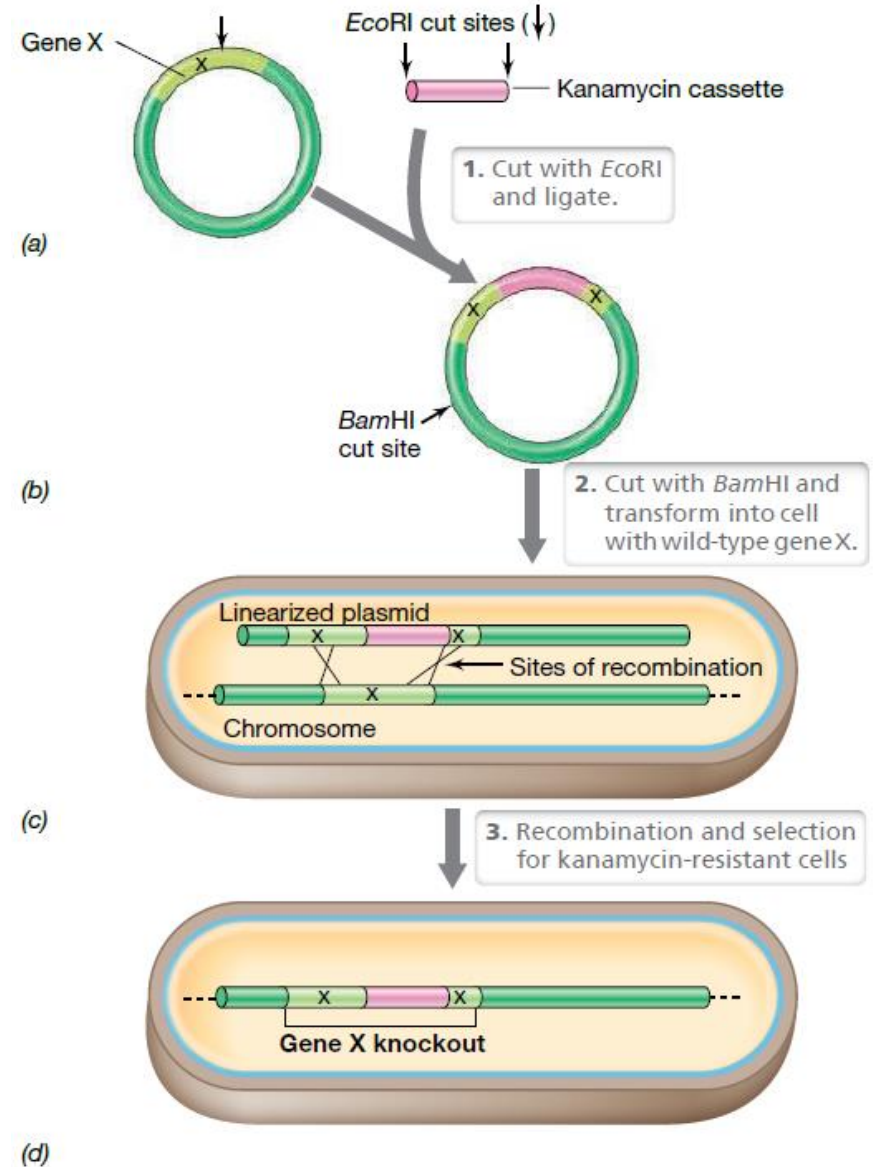
- Enzimologlar, mutant genin kodladığı enzimi özgün enzimi sentezleyemeyen bir konak hücreye aktararak yalnızca mutant enzimin aktivitesini değerlendirebilir.
- Bu yaklaşım, kataliz, direnç, duyarlılık ve protein–protein etkileşimleri gibi özelliklerin belirli amino asitlerle ilişkisini açığa çıkarmayı mümkün kılar.
- Site-directed mutagenez, enzimlerin işlevsel bölgelerini anlamada güçlü bir deneysel strateji sunar.
- Genetik mühendisliğinde ise bu yöntem özel proteinlerin özelliklerini iyileştirmek amacıyla sıklıkla kullanılmıştır.

# DNA Kasetlerinin Temel Mantığı

- Bir genin belirli bölgelerini değiştirmek veya daha geniş diziler eklemek için sentetik DNA kasetleri kullanılır.
- Bu kasetler polimeraz zincir reaksiyonu veya doğrudan DNA senteziyle üretilebilir ve hedef DNA'daki özgül restriksiyon bölgeleri aracılığıyla yer değiştirir.
- Uygun restriksiyon bölgesi yoksa, istenen konuma bu bölge site-directed mutagenезle eklenebilir.
- Yerine geçecek kasetler genellikle yabancı tip DNA parçasıyla aynı boyutta olacak şekilde tasarlanır.

# Gen Bozma (Gene Disruption) Yönteminin Temeli

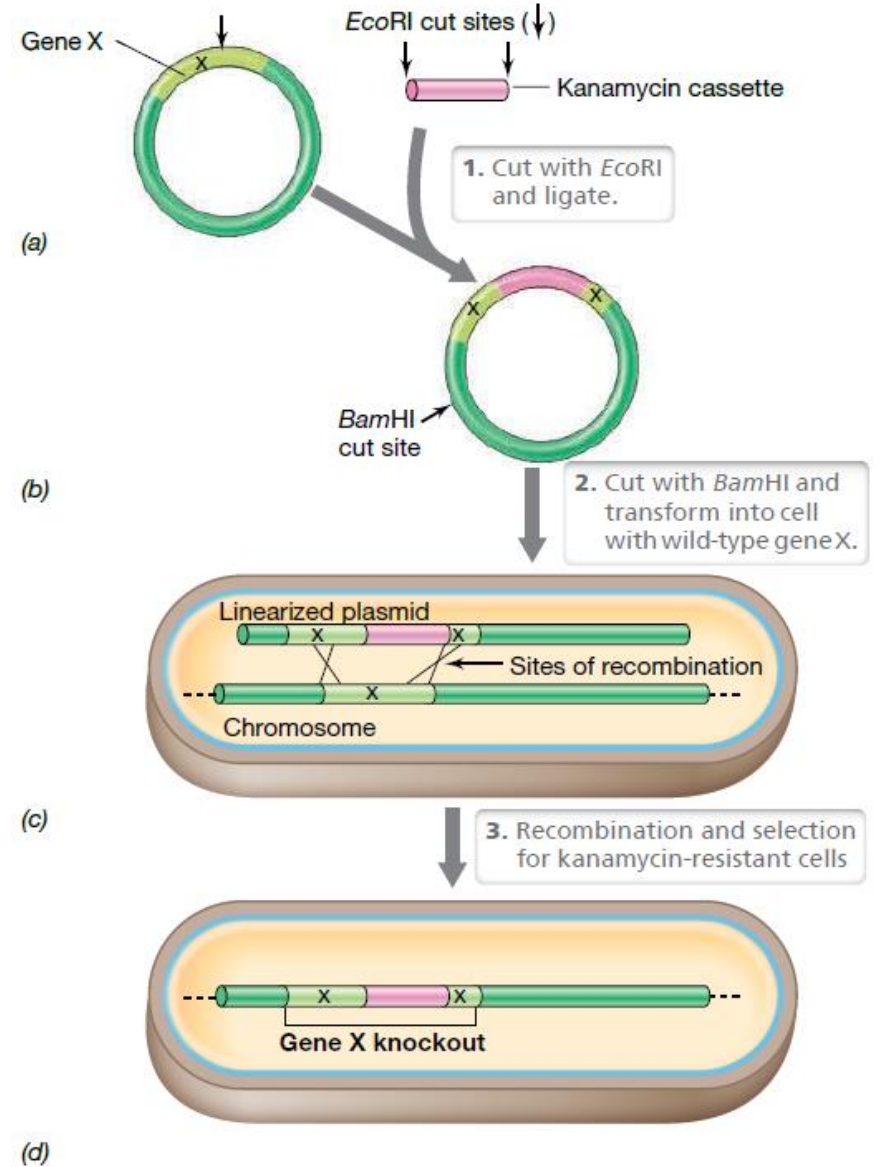
- Gen bozma tekniğinde kasetler genin ortasına yerleştirilerek ilgili kodlama dizisi fiziksel olarak kesintiye uğratılır.
- Bu yöntemle kullanılan kasetler hemen her boyutta olabilir ve hatta başlı başına bir gen bile taşıyabilir.
- Seçimde kolaylık sağlamak amacıyla çoğu kaset antibiyotik direnci genleri içerir.
- Böylece kaset gen içine girdiğinde hem ilgili genin işlevi kaybolur hem de hücre antibiyotik direncini kazanır.





# Bir Genin Kasetle Bozulmasının Uygulanması

- Örneğin, kanamisin direnci sağlayan bir gen içeren kaset, klonlanmış bir gene ait restriksiyon bölgesine yerleştirilir.
- Daha sonra vektör farklı bir enzimle kesilerek halkasal formdan doğrusal forma dönüştürülür.
- Doğrusal DNA hücreye aktarıldığında çoğalamaz ve kanamisin dirençli hücreler çoğunlukla homolog rekombinasyonla oluşur.
- Bu süreçte bozulmuş gen, kromozomdaki yabancı tip genin yerini alarak mutasyonun sabitlenmesini sağlar.



# Knockout Mutasyonlarının Biyolojik Kullanımı

- Bir kaset yerleştirildiğinde hücre, ilgili gen işlevini kaybettiği için bu tip mutasyonlara knockout mutasyonu adı verilir.
- Knockout mutasyonları transpozonla yapılan ekleme mutasyonlarına benzer olsa da burada mutasyona uğratılacak gen araştırmacı tarafından seçilir.
- Haploid organizmalarda yalnızca temel olmayan genler bozulduğunda canlı hücreler elde edilebilir.
- Bu nedenle knockout mutasyonları, bir genin yaşamsal olup olmadığını belirlemede yaygın olarak kullanılır.

# Raportör Genlerin Ortaya Çıkışı

- DNA manipölasyon teknikleri gen ekspresyonunun incelenmesinde devrim yaratmış ve raportör gen füzyonları bu süreçte önemli bir araç olmuştur.
- Bir raportör gen füzyonunda, bir kaynaktan gelen kodlama dizisi, başka bir kaynaktan gelen düzenleyici bölgeye bağlanır ve hibrit bir gen oluşturulur.
- Böylece farklı koşullar altında düzenleyicinin algıladığı sinyaller, raportör gen ürününün ölçümüyle takip edilir.
- Raportör genin temel özelliği, ürününün kolayca saptanabilir ve ölçülebilir olmasıdır.

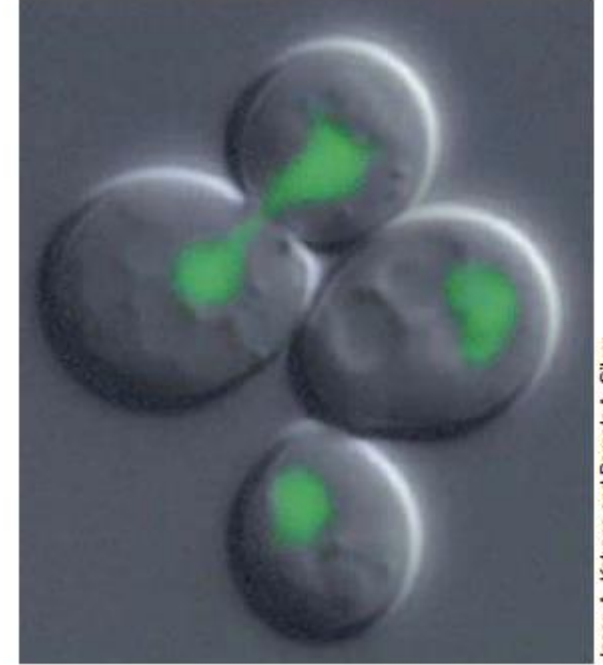
# Raportör Genlerin Kullanım Alanları

- Raportör genler plazmidin varlığını ya da DNA parçasının vektöre yerleşip yerleşmediğini göstermek için kullanılabilir.
- Ayrıca başka genlerin kodlama bölgelerine veya promotörlerine bağlanarak ilgili genlerin ifade düzeylerinin çalışılmasına imkân sağlar.
- İlk yaygın kullanılan raportör gen, *E. coli*'nin laktoz katabolizmasında görev alan lacZ genidir.
- lacZ ifade eden hücreler, X-gal içeren ortamlarda  $\beta$ -galaktozidazın substratı parçalama etkisiyle mavi renk oluşturarak kolayca tanınır.



# GFP'nin Raportör Olarak Yaygın Kullanımı

- Yeşil floresan protein (GFP) günümüzde en yaygın kullanılan raportörlerden biridir.
- *Aequorea victoria* adlı denizanasından klonlanan GFP, çoğu hücrede stabil olarak ifade edilir ve metabolizmayı bozmadan floresan sinyal üretir.
- Bir genin ifadesi GFP'ye bağlandığında, GFP'nin parlaması ilgili genin de ifade edildiğini gösterir.
- GFP'den sonra farklı renklerde çok sayıda floresan protein geliştirilmiş ve çeşitli çalışmalar için raportör olarak kullanılmaya başlanmıştır.

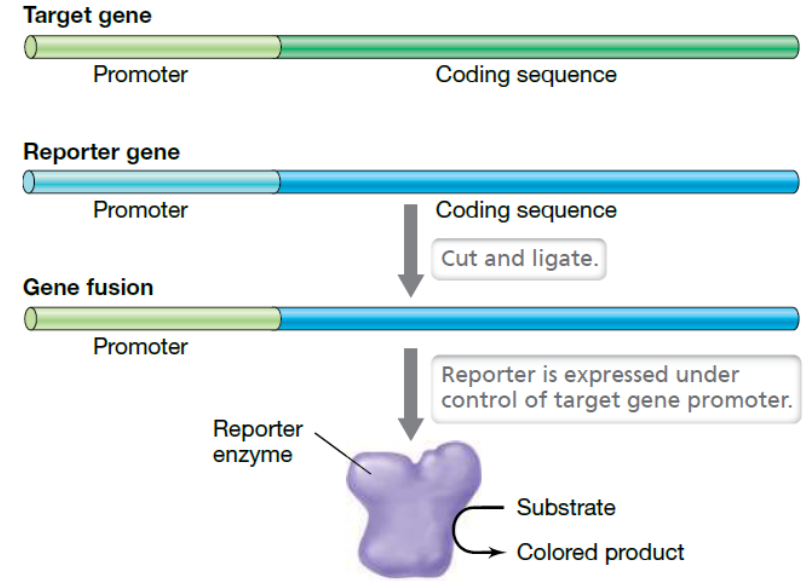


# Gen Füzyonlarının Yapısı ve Türleri

- Gen füzyonları, iki farklı gene ait dizilerin bir araya getirilmesiyle oluşturulan genetik yapılardır.
- Bir genin promotörü çıkarıldığında, bu kodlama dizisi farklı bir düzenleyiciye bağlanarak gen yeni bir promotör kontrolüne alınabilir.
- Alternatif olarak bir promotör bölgesi, ürününün kolay ölçülebileceği bir gene bağlanabilir.
- Operon füzyonlarında kodlama dizisi kendi translasyon sinyallerini korur; protein füzyonlarında ise iki gen birleşerek ortak başlangıç ve bitiş sinyallerine sahip tek bir hibrit protein oluşturur.

# Gen Füzyonlarının Düzenleyici Mekanizmaları İncelemedeki Rolü

- Gen füzyonları, doğal gen ürününün ölçülmesinin zor veya maliyetli olduğu durumlarda gen düzenlenmesini incelemek için ideal araçlardır.
- Hedef genin düzenleyici bölgesi,  $\beta$ -galaktozidaz veya GFP gibi bir raportörle birleştirilerek ilgili koşullar altında ifade düzeyleri izlenir.
- Transkripsiyonel kontrol, ilgilenilen genin transkripsiyon başlangıç sinyallerinin raporlayıcı gene bağlanmasıyla; translasyonel kontrol ise translasyon başlangıç sinyallerinin raportöre eklenmesiyle incelenir.
- Bu yaklaşım, araştırmacıların bir genin hangi koşullarda ve nasıl düzenlendiğini sistematik biçimde belirlemesine olanak tanır.



# Düzenleyici Gen Mutasyonlarının Füzyonlar Üzerinden Analizi

- Düzenleyici genlerde oluşturulan mutasyonlar, füzyon genleri taşıyan hücrelere aktarılarak ilgili genin ifadesi üzerindeki etkileri test edilir.
- Bu sayede, hedef genin kontrolünde rol oynadığı düşünülen çok sayıda düzenleyici gen hızlı biçimde taranabilir.
- Raportör füzyonlar yalnızca gen ifadesini izlemek için değil, aynı zamanda bazı proteinlerin saflaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla da kullanılabilir.
- Böylece hem fonksiyonel hem de yapısal çalışmalar için geniş bir araştırma imkânı sunulur.

# Transgenik Mikroorganizmalardan Ürün Elde Edilmesi

- Genetik mühendisliği, mikroorganizmaları yakıtlar, kimyasallar, ilaçlar ve hormonlar gibi değerli ürünlerin üretildiği küçük biyolojik fabrikalara dönüştürebilen güçlü bir biyoteknoloji aracıdır.
- Buraya kadar DNA'nın manipülasyonu, klonlanması ve ifade ettirilmesi için kullanılan teknikleri ele almışken, bu kısımda bu tekniklerin değerli proteinlerin, genetiği değiştirilmiş canlıların, aşıların ve metabolik yolların üretiminde nasıl uygulandığını göreceğiz.
- Biyoteknoloji sayesinde mikroorganizmaların yüksek verimle ürün üretebilmesi, birçok tıbbi ve endüstriyel uygulamanın temelini oluşturur.
- Bu nedenle genetik mühendisliği, modern biyoteknolojinin ekonomik olarak önemli bir bileşeni hâline gelmiştir.



# Memeli Proteinlerinin Mikrobiyal Üretimdeki Ekonomik Önemi

- Memeli proteinleri genellikle dokularda düşük miktarlarda bulunduğu için saflaştırılmaları oldukça maliyetlidir ve bu da onların biyoteknolojik üretimini ekonomik açıdan değerli kılar.
- Hücre kültürüyle bu proteinlerin üretilmesi mümkün olsa da, mikrobiyal kültürlerle kıyasla çok daha zor ve pahalı bir yöntemdir.
- Bu nedenle biyoteknoloji sektörü, birçok farklı memeli proteinini yüksek verimle üretebilen genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar geliştirmiştir.
- Böylece hem tıbbi uygulamalar için protein arzı artmış hem de maliyetler önemli ölçüde azalmıştır.

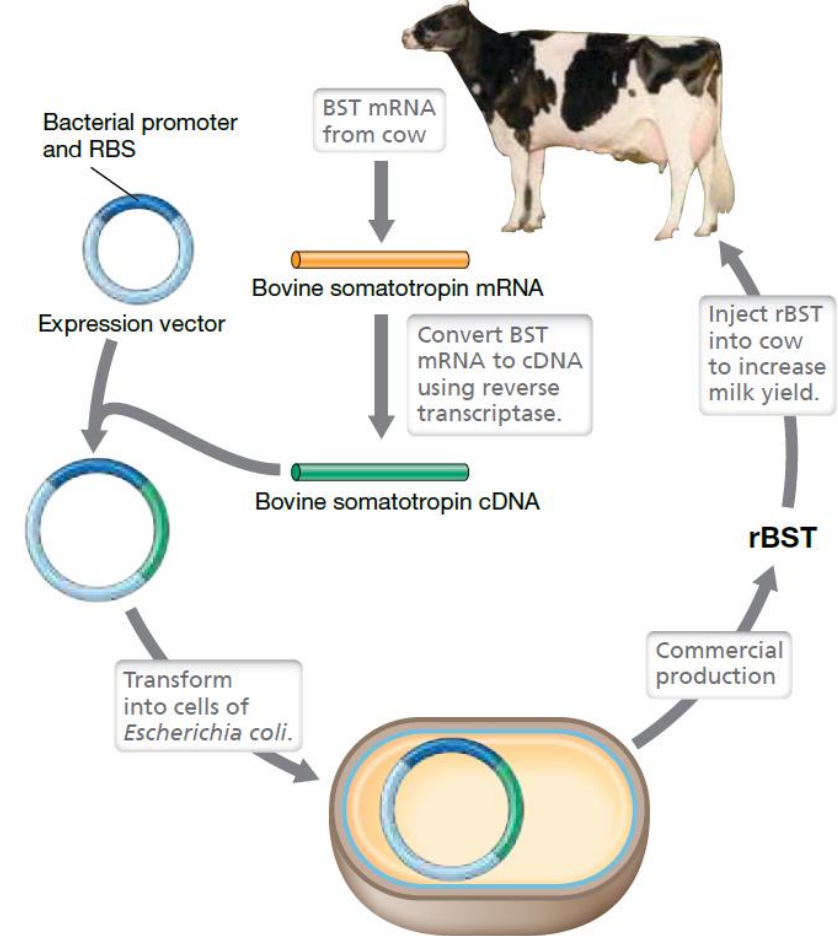
# Somatotropin: Tek Zincirli Bir İnsan Hormonu

- İnsan somatotropini (büyüme hormonu), tek bir polipeptitten oluştuğu için genetik mühendisliği açısından insülinde daha basit bir örnek sunar.
- Somatotropin eksikliği kalıtsal cüceliğe yol açtığından, bakterilerde üretilen rekombinant somatotropin çocuklarda büyüme geriliğinin tedavisinde kullanılmaktadır.
- Ancak bazı cücelik türleri somatotropin reseptör eksikliğinden kaynaklandığından, bu vakalarda hormon tedavisi etkisiz kalır.
- İnsan somatotropin geninin klonlanması ve bakterilerde başarıyla ifade edilmesi, hormonu tıbbi bir ürün olarak geniş ölçekte erişilebilir hâle getirmiştir.



# Somatotropin Geninin Klonlanması ve Proteaz Sorununun Aşılması

- İnsan somatotropin geni, mRNA'dan oluşturulan cDNA olarak klonlanmıştır.
- cDNA, daha sonra bakteriyel bir ekspresyon vektöründe ifade ettirilerek fonksiyonel hormon üretimi sağlanmıştır.
- Kısa polipeptid hormonların proteazlarla kolayca parçalanması bir sorun olsa da, proteaz içermeyen bakteri suşlarının kullanılmasıyla bu problem giderilmiştir.
- Bugün rekombinant büyüme hormonu enjeksiyonla uygulanmakta ve kısa boy gelişimine neden olan çeşitli sendromlarda binlerce çocuğun tedavisinde başarılı sonuçlar vermektedir.

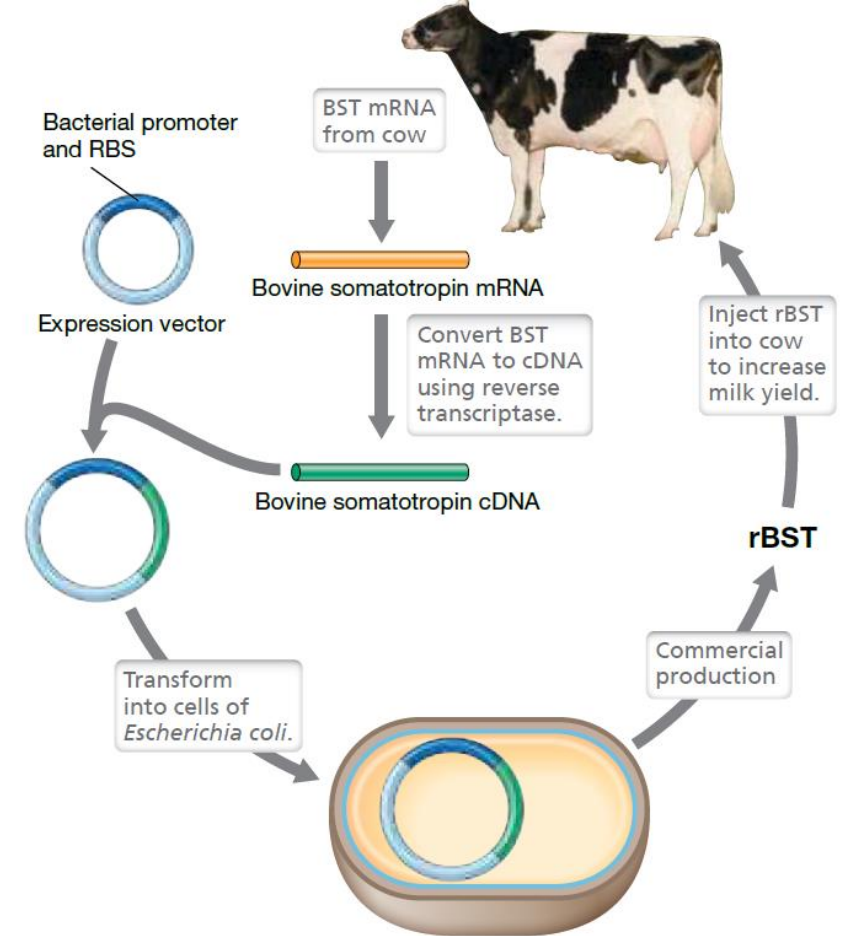


# Somatotropinin Kullanım Alanları ve Spor Dünyasındaki Durumu

- Rekombinant somatotropin yetişkinlerde bazı doku atrofisi vakalarında kullanılabilse de bu yaygın bir tedavi yöntemi değildir.
- Hormonun performans artırıcı etkileri iddiası nedeniyle Uluslararası Olimpiyat Komitesi ve bazı profesyonel spor ligleri tarafından kullanımı yasaklanmıştır.
- Bu durum, rekombinant hormonların tıbbi kullanımının yanı sıra etik ve düzenleyici boyutlarının da dikkate alınması gerektiğini gösterir.
- Somatotropin tedavisinin etkisi, altta yatan biyolojik nedenlere göre büyük ölçüde değişiklik gösterebilir.

# Rekombinant Sığır Somatotropini (rBST) ve Süt Verimi

- Rekombinant sığır somatotropini (rBST), süt sığırlarında süt üretimini artırmak amacıyla kullanılmaktadır.
- rBST enjeksiyonu ineklerin büyümesini artırmaz, ancak prolaktin reseptörüne bağlanarak süt üretimini uyarır.
- Somatotropinin biri büyümeyi, diğeri süt üretimini tetikleyen iki farklı bağlanma bölgesi bulunduğu için bu etki ortaya çıkar.
- Ancak insan somatotropini tedavilerinde prolaktin aktivitesinin yan etkilerinden kaçınmak için hedef bağlanma bölgeleri site-directed mutagenез ile değiştirilmiştir.



# Somatotropinin Özelleştirilmesi ve Daha Etkili İlaç Tasarımı

- İnsan somatotropininin prolaktin reseptörüne bağlanan amino asitleri değiştirilerek hormonun yalnızca büyüme hedefli etkisi korunmuştur.
- Bu örnek, doğal hormonların sadece üretilmekle kalmayıp özgüllüklerinin ve aktivitelerinin de iyileştirilebildiğini gösterir.
- Genetik mühendisliği sayesinde daha güvenli ve daha etkili farmasötik ürünler tasarlanabilmektedir.
- Böylece biyoteknolojik yaklaşım, tedavide hedefe yönelik ve kişiselleştirilmiş çözümler geliştirmeye olanak tanır.

# Diğer Memeli Proteinlerinin Üretimi ve Tıbbi Kullanımı

- Günümüzde birçok memeli proteini, genetik mühendisliği sayesinde mikrobiyal sistemlerde üretilmekte.
- Bu proteinler arasında çeşitli hormonlar ve kan pıhtılaşmasıyla ilişkili önemli kan proteinleri bulunur.
- Örneğin doku plazminojen aktivatörü (TPA), iyileşme sürecinin sonunda oluşabilecek kan pıhtılarını çözmek için kullanılır.
- Kardiyovasküler hastalıkların yaygın olduğu toplumlarda TPA'nın mikrobiyal üretimi, tedaviye hızlı erişim açısından büyük önem taşır.

# Kan Pıhtılaşma Faktörleri ve Hemofili Tedavisi

- Pıhtılaşma faktörleri VII, VIII ve IX, kan pıhtısının oluşumu için kritik proteinlerdir ve eksiklikleri hemofiliye yol açar.
- Hemofili hastaları bu eksikliği gidermek için mikrobiyal kaynaklı rekombinant pıhtılaşma faktörleriyle güvenli şekilde tedavi edilebilir.
- Geçmişte stok insan kanından elde edilen faktörler HIV ve hepatit C gibi virüslerle kontamine olabildiği için ciddi enfeksiyon riskleri taşımaktaydı.
- Rekombinant DNA teknolojisi bu riskleri ortadan kaldırarak hemofili tedavisini güvenilir hâle getirmiştir.

# Genetik Mühendisliği ile Üretilen Diğer Enzimler: DNaz I Örneği

- Bazı memeli proteinleri hormon değil enzimdir ve bunlar da genetik mühendisliği ile üretilir.
- İnsan DNaz I enzimi, kistik fibrozis hastalarının akciğerlerinde biriken DNA içeren yoğun mukusu parçalamak için kullanılmaktadır.
- Kistik fibrozisli bireylerde *Pseudomonas aeruginosa* enfeksiyonu sık görülür ve bakteriler akciğerlerde biyofilm oluşturarak tedaviyi zorlaştırır.
- Bakteriler lizis olduğunda açığa çıkan DNA mukusu daha da yoğunlaştığından, DNaz bu DNA'yı parçalayarak solunumu kolaylaştırır.



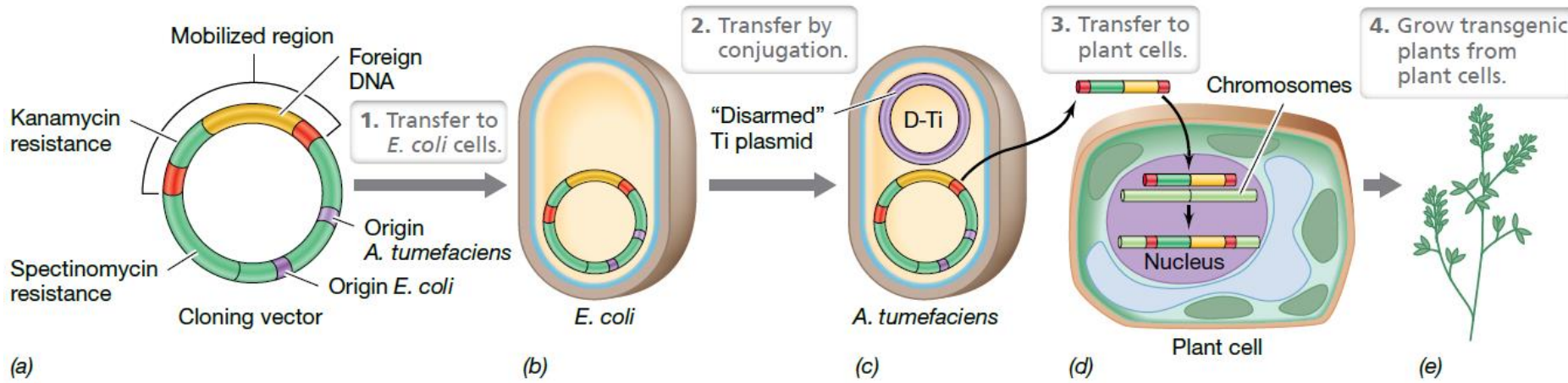
# Transgenik Organizmalara Genel Bakış

- Bitki ve hayvanların geleneksel ıslah yöntemleriyle geliştirilmesi uzun bir geçmişe sahipken, rekombinant DNA teknolojisi bu alanda köklü değişiklikler yaratmıştır.
- Yüksek organizmaların genetik mühendisliği mikrobiyolojinin doğrudan alanı olmasa da, DNA'nın bakteriler ve plazmitler kullanılarak manipüle edilmesi bu sürecin temelini oluşturur.
- Başka bir organizmadan gen taşıyan canlılara transgenik organizmalar denir ve kamuoyunda bunlar genellikle GDO olarak bilinir.



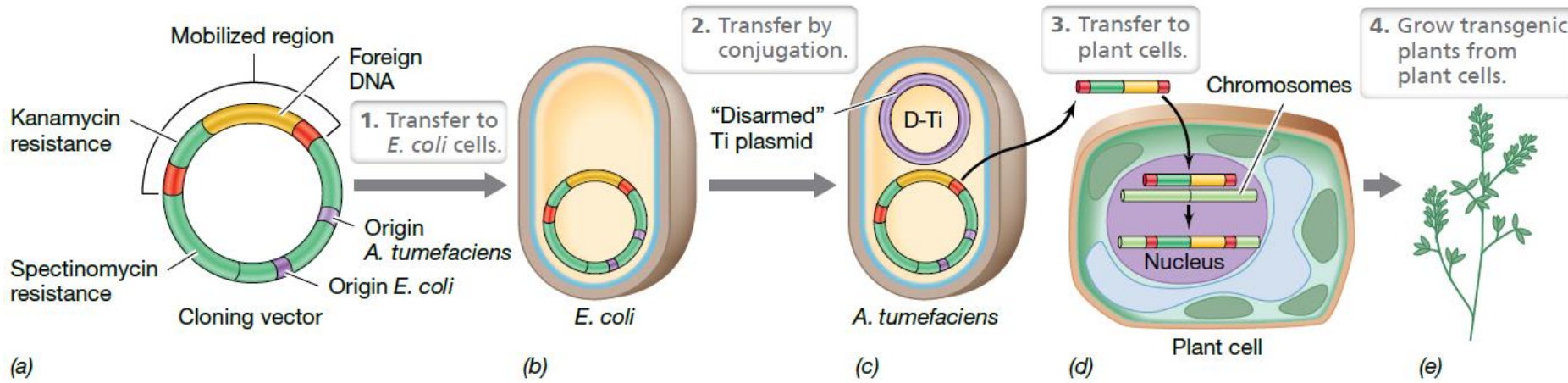
# Ti Plazmidi ve Bitkilere Gen Aktarımı

- Rekombinant DNA'nın bitki hücrelerine aktarımı elektroporasyon veya transfeksiyonla yapılabilse de, *Agrobacterium tumefaciens*'in Ti plazmidi birçok bitki türü için doğrudan DNA transferi sağlayabilir.
- Ti plazmidi bakterinin virülansından sorumludur ve bitkiye aktarılan T-DNA adı verilen bir bölge içerir.



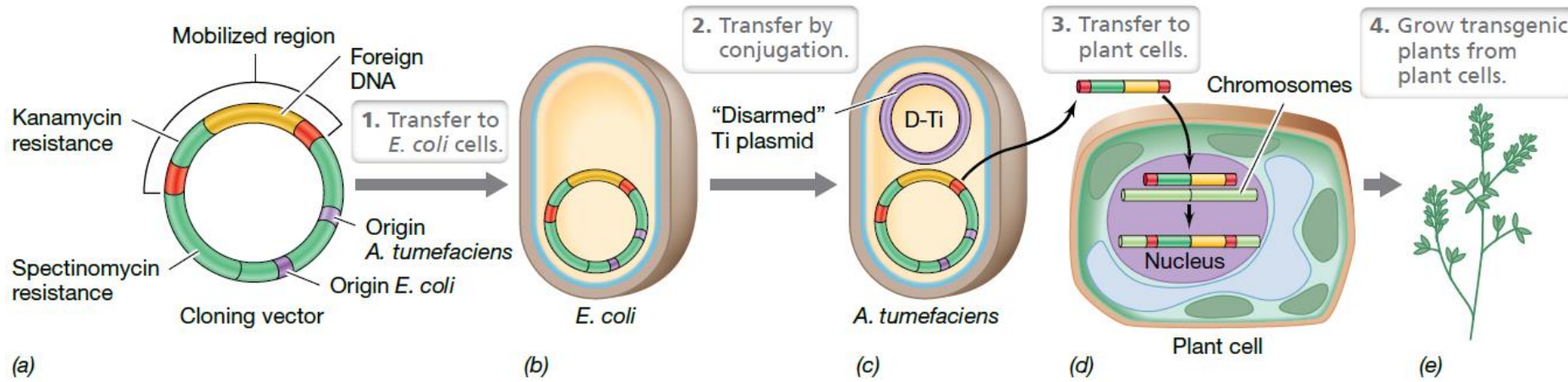
# Ti Plazmidi ve Bitkilere Gen Aktarımı

- T-DNA'nın uç kısımlarındaki diziler aktarım için gereklidir ve yabancı DNA'nın bu uçlar arasına yerleştirilmesi gerekir.
- *A. tumefaciens* enfeksiyonu sonucunda bitkide 'taç uru' hastalığı gelişir ve bu süreç plazmidin taşıdığı genlerle ilişkilidir.



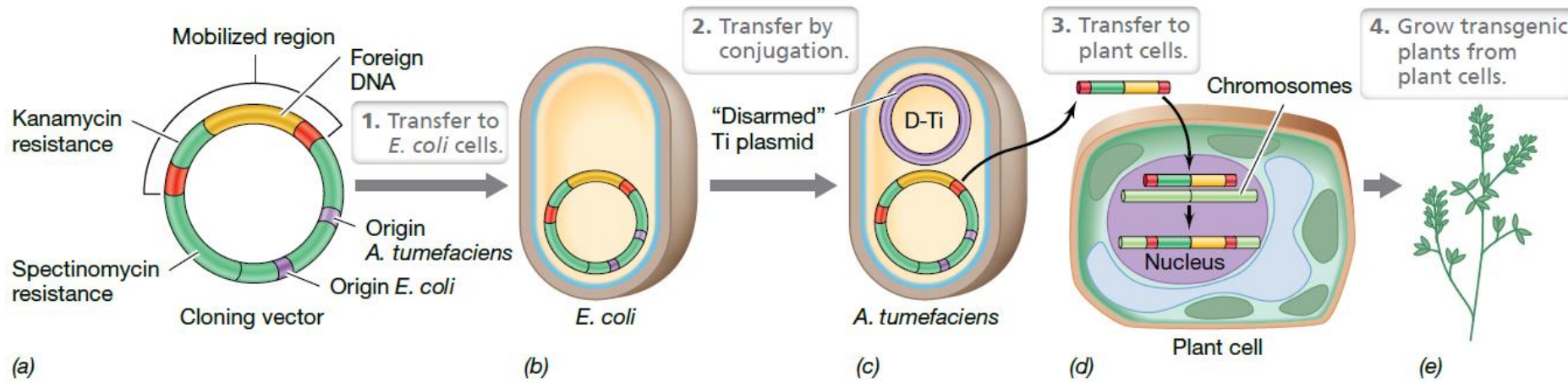
# İkili (Binary) Vektör Sistemi

- Bitkilere gen aktarımında yaygın kullanılan bir yöntem, klonlama vektörü ile yardımcı plazmidten oluşan iki plazmitli ikili vektör sistemidir.
- Klonlama vektörü, T-DNA'nın iki ucunu, çoklu klonlama bölgesini, hem *E. coli* hem *A. tumefaciens*'te çoğalabilmeyi sağlayan iki replikasyon orijinini ve bitki ile bakteride seçime olanak veren iki antibiyotik direnci genini taşır.



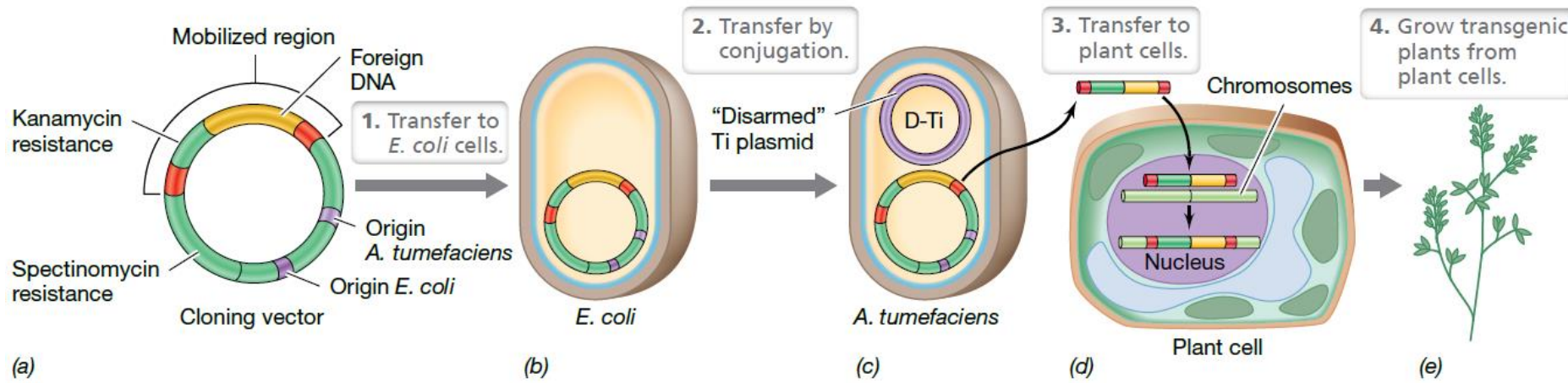
# İkili (Binary) Vektör Sistemi

- Yabancı DNA vektöre klonlandıktan sonra *E. coli*'ye aktarılır ve buradan konjugasyon yoluyla *A. tumefaciens*'e aktarılır.
- Bu klonlama vektörü T-DNA transferi için gerekli genleri taşımaz, ancak uygun bir yardımcı plazmidle bir araya geldiğinde T-DNA bitkiye aktarılabilir.



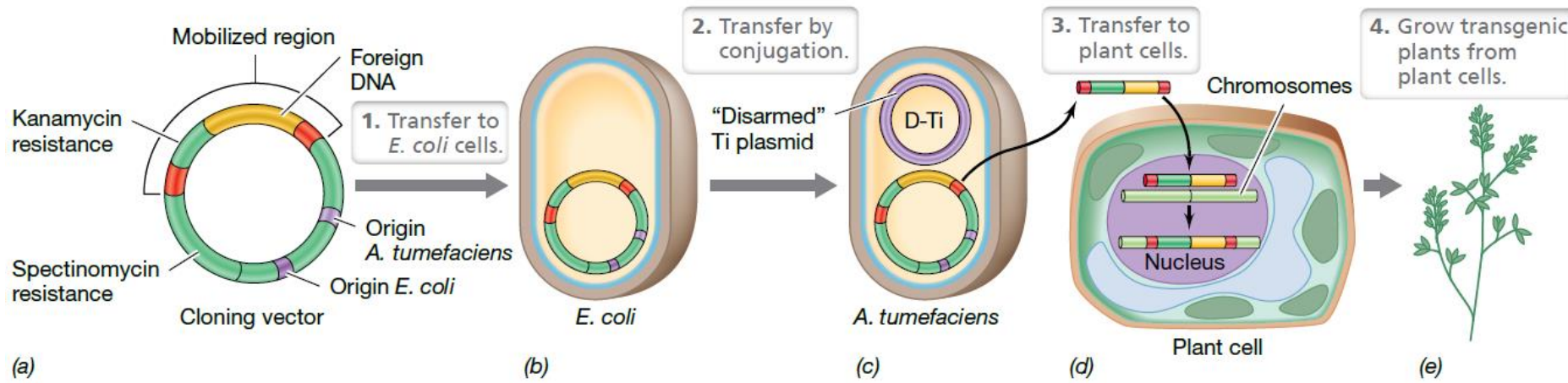
# Yardımcı Plazmid (D-Ti) ve T-DNA Transferi

- “Disarmed” D-Ti plazmidi, Ti plazmidinin vir bölgesini içerir ancak T-DNA’yı ve hastalık başlatan genleri içermez.
- D-Ti, klonlama vektöründeki T-DNA’nın mobilizasyonu için gerekli tüm işlevleri sağlar.



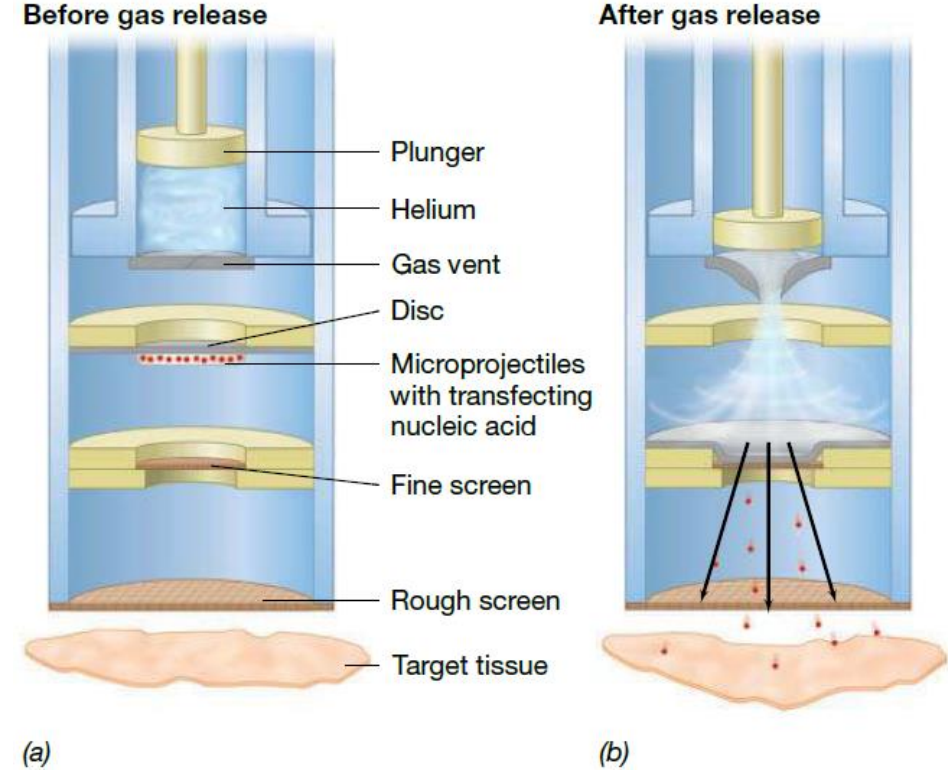
# Yardımcı Plazmid (D-Ti) ve T-DNA Transferi

- Klonlanmış DNA ve kanamisin direnci geni D-Ti tarafından mobilize edilerek bitki hücresine aktarılır ve hücre çekirdeğine girer (Figür d).
- Bitki kromozomuna entegre olan yabancı DNA ifade edilerek bitkiye yeni özellikler kazandırabilir.



# Ti Sistemi ile Elde Edilen Transgenik Bitkiler

- Ti plazmid sistemi, geniş yapraklı (dikotil) bitkilerde oldukça etkili çalışır ve domates, patates, tütün, soya fasulyesi, yonca ve pamuk gibi birçok önemli üründe kullanılmıştır.
- Bu yöntemle ceviz ve elma gibi bazı ağaç türlerinde de transgenik bireyler elde edilmiştir.
- Ti sistemi tahıllar gibi monokotil bitkilerde çalışmaz, bu nedenle bu gruplarda DNA aktarımı için mikroprojektil bombardımanı gibi alternatif yöntemler kullanılır.
- Bu farklı yöntemler sayesinde hem dikotil hem monokotil bitkilerde transgenik çeşitlerin geliştirilmesi mümkün olmuştur.



# Herbisit Dirençli Bitkilerin Geliştirilmesi

- Bitkilerde genetik iyileştirmenin hedef alanları arasında herbisit, böcek ve mikrobiyal hastalık direnci ile ürün kalitesinin artırılması yer alır.
- Günümüzde yaygın GM ürünleri arasında soya, mısır, pamuk ve kanola bulunur ve çoğu herbisite veya böceklere karşı dirençlidir.
- Herbisit direnci, bitkiyi öldüren bir enzimi hedef alan herbisitlere karşı koruma sağlamak amacıyla mühendislik yoluyla bitkiye yeni bir gen kazandırılmasıyla elde edilir.
- Örneğin glifosat bitkilerde aromatik aminoasit sentezinde görevli bir enzimi inhibe ederken, bu enzimin glifosata dirençli versiyonunu taşıyan transgenik bitkiler glifosat uygulamasından etkilenmez.



# Glifosat Direnci: *A. tumefaciens* Kaynaklı Gen

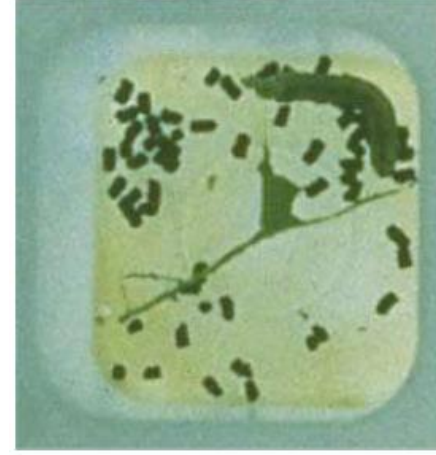
- Bazı bakterilerin eşdeğer enzimleri glifosat tarafından inhibe edilse de, mutasyonla glifosata dirençli enzim taşıyan bakteriler seçilmiştir.
- Bu dirençli enzimi kodlayan gen *A. tumefaciens*'ten klonlanmış, bitkide ifade edilebilmesi için düzenlenmiş ve soya gibi önemli ürünlere aktarılmıştır.
- Glifosat püskürtüldüğünde yabancı geni taşıyan bitkiler zarar görmezken, yabancı otlar etkili biçimde yok edilir.
- Bu nedenle herbisit dirençli soya fasulyesi Amerika Birleşik Devletleri'nde çok geniş alanlarda yetiştirilmektedir.



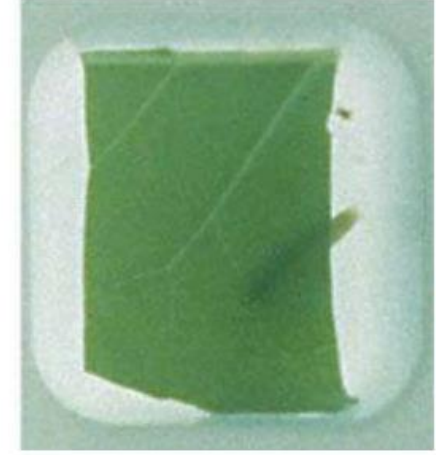
Stephen R. Padgett, Monsanto Company

# Böceklere Dayanıklı Transgenik Bitkiler

- Genetik mühendislik sayesinde belirli böcek türlerinin zararlarına karşı dayanıklı bitkiler geliştirilmiştir.
- En yaygın yaklaşım, *Bacillus thuringiensis*'in toksik kristal proteinlerini (Bt toksini) kodlayan genlerin bitkilere aktarılmasıdır.
- *B. thuringiensis* spor oluşumu sırasında çeşitli böceklere özgü birçok Bt toksini üretebilir ve bunlar kelebek, güve, böcek, sinek larvaları veya sivrisineklere karşı etkili olabilir.
- Bt transgeni genellikle doğrudan bitki genomuna yerleştirilir ve böylece bitki hedef zararlılara karşı kendi toksinini sürekli üretebilir.



(a)



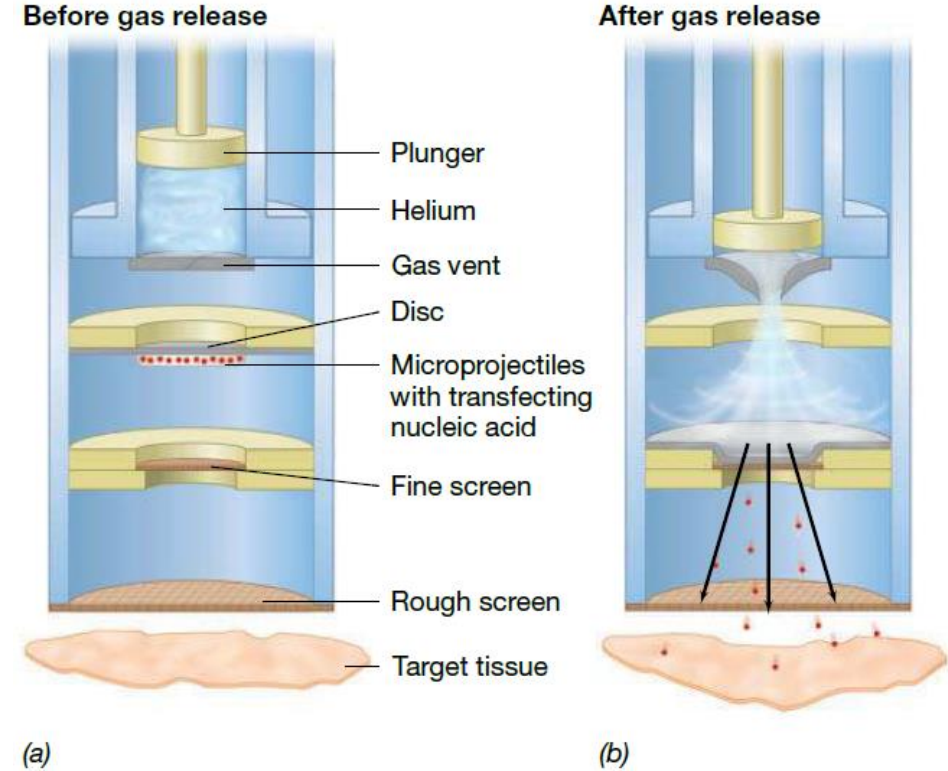
(b)

Kevin McBride, Calgene, Inc.



# Bt Toksini ile Bitki Koruması

- Doğal Bt toksin geni bir plazmit vektöre klonlanmış, kloroplast ribozomal RNA promotörü ile düzenlenmiş ve mikroprojektil bombardımanı yoluyla bütün kloroplastlarına aktarılmıştır.
- Bu teknikle elde edilen transgenik bitkiler, çeşitli böcek larvaları için son derece yüksek düzeyde toksin üretebilmiştir.
- Bt toksini böceğin sindirim sistemindeki özgül reseptöre bağlandığında yapısal bir değişiklik oluşur ve sindirim sisteminin bozulmasına yol açarak larvanın ölümünü tetikler.
- Bt toksini memelilerde parçalandığı ve özgül reseptörler memelilerde bulunmadığı için insanlar da dahil olmak üzere memeliler açısından zararsızdır.



# Transgenik Balıkların Ortaya Çıkışı

- Genetik mühendisliği, klonlanmış genlerin döllenmiş yumurtalara mikroenjeksiyonla aktarılması sayesinde birçok hayvan türünde yabancı genlerin ifade edilmesini mümkün kılar.
- Bu işlemde yabancı DNA, döllenmiş yumurtaların genomuna yerleşerek kalıcı bir genetik değişim oluşturur.
- Son yıllarda, özellikle tarımsal değeri yüksek çiftlik hayvanları ve balıklar verimliliği artırmak amacıyla genetik olarak değiştirilmiştir.

# AquaAdvantage Somonu: Hızlı Büyümenin Sırrı

- AquaBounty Technologies tarafından geliştirilen AquaAdvantage somonu, alışılmış türlerden daha büyük değildir, fakat satış boyutuna çok daha hızlı ulaşır.
- Normalde somonlarda büyüme hormonu geni ışığa bağlı olarak aktifleştiği için büyüme çoğunlukla yaz aylarında gerçekleşir.
- Genetik olarak değiştirilen somonda ise büyüme hormonu geninin promotörü, tüm yıl boyunca sabit hızda büyüyen başka bir balık türünden alınan promotörle değiştirilmiştir.
- Bu düzenleme sonucunda somon sürekli büyüme hormonu üretir ve böylece daha hızlı büyür.



Aqua Bounty Technologies

# AquAdvantage Somonunun Ticari Kullanımı

- Sürekli büyüyen transgenik somonlar, akuakültür işletmelerinde daha kısa sürede hasat edilebildikleri için ticari açıdan önemli avantaj sağlar.
- AquaBounty, hızlı büyüyen bu somonların dağıtımını için 1995 yılında FDA'ya başvurmuştur.
- Genetiği değiştirilmiş balık tüketimine yönelik risk tartışmalarının uzun sürmesi nedeniyle onay süreci yaklaşık yirmi yıl sürmüştür.
- 2015 yılında FDA tarafından nihai onayın verilmesiyle AquAdvantage somonu, GDO etiketi olmadan satışa sunulabilen ilk genetiği değiştirilmiş hayvan haline gelmiştir.



# Genetik Mühendislik ile Aşı ve Tedavi Üretimi

- Genetik mühendisliği, bazı aşıların ve tıbbi tedavi ürünlerinin üretiminde önemli rol oynar.
- Aşılar, vücuda enjekte edildiğinde hedef hastalığa karşı bağışıklık oluşturacak yanıtı tetikler.
- Pek çok patojen, hücrelere girip toksinler gibi virülans faktörleri salgılayarak hastalık yapar ve bu özellikler kanser hücrelerini hedeflemek üzere genetik olarak yeniden düzenlenebilir.

# Rekombinant ve Vektör Aşılarının Temelleri

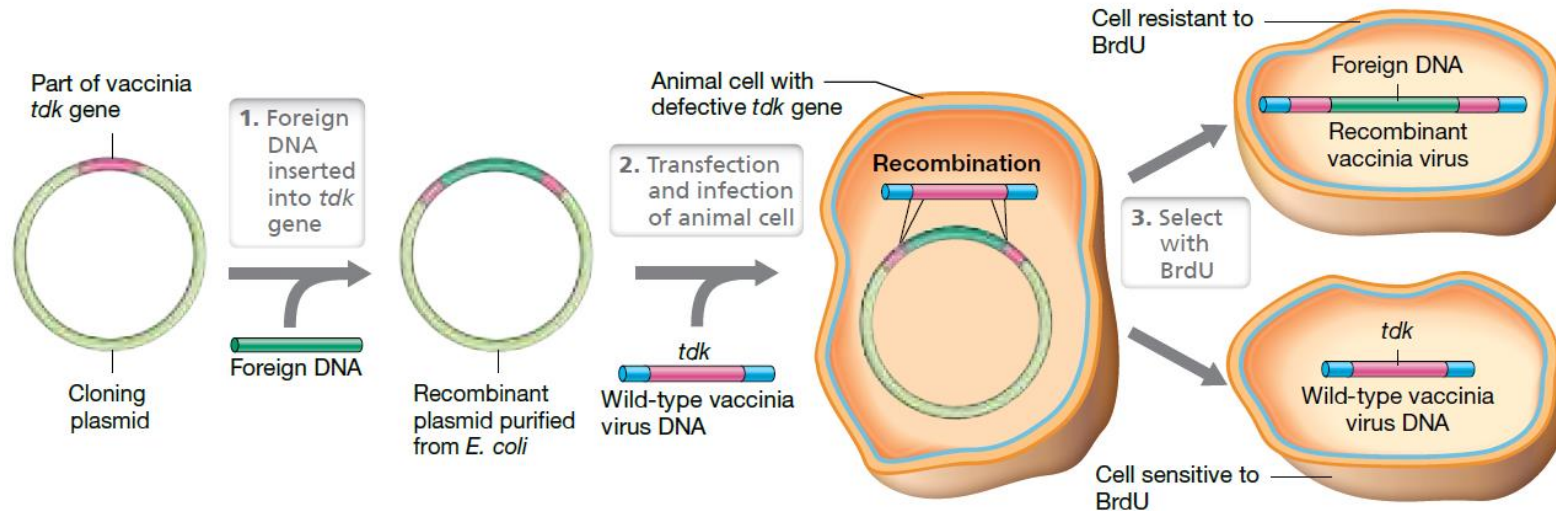
- Bir patojenin virülans genleri çıkarılıp bağışıklık yanıtı oluşturan genleri tutulduğunda rekombinant ve zayıflatılmış bir aşı elde edilir.
- Alternatif bir yöntemde ise, zararsız bir virüsün genomuna patojen bir virüsten alınan bağışıklık uyandırıcı genler eklenerek vektör aşıları oluşturulur.
- Her iki yaklaşımın birleştirilmesiyle hem zararsızlaştırılmış hem de ikinci bir patojene karşı bağışıklık sağlayan polivalan aşılar elde edilebilir.

# *Vaccinia* Virüsü ve tdk Geninin Kullanımı

- *Vaccinia* virüsü, insanlarda kullanılan birçok rekombinant aşının üretiminde tercih edilen bir platformdur.
- Bu virüse yabancı genlerin eklenebilmesi için seçici bir belirteç gerekir ve bu amaçla virüsün timinidin kinaz (tdk) geninden yararlanır.
- Timinidin kinaz enzimi, 5-bromodeoksiuridini (BrdU) DNA'ya dahil edilen ve hücreyi öldüren bir nükleotide dönüştürdüğü için aktif tdk taşıyan hücreler BrdU varlığında ölür.

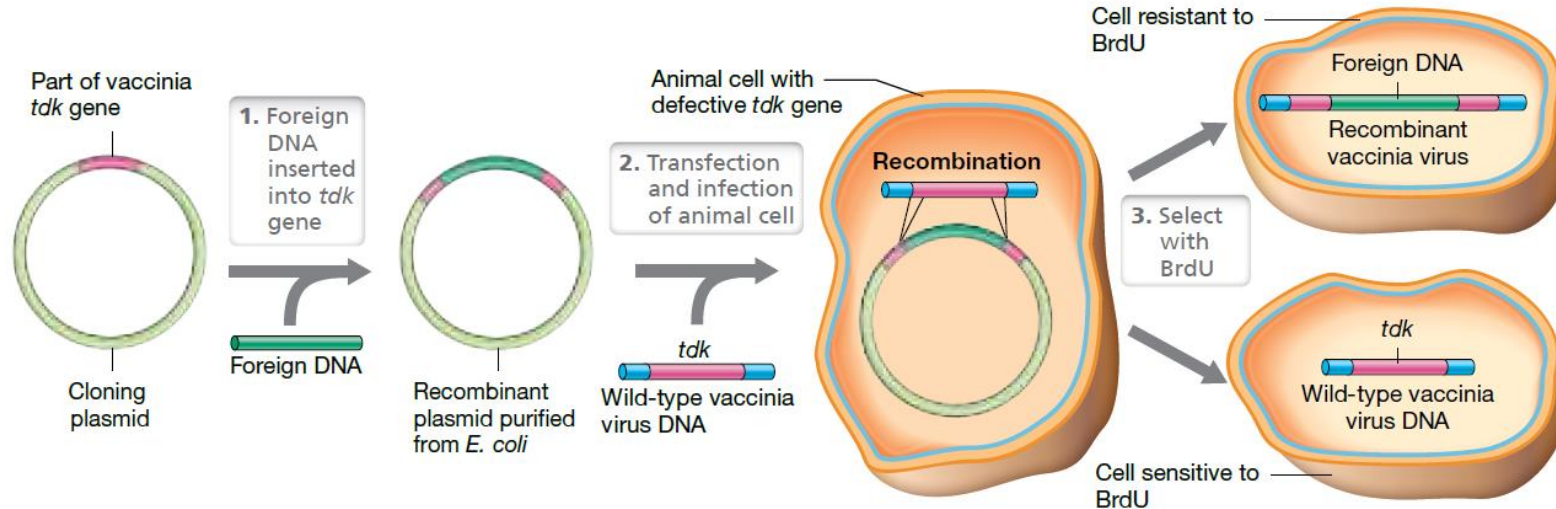
# Rekombinant *Vaccinia* Virüsünün Seçilmesi

- *Vaccinia*'ya aktarılabacak genler ilk olarak *tdk* geninin bir parçasıyla birlikte *E. coli* plazmidine yerleştirilir ve *tdk* geni bu sırada kesintiye uğrar.
- Rekombinant plazmid, *tdk* genleri inaktive edilmiş hayvan hücrelerine aktarılır ve bu hücreler aynı zamanda yabancı tip *vaccinia* ile enfekte edilir.



# Rekombinant *Vaccinia* Virüsünün Seçilmesi

- Plazmiddeki kesintiye uğramış *tdk* ile virüsteki sağlam *tdk* arasında rekombinasyon gerçekleşir ve bazı virüsler yabancı gen içeren bozuk *tdk* genini kazanır.
- BrdU uygulandığında, yalnızca bozuk *tdk* genine sahip rekombinant *Vaccinia* virüsü ile enfekte olan hücreler hayatta kalır ve yeni virüsler üretir.



# Polivalan Vektör Aşılar ve Veterinerlik Uygulamaları

- *Vaccinia* virüsü, birden fazla virüse ait genlerin aynı genomda taşınmasına olanak verdiği için polivalan aşı geliştirmede etkilidir.
- Günümüzde kuduz gibi hastalıklar için geliştirilmiş ve veterinerlikte kullanılan *Vaccinia* vektör aşıları bulunmaktadır.
- Pek çok başka *Vaccinia* vektör aşısı ise hâlen klinik değerlendirme aşamasındadır.



# Alt Ünite Aşıların Rekombinant Üretimi

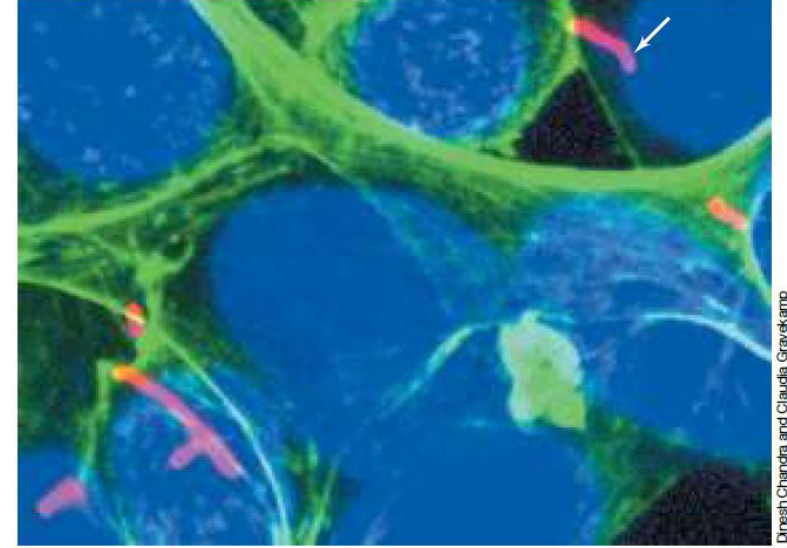
- Alt ünite aşılar, patojenin sadece bir veya birkaç proteinini içerir ve bu proteinler genellikle rekombinant olarak büyük miktarlarda üretilebilir.
- Patojenik virüslerde dış kılıf proteinleri çoğunlukla en iyi adaylardır çünkü bağışıklık sistemini güçlü biçimde uyarırlar.
- Bu aşı türü, zayıflatılmış veya öldürülmüş patojen içeren aşılarla kıyasla canlı mikroorganizma taşımadığı için daha güvenlidir.

# Hepatit B Alt Ünite Aşısının Üretiminde Konak Seçimi

- Bazı alt ünite aşılarının etkin olabilmesi için üretilen proteinlerin konağın glikozilasyon sürecinden geçmesi gerekir.
- İnsan hepatit B virüsünün yüzey proteinine karşı geliştirilen alt ünite aşı, bu nedenle ökaryotik bir konakta üretilmiştir.
- Mayalarda üretilen bu glikozillenmiş protein, bağışıklık açısından aktif formda bulunur ve böylece etkili bir alt ünite hepatit B aşısı elde edilir.

# *Listeria monocytogenes* ve Tümör Hücrelerini Hedefleme Yaklaşımı

- *L. monocytogenes* insan hücrelerinde çoğalan ve bu nedenle bağışıklık sisteminden kaçabilen bir patojendir.
- Zayıflatılmış rekombinant *L. monocytogenes* suşlarının sağlıklı hücrelerde bağışıklık sistemi tarafından elimine edildiği ancak tümör hücrelerinde temizlenemediği gözlenmiştir.
- Bu özellik, toksik ilaçları ya da radyoizotopları doğrudan tümör hücrelerine taşıyabilen bir antikanser aracı geliştirme fikrini doğurmuştur.
- 188-rhenyum ile işaretlenmiş rekombinant *L. monocytogenes* suşunun farelerde pankreas tümör hücrelerini enfekte edip çoğaldığı ve normal pankreas hücrelerine zarar vermediği gösterilmiştir.

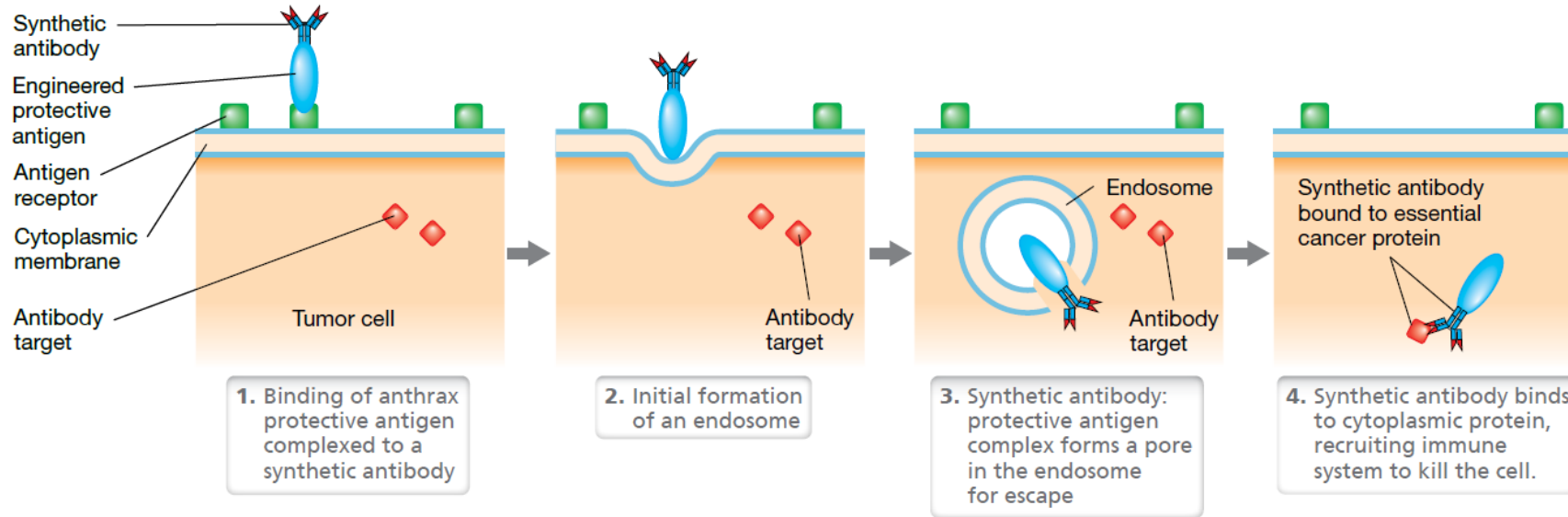


Dinesh Chandra and Claudia Gravekamp



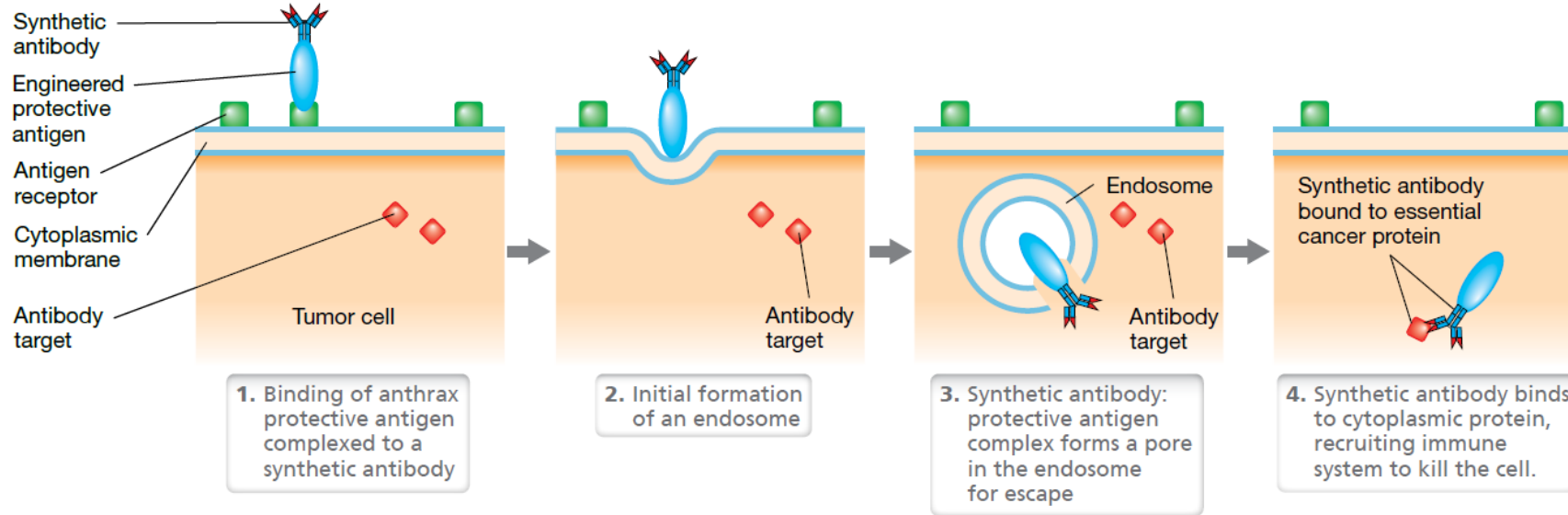
# Antikorların Kanser Tedavisinde Kullanımı

- Antikorlar bağışıklık sistemi tarafından üretilen ve yabancı molekülleri tanıyıp hedefleyen proteinlerdir.
- Belirli antikorların kanser hücrelerinin içindeki hedeflere bağlanmasının, konağın bağışıklık sistemi tarafından bu hücrelerin öldürülmesini tetiklediği bulunmuştur.



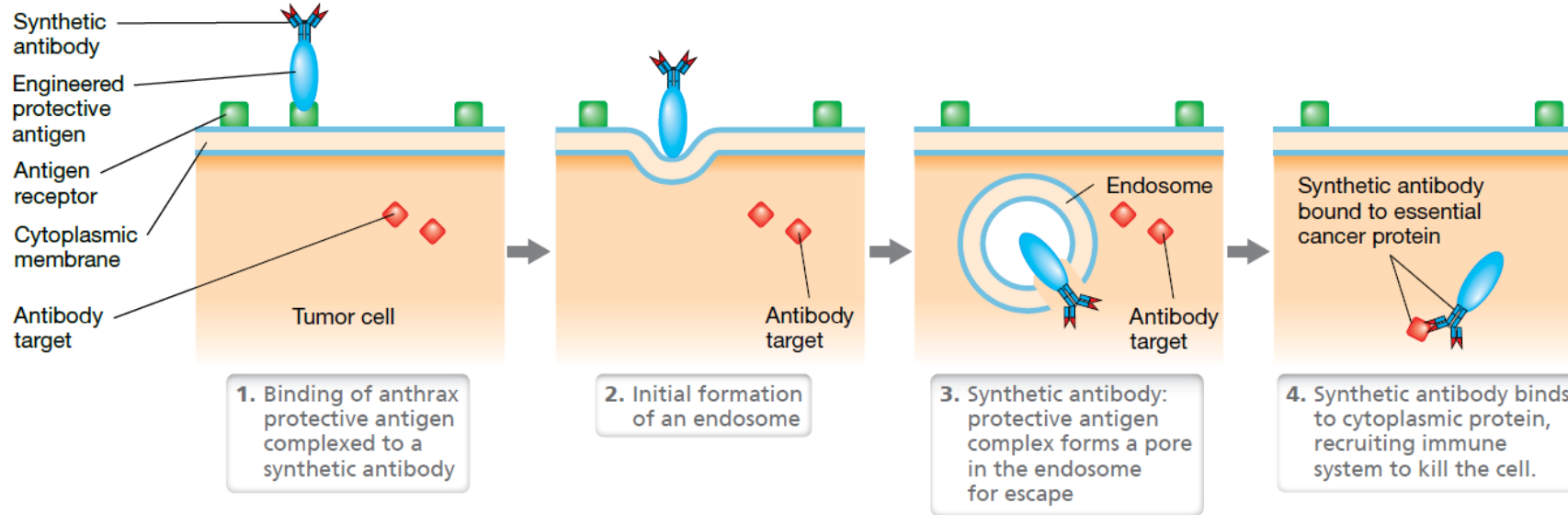
# Antikorların Kanser Tedavisinde Kullanımı

- Ancak antikorlar hücre içine serbestçe giremediği için bir taşıma mekanizmasına ihtiyaç duyulur.
- Bu amaçla, *Bacillus anthracis* tarafından üretilen toksinin hücre içine alım sağlayan koruyucu antijen bileşeni genetik olarak kullanıma uyarlanmıştır.



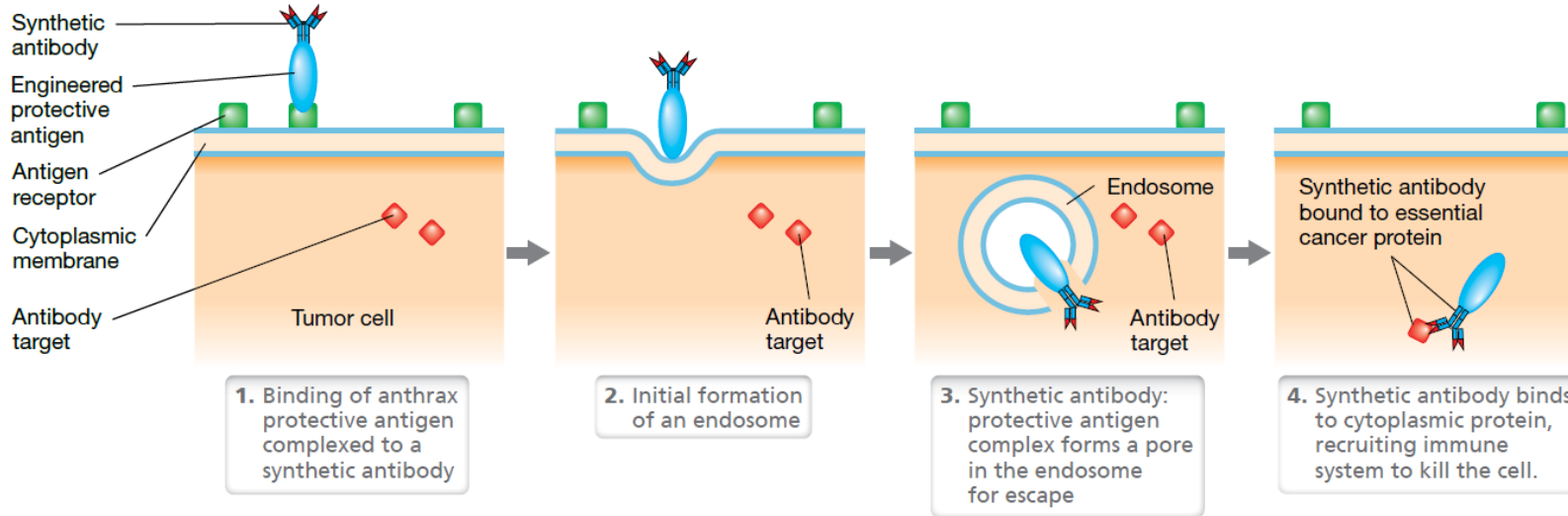
# *Bacillus anthracis* Toksininin Antikor Taşıyıcısına Dönüştürülmesi

- Anthrax toksini üç bileşen içerir ve bunlardan koruyucu antijen, toksik faktörleri hücre içine taşımada kritik bir rol oynar.
- Bilim insanları bu koruyucu antijeni toksik bileşenler yerine sentetik bir antikanser antikorunu taşımak üzere genetik mühendislikle yeniden tasarlamıştır.



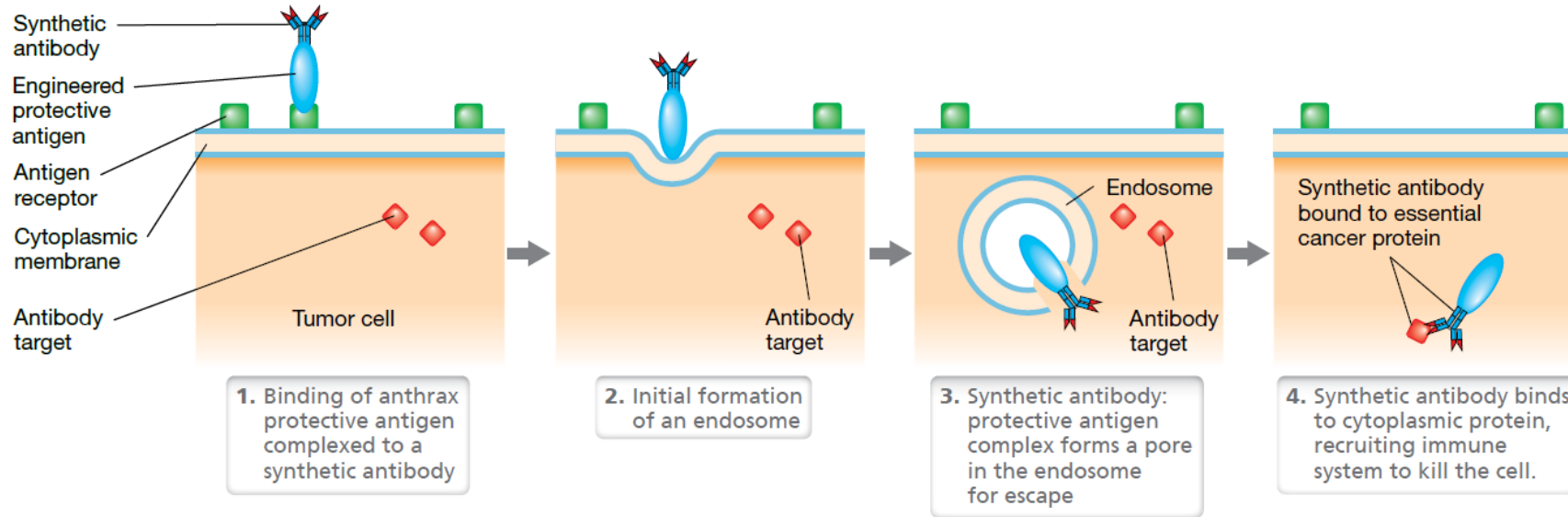
# *Bacillus anthracis* Toksininin Antikor Taşıyıcısına Dönüştürülmesi

- Enjekte edilen bu modifiye ve zararsız toksin kanser hücrelerinin yüzeyindeki reseptörlere bağlanırken, süreç boyunca koruyucu antijen antikorla birlikte hareket eder.
- Normal hücreler toksik bileşenleri içermediğinden ve antikorun hedeflediği spesifik tümör proteinlerini taşımadığından, bu kompleks normal hücreler için zararsızdır.



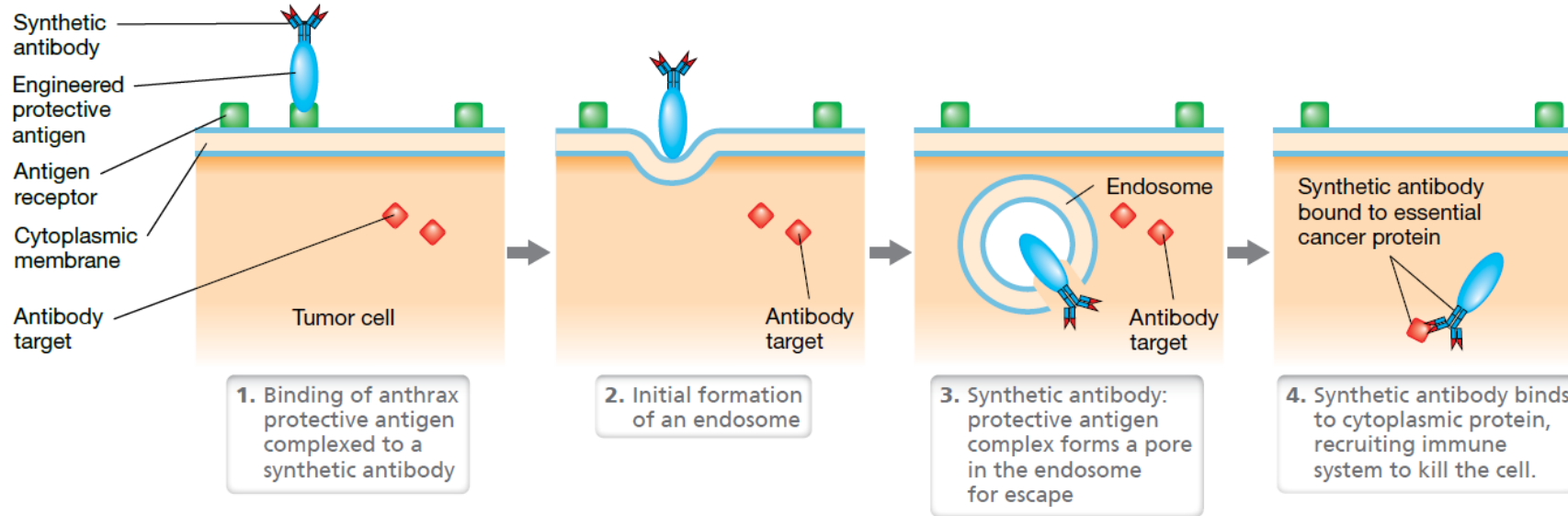
# Modifiye Toksinlerin Hücre İçi Etki Mekanizması

- Koruyucu antijen ve antikor kompleksinin kanser hücresi tarafından endozom yoluyla içeri alındığı gösterilmiştir.
- Antikor endozomdan sitoplazmaya salındığında, tümör yaşamsallığı için gerekli bir proteine özgül olarak bağlanır.



# Modifiye Toksinlerin Hücre İçi Etki Mekanizması

- Bu bağlanma, hücrenin bağışıklık sistemi tarafından antikor–protein kompleksinin tanınmasını ve hücrenin öldürülmesini tetikler.
- Bu yaklaşım, bağışıklık sisteminin uyarılmasıyla kanserle mücadelede yeni ve güçlü tedavi stratejilerinin geliştirilebileceğini göstermektedir.

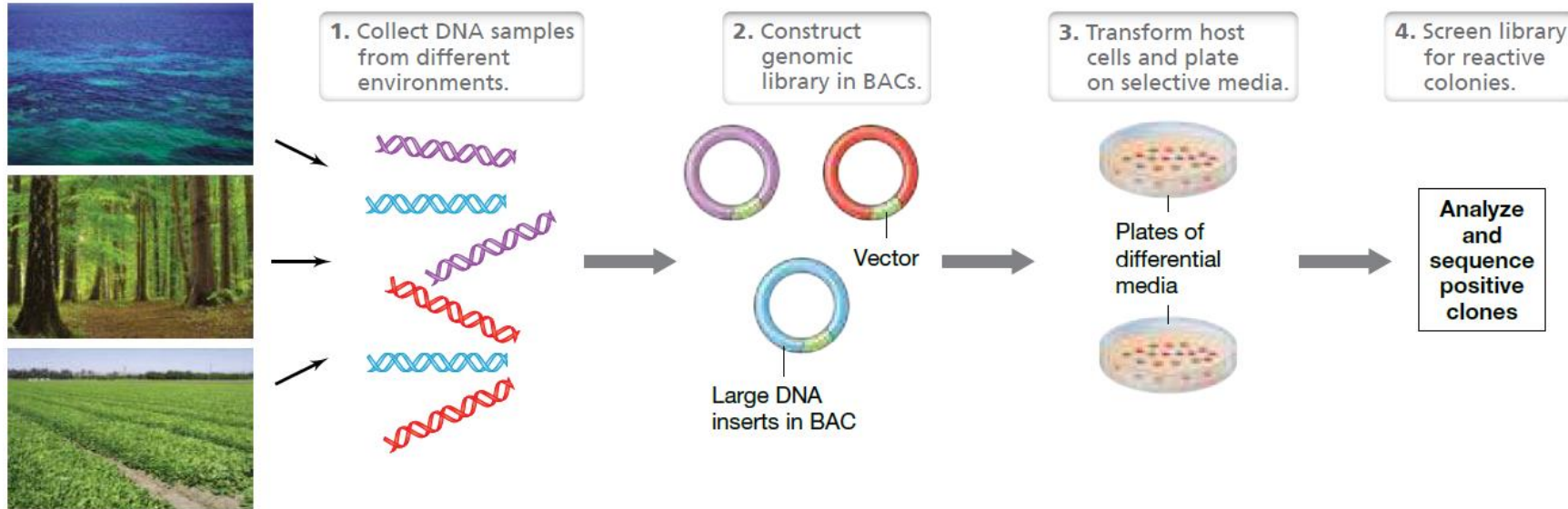


# Genetik Mühendisliğinin Kansere Tedavisine Katkısı

- Antikorları, yüksek toksisiteye sahip bir bakterinin yeniden tasarlanmış taşıma sistemiyle birleştiren bu yaklaşım genetik mühendisliğinin gücünü gözler önüne serer.
- Yöntem, kanser hücrelerini özgül olarak hedefleyen yenilikçi tedavilere kapı aralamaktadır.
- Bu sistem, bağışıklık tepkisini tümör hücrelerine yönlendiren yeni nesil antikanser tedavilerin geliştirilmesine olanak sağlayabilir.
- Çalışma, biyoteknolojinin kanserle savaşta hızlandırıcı bir rol üstlenebileceğini gösteren çarpıcı bir örnektir.

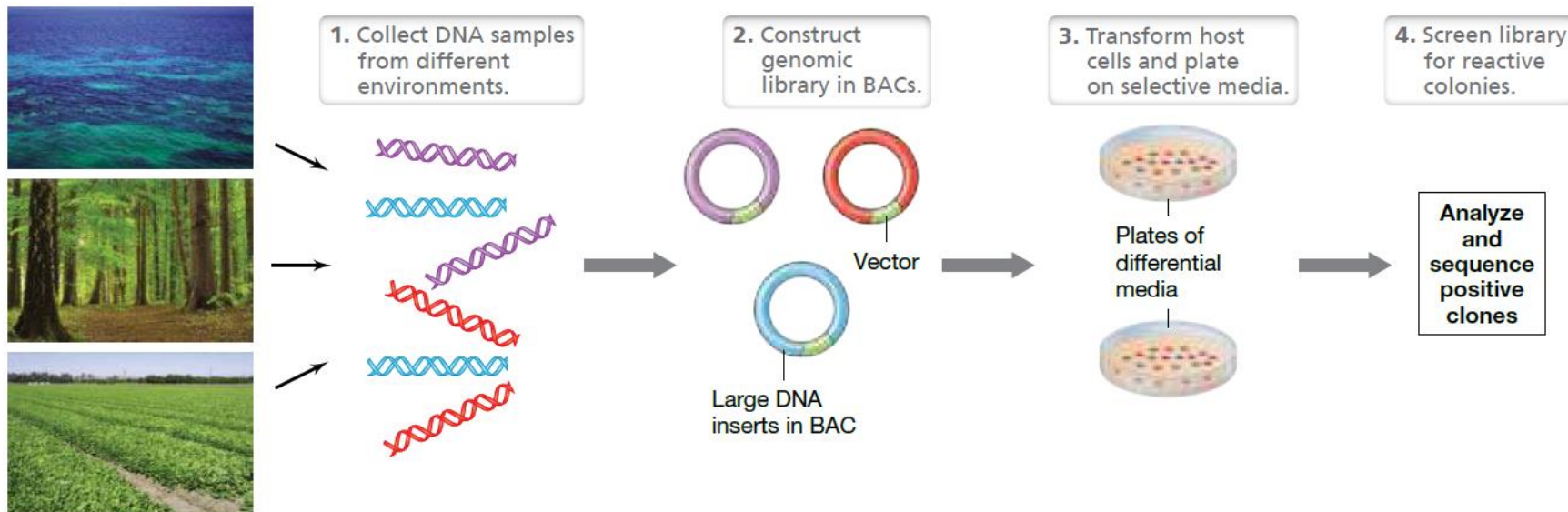
# Metagenomik ve Genetik Mühendislikle Gen Keşfi

- Bir organizmanın tüm genlerine genom denirken, bir çevredeki tüm genomların toplamı metagenom olarak adlandırılır.
- Gen madenciliği, kültüre alınmamış organizmalardan doğrudan çevresel DNA ya da RNA izolasyonu yoluyla yararlı genlerin belirlenmesi ve izole edilmesi sürecidir.



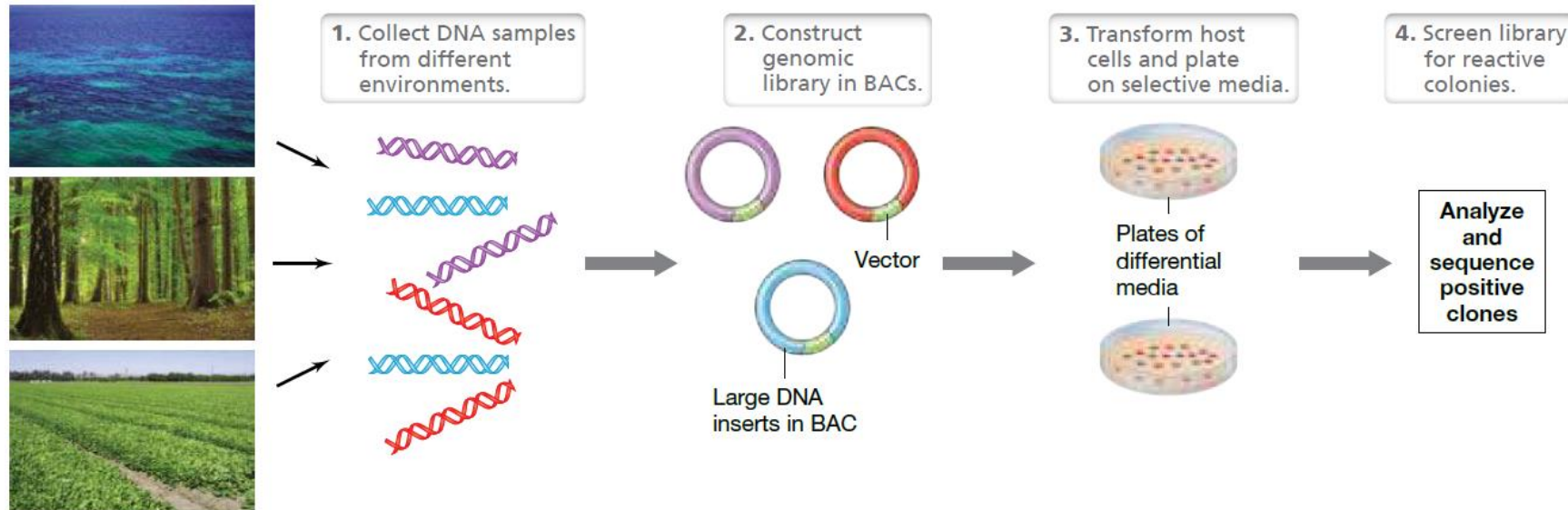
# Metagenomik ve Genetik Mühendislikle Gen Keşfi

- Bu amaçla elde edilen DNA ya da RNA, uygun vektörlere klonlanarak bir metagenomik kütüphane oluşturulur.
- RNA kullanılıyorsa, önce revers transkriptaz ile cDNA'ya dönüştürülmesi gerekir.



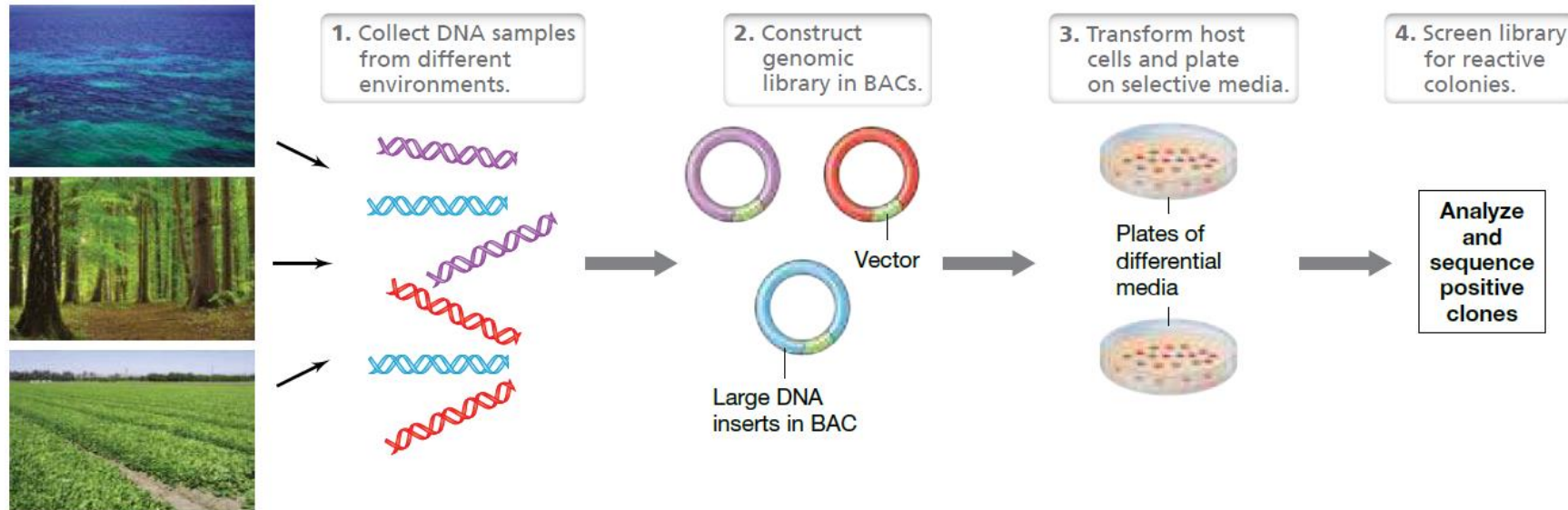
# Metagenomik Kütüphanelerin Taranması ve Yeni Enzimlerin Keşfi

- Metagenomik kütüphanelerin taranmasıyla kirleticileri parçalayabilen enzimler ve yeni antibiyotikleri üreten enzimler keşfedilmiştir.
- Kompleks metabolik yolları kodlayan gen kümelerinin elde edilmesi için büyük DNA parçalarını taşıyabilen BAC vektörleri kullanılır.



# Metagenomik Kütüphanelerin Taranması ve Yeni Enzimlerin Keşfi

- BAC'ler, özellikle çok sayıda bilinmeyen genom barındıran toprak gibi zengin ortamlardan gen kümesi elde etmek için avantaj sağlar.
- Bu yaklaşımla lipaz, kitinaz, esteraz gibi geniş substrat aralığına sahip birçok bozunma enzimi izole edilmiştir.



# Endüstriyel Uygulamalar ve Termostabil Enzimlerin Keşfi

- Endüstriyel üretim koşullarına dayanıklı enzimler özellikle değerlidir ve yüksek sıcaklık ile aşırı pH koşullarında çalışan enzimlere büyük ihtiyaç vardır.
- Bir sıcak su kaynağından alınan örneklerden oluşturulan metagenomik kütüphanelerde, 90°C'de dahi aktif kalan ısıya dayanıklı lipazlar bulunmuştur.
- Bu lipaz genleri, ticari enzim üretimi için uygun ekspresyon vektörlerine aktarılmıştır.
- Benzer şekilde, çeşitli endüstriyel süreçlere uyumlu dirençli enzimler metagenomik taramalarla elde edilebilmektedir.

# Ekstrem Ortamlardan Enzim Madenciliği ve Gıda Endüstrisinde Kullanım

- Ekstrem çevrelerden yapılan metagenomik madencilik ile gıda endüstrisinde kullanılan ısı ve asit stabil enzimler elde edilmiştir.
- Bu enzimler, gıda işleme ekipmanlarının temizliğinde daha az kimyasal ve su kullanımını sağlayarak çevresel yükü azaltır.
- Enzim bazlı temizlik, kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda ve seyreltik asitlerde etkin çalışarak mikrobiyal biyofilmleri standart yöntemlerden daha etkili uzaklaştırır.
- Bu yaklaşım hem verimliliği artırır hem de temizlik sürecinin sürdürülebilirliğini destekler.



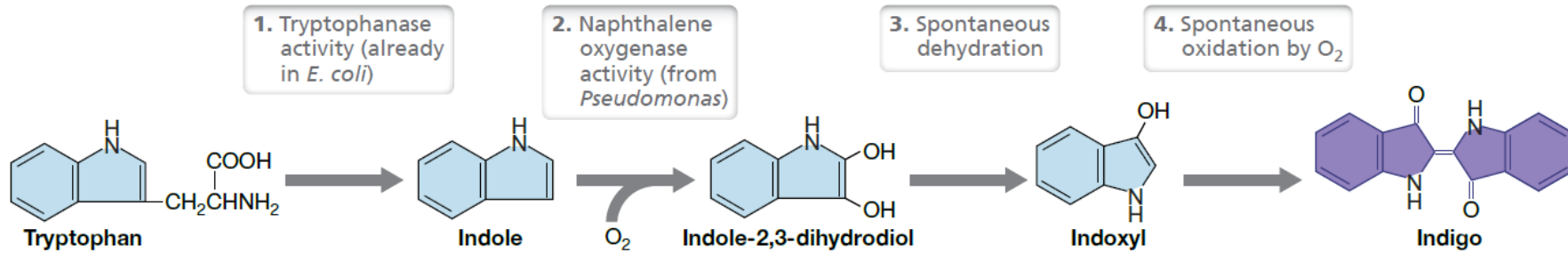
Cinder Biological, Inc.

# Metabolik Yol Mühendisliğine Genel Bakış

- Metabolik yol mühendisliği, bir ya da birden fazla organizmadan alınan genlerin bir araya getirilerek yeni veya geliştirilmiş bir biyokimyasal yol oluşturulması sürecini ifade eder.
- Mühendislik uygulamalarıyla elde edilen mikroorganizmalar, alkol, çözücüler, gıda katkıları, boyalar ve antibiyotikler gibi birçok ürünü üretmek üzere kullanılabilir.
- Bu mikroorganizmalar ayrıca tarımsal atıkları, kirleticileri, herbisitleri ve diğer toksik ya da istenmeyen maddeleri parçalamada da kullanılabilir.

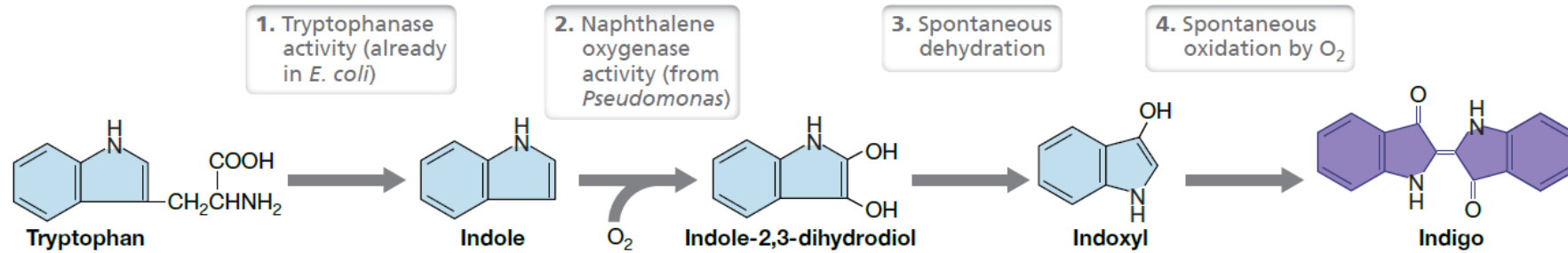
# *E. coli* ile İndigo Üretimi

- İndigo üretimi, metabolik yol mühendisliğinin ilgi çekici örneklerinden biri olup *E. coli*'de gerçekleştirilebilmektedir.
- İndigo, özellikle yün ve pamuğun boyanmasında kullanılan önemli bir boyadır ve mavi kot kumaşların renklendirilmesinde yaygın biçimde tercih edilir.



# *E. coli* ile İndigo Üretimi

- Tekstil endüstrisindeki yüksek talep nedeniyle kimyasal senteze alternatif olarak biyoteknolojik yaklaşımlara duyulan ilgi giderek artmıştır.
- Bu ilgi, metabolik yol mühendisliğinin indigo sentezinde kullanılmasının yolunu açmıştır.



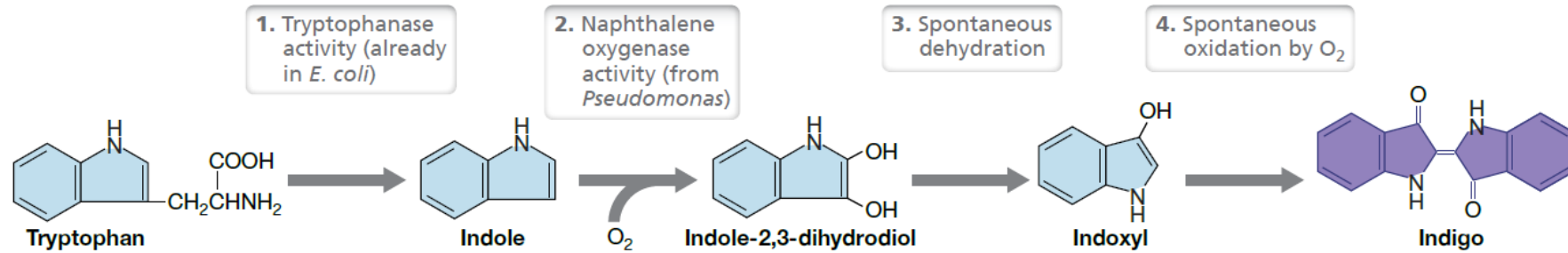
# Naftalin Benzeri Yapının Sağladığı Avantaj

- İndigonun yapısal olarak aromatik hidrokarbon naftalinle benzerliği, naftalini oksijenleyen enzimlerin indolü de dihidroksi türevine okside edebilmesine olanak tanır.
- Bu dihidroksi türevi havada kendiliğinden oksitlenerek parlak mavi renkteki indigo pigmentini oluşturur.
- Naftalini oksijenleyen enzimler, *Pseudomonas* ve diğer toprak bakterilerinde bulunan çeşitli plazmitler tarafından kodlanır.
- Bu plazmitlerden klonlanan naftalen oksijenaz genleri *E. coli*'ye aktarıldığında hücrelerin maviye dönmesi, enzimin başarıyla çalıştığını gösterir.



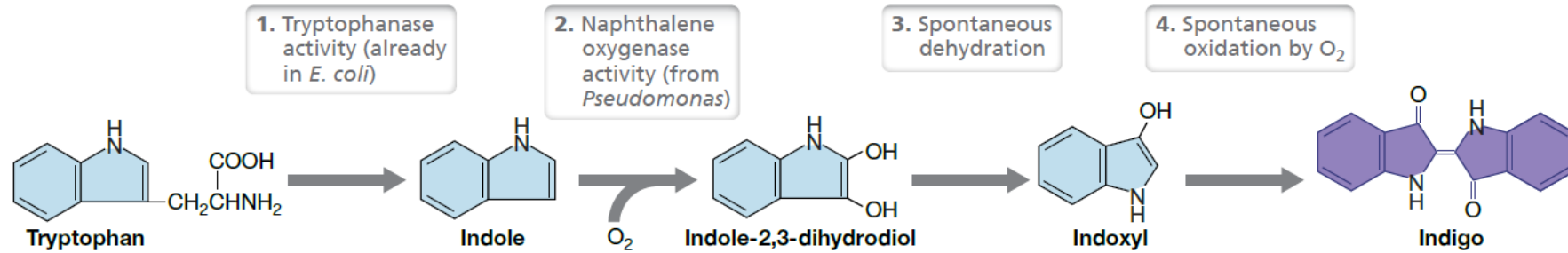
# İndigo Yolunun Basamakları

- İndigo sentez yolu iki enzimatik ve iki spontan olmak üzere dört adımdan oluşur.
- *E. coli*, ilk basamak olan triptofanın indole dönüştürülmesini sağlayan triptofan enzimini doğal olarak üretir.



# İndigo Yolunun Basamakları

- Mühendislik uygulanmış *E. coli*'de ikinci basamakta indol, indigonun öncülüne dönüşen ürüne oksitlenir.
- Sürecin ilerleyebilmesi için hücrelere dışarıdan triptofan sağlanması gerekir.



# Biyoreaktörde İndigo Üretiminin Uygulanması

- Ticari uygulamalarda, *E. coli* hücreleri katı bir yüzeye tutturularak biyoreaktöre yerleştirilmiş ve üzerlerinden sürekli olarak atık protein kaynaklarından elde edilen triptofan çözeltisi geçirilmiştir.
- Triptofan çözeltisi hücrelerin üzerinden birkaç kez dolaştırıldığında indigo seviyesi giderek artar ve boyar madde sonunda toplanabilir.
- Bu yaklaşım, indigonun biyolojik üretiminin teknik olarak mümkün olduğunu göstermektedir.
- Ancak kimyasal üretimin yıllık 20 kilotonu aşması, biyolojik yöntemin ekonomik olarak rekabet etmesini zorlaştırmaktadır.



# Metabolik Yol Mühendisliğinde Karşılaşılan Zorluklar

- Metabolik bir yolu kontrol etmek ve istenen ürünü maliyet açısından verimli seviyelerde üretmek yol mühendisliğinin temel güçlüklerindedir.
- Yüksek verime ulaşmak, enzimlerin etkinliği, metabolik akışın yönlendirilmesi ve toksik yan ürünlerin azaltılması gibi süreçleri kapsar.
- Bu nedenle, biyoteknolojik üretimlerle kimyasal sentez arasında ekonomik rekabet çoğu zaman sınırlı kalmaktadır.
- İndigo örneği, biyolojik üretimin mümkün olduğunu fakat verim ve maliyet baskılarının kritik rol oynadığını göstermektedir.



# Biyoyakıt Mühendisliğine Giriş

- Fosil yakıtların sınırlı olması ve iklim değişikliğine ilişkin kaygıların artması, biyolojik olarak üretilen yakıtların yani biyoyakıtların önemini artırmıştır.
- Günümüzde kullanılan başlıca biyoyakıtlar etanol, biyodizel, hidrojen ve metandır.
- Bazı mikroorganizmalar bu yakıtları doğal olarak üretse de, yabancıl tip suşların verimi toksik yan ürünler ve kritik basamaklardaki eksik enzimler nedeniyle sınırlanır.
- Bu nedenle mikroorganizmaların genetik olarak değiştirilmesi, biyoyakıt üretimini artırmak için temel bir strateji haline gelmiştir.

# Biyoyakıt İçin Alternatif Hammaddeler ve Enzim Yer Değiştirme

- Genetik mühendisliği sayesinde alternatif biyoyakıt hammaddelerinin kullanılabilmesi mümkün hale gelmiştir.
- Eksik enzimlerin yerine uygun enzimlerin yerleştirilmesiyle yeni biyoyakıt türleri üretilebilmektedir.
- Fotosentetik mikroorganizmalar ise ışık enerjisini kullanarak biyoyakıt sentezi yapabilen potansiyel biyoyakıt fabrikaları olarak değerlendirilmektedir.
- Bu yaklaşımlar, biyoyakıt üretiminde hem verimi artırmak hem de çevresel etkiyi azaltmak amacıyla geliştirilmiştir.

# Switchgrass'ın Etanole Dönüştürülmesi

- ABD'de yılda 14 milyar galondan fazla etanol, mısır şekerinin maya ile fermantasyonu sonucu üretilmektedir (Figür a).
- Mısırın yüksek enerji maliyeti ve temel bir gıda kaynağı olması nedeniyle, düşük girdili ve yenilenebilir bitkilerden elde edilen alternatif biyoyakıt hammaddelerine ihtiyaç duyulmaktadır.

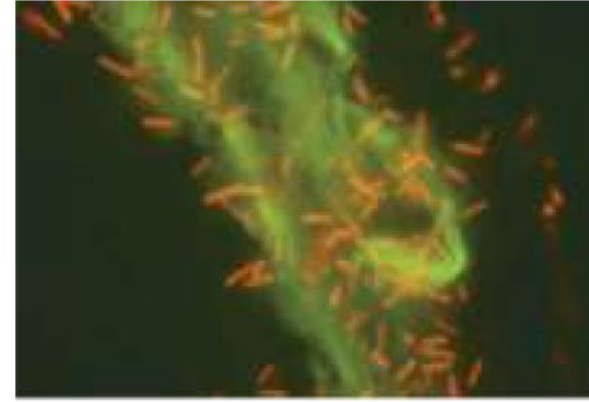


Chris Standee and DOE/NREL

(a)



(b)



S.E. Blumer-Schuetz, J.V. Zurawski, J.M. Conway, and R.M. Kelly

(c)



# Switchgrass'ın Etanole Dönüştürülmesi

- Hızlı büyüyen switchgrass (*Panicum virgatum*) bu amaçla öne çıkmış, ancak selülozun hemiselüloz ve ligninle sıkı bağlantısı nedeniyle yüksek sıcaklık, kimyasal ve enzimatik ön işlemler gerektirmiştir (Figür b).
- Bu zorluklar, mikrobiyal çeşitliliğin ve genetik mühendisliğin birleştirilmesiyle aşılmaya çalışılmaktadır.

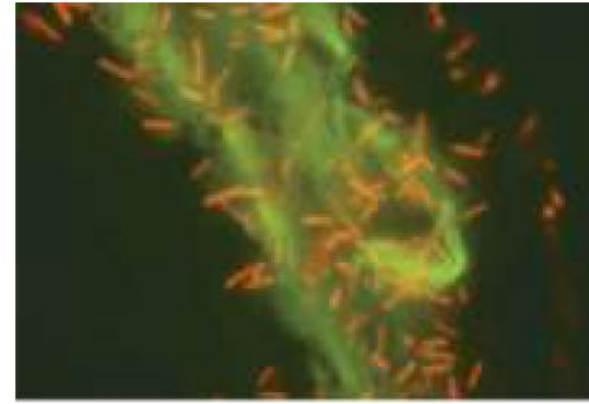


Chris Standee and DOE/NREL

(a)



(b)



S.E. Blumer-Schuetz, J.V. Zurawski, J.M. Conway, and R.M. Kelly

(c)



# *Caldicellulosiruptor*'un Doğal Kapasitesi

- *Caldicellulosiruptor*, selüloz ve hemiselülozu glikoza dönüştürebilen doğal bir selülaz enzimi üreten gram pozitif, anaerob ve termofilik bir bakteridir.
- Bu bakteri, peptidoglikan tabakasından dışarı doğru uzanan tapirin adlı proteinler sayesinde ham switchgrass'e tutunabilir (Figür c).

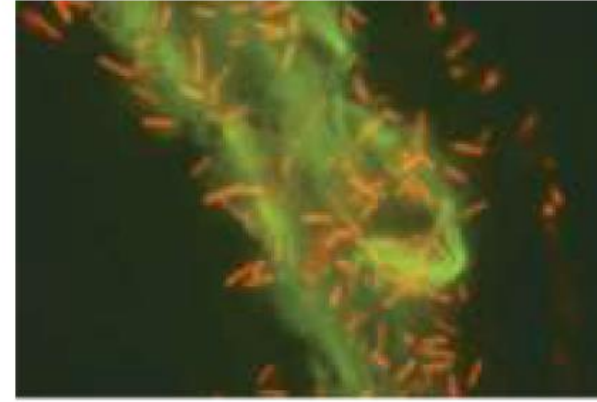


Chris Standee and DOE/NREL

(a)



(b)



S.E. Blumer-Schuetz, J.V. Zurawski, J.M. Conway, and R.M. Kelly

(c)



# *Caldicellulosiruptor*'un Doğal Kapasitesi

- *C. bescii* şekerleri fermente edebilse de doğal olarak çoğunlukla asetat, laktat ve hidrojen üretir.
- Bu nedenle doğrudan etanol üretimi için metabolik yolun son basamaklarının yeniden düzenlenmesi gerekmiştir.

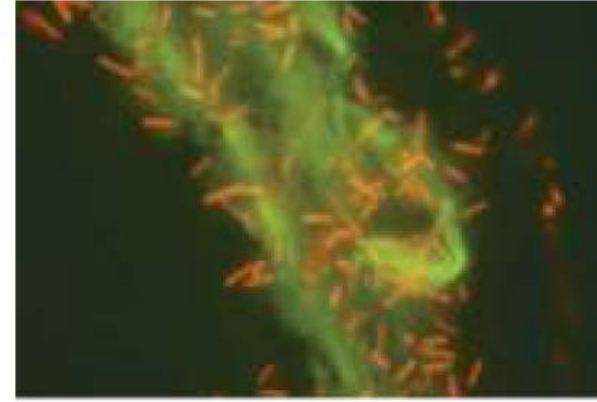


Chris Standee and DOE/NREL

(a)



(b)



S.E. Blumer-Schuetz, J.V. Zurawski, J.M. Conway, and R.M. Kelly

(c)



# *C. bescii*'de Etanol Üretimi İçin Genetik Düzenleme

- Genetik mühendisleri, *C. bescii*'nin glikolitik yolunun son basamaklarında yer alan laktat dehidrogenaz ve diğer asidik ürünleri oluşturan genleri çıkarmıştır.
- Bu genlerin yerine *Clostridium thermocellum*'dan alınan bifonksiyonel asetaldehit/alkol dehidrogenaz yerleştirilmiştir.
- Yapılan değişiklik, fermantasyonun ağırlıklı olarak asidik ürünlerden %70 etanole kaymasını sağlamıştır.
- Böylece ham switchgrass'ın tek bir mikroorganizma tarafından doğrudan etanole dönüştürülebilmesi mümkün olmuştur.



# Termofilik Mikroorganizmaların Biyoyakıt Üretimindeki Avantajları

- Termofilik mikroorganizmaların kullanımı, mezofillerle kontaminasyon riskini azaltır ve substrat çözünürlüğünü artırır.
- Bu organizmalarla çalışan sistemler, uçucu ürünlerin toplanmasını kolaylaştırır ve enerji maliyetlerini düşürür.
- Örneğin maya ile mısır şekerinden etanol üretiminde büyüme için biyoreaktörün soğutulması ve daha sonra etanolün ayrıştırılması için ısıtılması gerekir.
- Buna karşılık 80°C'de büyüyen *C. bescii*, etanolün kaynama noktasının hemen üzerinde çalıştığı için ürünü sürekli salarak soğutma ihtiyacını ortadan kaldırır ve enerji tasarrufu sağlar.



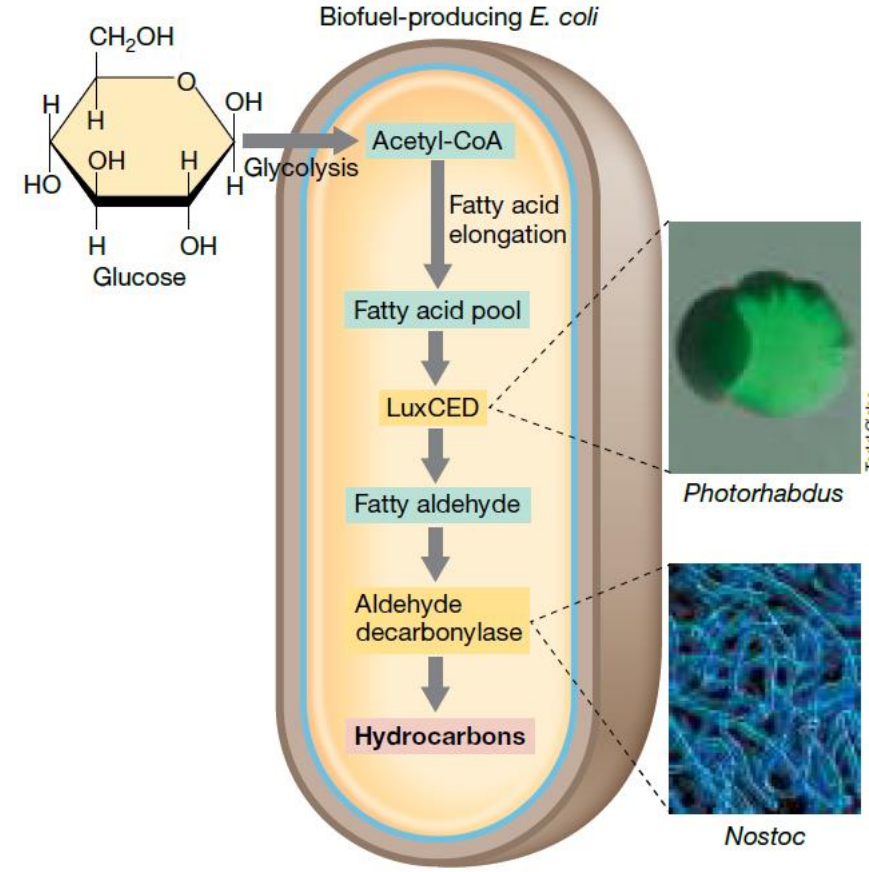
# Petrol Kaynaklı Hidrokarbonlara Mühendislik Yaklaşımı

- Petrol, zincir uzunlukları farklı pek çok hidrokarbon içerir ve bu bileşikler arasında propan hem yaygın bir yakıt hem de önemli bir tarımsal enerji kaynağıdır.
- Genetik mühendisliği ile değiştirilen *E. coli* suşları glukozu propana ve bazı diğer petrol hidrokarbonlarına dönüştürebilmektedir.
- Bu yaklaşım, doğal gaz işleme ve petrol rafinasyonu ile elde edilen propanın biyolojik yollarla da üretilebileceğini göstermektedir.
- Dolayısıyla biyoyakıt üretiminde mikrobiyal sistemlerin enerji sektörüne alternatif olabilecek yeni üretim hatları oluşturması amaçlanmaktadır.



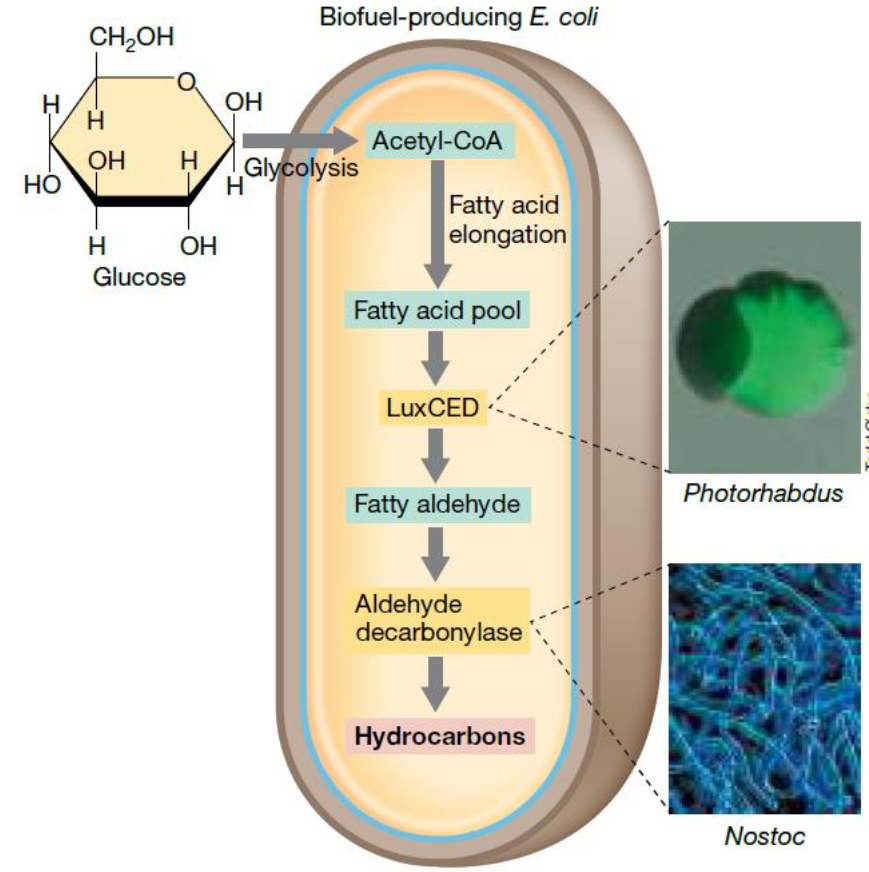
# *E. coli* İçinde Yağ Aldehidi Üretiminin Başlatılması

- Hidrokarbon üretimi, başlangıçta yağ asitlerinin yağ aldehitine indirgenmesiyle başlar ve bu işlem luxCED genlerinin heterolog ekspresyonuyla gerçekleştirilir.
- *Photorhabdus luminescens* kaynaklı luxCED genleri, yağ asitlerini karşılık gelen aldehitlere dönüştüren enzimleri kodlar.
- Bu enzimlerin indirgeme, sentez ve transfer aktiviteleri, hidrokarbon üretimi için gerekli olan yağ aldehidinin oluşmasını sağlar.
- Böylece *E. coli* içinde doğal olarak bulunmayan bir basamak mühendislik yoluyla eklenmiş olur.



# Aldehit Dekarbonilazın Sisteme Eklenmesi

- *E. coli* doğal olarak aldehit dekarbonilaz enzimine sahip olmadığından, yağ alhidinin hidrokarbona dönüşümü için bu basamak dışarıdan eklenmiştir.
- Genetik mühendisleri bu eksikliği, aldehit dekarbonilaz genini siyanobakteri *Nostoc punctiforme*'den klonlayarak gidermiştir.
- Bu sayede mühendislik ürünü *E. coli*, büyüme ortamına eklenen doğrusal yağ asitlerini doğrusal hidrokarbonlara dönüştürebilmektedir.
- Böylece sistemdeki iki temel basamak tamamlanarak biyolojik hidrokarbon üretimi mümkün hale gelmiştir.



# Yüksek Oktanlı Yakıt İçin Dallanmış Zincirli Hidrokarbon Üretimi

- Dallanmış zincirli hidrokarbonlar daha yüksek oktan sayısına sahip olduğundan mühendislik çalışmaları bu tür yakıtların üretimini de hedeflemiştir.
- Bunun için *Bacillus subtilis* kaynaklı ve yağ asidi uzama döngüsünün ilk basamağında görev yapan enzimler heterolog olarak *E. coli*'ye aktarılmıştır.
- Bu enzimler sayesinde organizma daha fazla dallanmış zincirli yağ asitlerini başlangıç substratı olarak kullanabilmiştir.
- Sonuçta sistem, daha yüksek performanslı benzine uygun yakıtlar üretebilen bir biosentetik yola dönüştürülmüştür.



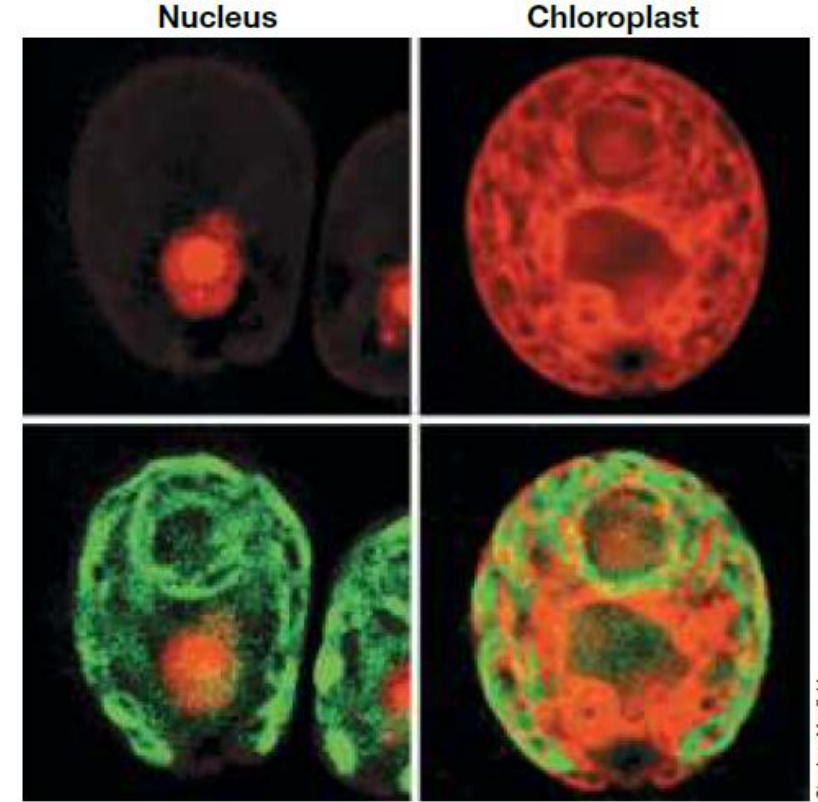
# Mikroalglerin Biyoyakıt Potansiyeli

- Mikroalgler, güneş ışığı, CO<sub>2</sub>, birkaç mineral ve su kullanarak lipitler, yağ asitleri ve karotenoidler gibi pek çok biyolojik ürün sentezleyen fototrof ökaryotlardır.
- Biyoteknoloji açısından önemli olan *Chlorella* ve *Chlamydomonas* gibi türler, biyodizele dönüştürülebilen yüksek miktarda triaçilgliserol (TAG) üretir.
- TAG'lerin kimyasal işleme biyodizele çevrilebilmesi, ağır taşıtlarda kullanılan dizel motorlar için sürdürülebilir bir yakıt alternatifi sunar.
- Bu durum, mikroalgleri yenilenebilir enerji teknolojilerinin önemli bir bileşeni haline getirmektedir.

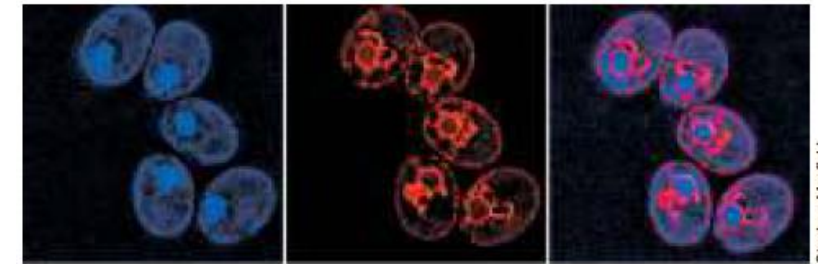


# Mikroalglerde Genetik Mühendislik ve Hedefli Protein Taşınması

- TAG üretimini artırmak için mikroalgal biyosentetik yollara yönelik genetik mühendislik çalışmaları yapılmıştır, Figür a'da çekirdek ya da kloroplasta hedeflenmiş protein ekspresyonuna izin veren vektör tasarımlarını göstermektedir.
- Ayrıca mitokondri veya endoplazmik retikuluma protein hedeflenmesini mümkün kılan farklı vektörler de geliştirilmiştir; bu hedefleme proteinlerin sinyal dizileriyle sağlanır.
- Aynı anda iki yabancı genin hücrenin farklı bölmelerinde ifade edilmesini sağlayan bir vektör de oluşturulmuş ve Figür b'de gösterilmiştir.
- Bu vektörler, TAG biyosentezinin çekirdek, mitokondri ve kloroplast kaynaklı farklı süreçlerinin hassas biçimde düzenlenmesinde kritik bir araçtır.



(a)



(b)

# Mikroalgal Yağların Biyodizel Üretimine Katkısı ve Zorluklar

- Mikroalg kaynaklı TAG'ların biyodizel hammaddesi olarak kullanılması, biyoyakıt üretiminde çeşitliliği ve sürdürülebilirliği artırmaktadır.
- Sürecin güneş ışığı ile çalışması çevresel açıdan olumlu bir özellik sunar ve fosil yakıtlara alternatif üretim modelleri yaratır.
- Ancak güneş ışığına dayalı tüm biyoyakıt üretim sistemlerinde olduğu gibi büyük ölçekli üretime geçiş yüksek donanım maliyetleri nedeniyle zorlayıcıdır.
- Dünya enerji piyasasına her gün yaklaşık 80 milyon varil petrol girdiğinden, fiyatlar önemli ölçüde artana kadar biyoyakıtların rekabet gücü sınırlı kalmaktadır.



# Sentetik Biyoloji: Biyolojik Parçacıklardan Yeni Sistemler

- Sentetik biyoloji, farklı organizmalardan alınan genetik parçaların bir araya getirilmesiyle yeni biyolojik sistemler oluşturmayı amaçlayan bir mühendislik yaklaşımıdır.
- Promotörler, düzenleyici proteinler, riboswitch'ler ve enzim bölgeleri gibi unsurlar "biobrick" adı verilen modüller olarak değerlendirilir.
- Bu modüllerin farklı kombinasyonlarla birleştirilmesi, karmaşık hücresel davranışlar gösterebilen biyolojik devrelerin tasarlanmasını mümkün kılar.
- Bu yaklaşım, biyoteknolojide yenilikçi çözümler geliştirmek için kullanılan güçlü bir araç haline gelmiştir.

# iGEM Yarışması ve Öğrencilerin Sentetik Biyoloji Başarıları

- Sentetik biyoloji, lisans öğrencilerinin de dahil olduğu geniş bir uygulama alanına sahiptir ve iGEM adlı uluslararası yarışma bu alandaki çalışmalarını teşvik etmektedir.
- Dünya genelindeki ekipler, biyolojik olarak parçalanabilir köpük benzeri malzemeler ya da bal arılarını parazitlerden koruyabilen *E. coli* suşları gibi özgün projeler geliştirmiştir.
- Öğrencilerin bu çabaları, sentetik biyolojinin yaratıcı ve toplumsal fayda sağlayan uygulamalar için ne kadar uygun olduğunu göstermektedir.
- Böylece genç araştırmacılar biyoteknolojinin geleceğini şekillendiren yenilikçi tasarımlarla tanışmaktadır.

# Genom Düzenleme Teknolojilerinin YükseliŐi

- Canlı hücrelerin genomlarının hassas biçimde düzenlenebilmesi, modern biyoteknolojiyi kökten deĐiŐtiren yeni bir teknoloji alanı oluşturmuştur.
- Bu yaklaşım, mikrobiyal bağışıklık sisteminin iŐleyiŐinden yararlanılarak geliştirilmiş ve bugün her türlü genom üzerinde düzenleme yapılabilmesini sağlamıştır.
- Bu teknolojiler, tıptan tarıma kadar pek çok alanda devrim niteliğinde yeniliklere kapı açmaktadır.

# Sentetik Biyolojinin Odağının Genişlemesi

- Sentetik biyolojide bugüne dek en önemli odaklardan biri, metabolik yolların yapay olarak kurulması ya da mevcut yolların yeniden tasarlanmasıdır.
- Araştırmacılar, çeşitli enzim ve düzenleyici “biobrick”leri kullanarak ucuz ve bol bulunan hammaddeleri değerli ürünlere dönüştürebilen yapay yollar inşa eder.
- Pek çok değerli doğal ürünün bitkilerden saflaştırılması maliyetli olduğundan, bu yaklaşım ekonomik bir avantaj sağlar.
- Bu yapay üretim süreçlerinde genetiği değiştirilmiş organizmalar kullanılsa da, elde edilen nihai ürünlerin içinde yabancı DNA bulunmaz.

# Vanilin'in Doğal Kaynağı ve Sorunlar

- Vanilin, *Vanilla* cinsi orkide bitkilerinin meyve kapsüllerinden elde edilen ve dünyada en çok kullanılan aroma bileşiklerinden biridir.
- Doğal vanilin; orkide bitkisinin yavaş büyümesi, düşük verim ve üretim–hasat süreçlerinin maliyetli olması nedeniyle oldukça pahalıdır.
- Bu nedenle, doğal kaynaktan vanilin elde etmek gıda endüstrisi için sürdürülebilir bir çözüm sunmaz.
- Sentetik biyologlar, doğal sentez yolunu analiz ederek vanilin'in biyoteknolojik yöntemlerle üretilmesi için alternatif stratejiler geliştirmiştir.

# *E. coli* ve Maya ile Vanilin Üretimi

- Genetik mühendisleri, glikozdan vanilin üretebilecek şekilde tasarlanmış *E. coli* ve maya suşları geliştirmiştir.
- *E. coli*'nin vanilin sentezi yapabilmesi için beş adet heterolog enzim ifade edecek biobrick'in bakteriye eklenmesi gerekmiştir.
- Gerekli genetik düzenlemeler tamamlandığında *E. coli*, doğal kaynaklı vanilin'le tamamen aynı yapıda ve tatta ürün üretmiştir.
- Bazı araştırmacılar doğal vanilyadaki diğer bileşiklerin tadı zenginleştirdiğini öne sürse de, üretilen vanilin gıda endüstrisinde yaygın olarak kabul görmektedir.

# “Synbio Vanilin”in Ticari Kullanımı

- *E. coli* kaynaklı bu ürün, “synbio vanilin” adıyla düşük maliyetli bir aroma kaynağı olarak ticari pazarda yer almıştır.
- Özellikle dondurma ve fırın ürünleri gibi büyük hacimli üretimlerde tercih edilen ekonomik bir aromadır.
- Safranın ardından dünyanın en pahalı ikinci baharatı olan doğal vanilya, kitlesel üretim için finansal açıdan elverişli değildir.
- Synbio vanilin, ucuz hammaddeyi (örneğin mısır şekeri) yüksek değerli bir ürüne dönüştüren sentetik biyoloji uygulamasının başarılı bir örneğidir.

# Artemisinin: Doğal Bir İlacın Üretim Sorunu

- Birçok ilaç doğal ürünlerden türetilir; ancak tümü ekonomik olarak kimyasal sentezle üretilemez.
- Sıtma tedavisinde kullanılan artemisinin de yalnızca *Artemisia annua* adlı bitkinin sınırlı üretimiyle elde edilebilen böyle bir bileşiktir.
- Sıtma, *Plasmodium* türü protozoonların neden olduğu ve her yıl yüz milyonlarca insanı etkileyen bir hastalıktır.
- Parazit, pek çok geleneksel ilaca direnç geliştirdiği için artemisinin gibi alternatif bileşiklere olan ihtiyaç giderek artmaktadır.



# Yarı Sentetik Artemisinin Projesi

- Artemisinin üretimini güvence altına almak amacıyla “Yarı Sentetik Artemisinin Projesi” başlatılmıştır.
- Projede hedef, artemisinik asidin mikrobiyal üretimini sağlayarak bu bileşiği artemisininine dönüştürmektir.
- *A. annua* bitkisi, asetil-KoA’dan mevalonat yoluyla FPP (15 karbonlu bir ara ürün) sentezler ve FPP’den ardışık reaksiyonlarla artemisinik asit oluşturur.
- Bu süreçte amorphadiene adı verilen önemli bir ara madde oluşur ve bu ara madde üretimi proje için kritik bir aşamadır.

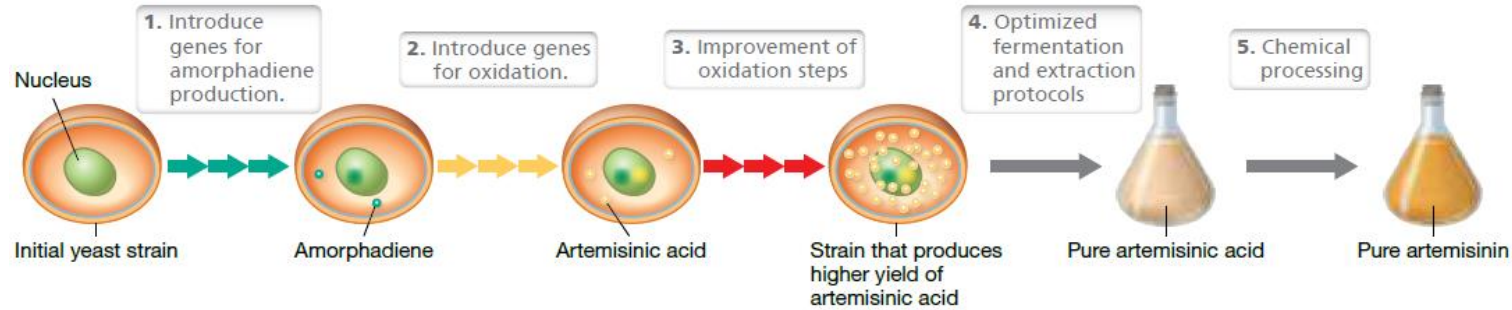
# *E. coli* ile Artemisininin Üretiminde Yaşanan Güçlükler

- İlk taslak, artemisinik asidi fermantasyonla üretebilecek *E. coli* suşları geliştirmeyi amaçlamıştır.
- Araştırmacılar doğal yolu *E. coli*'de çalıştırmak için farklı biobrick kombinasyonları ve modifikasyonlar denemiştir.
- Rekabet eden enzimlerin baskılanması, kodon optimizasyonu ve fermantasyon koşullarının değiştirilmesi gibi çok çeşitli stratejiler uygulanmıştır.
- Ancak hiçbir yaklaşım, artemisinik asidin öncülü olan amorphadiene'i yeterli düzeyde üretememiştir.



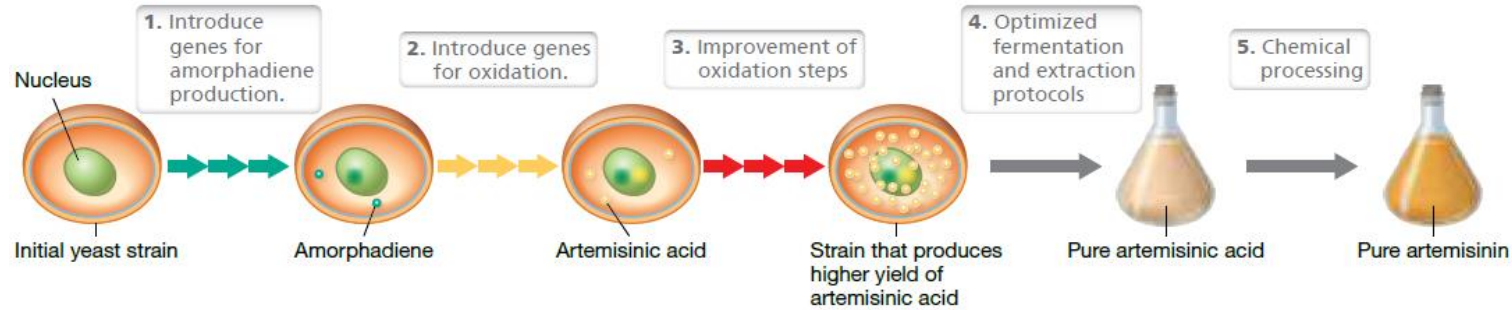
# Maya ile Başarı: *Saccharomyces cerevisiae*

- Gerekli metabolik yolun biobrick'leri, bu kez modifiye edilmiş *Saccharomyces cerevisiae* suşuna aktarılmıştır.
- Karbon akışının son ürüne yönlendirilmesi için maya üzerinde çeşitli metabolik ayarlamalar yapılmıştır.



# Maya ile Başarı: *Saccharomyces cerevisiae*

- Bu mühendislik stratejileri, maya hücrelerinin büyük miktarlarda artemisinik asit üretmesini mümkün kılmıştır.
- Üretilen artemisinik asit, daha sonra kimyasal olarak artemisininine dönüştürülür, ve bu süreç aşağıda gösterilen basamaklara dayanmaktadır.

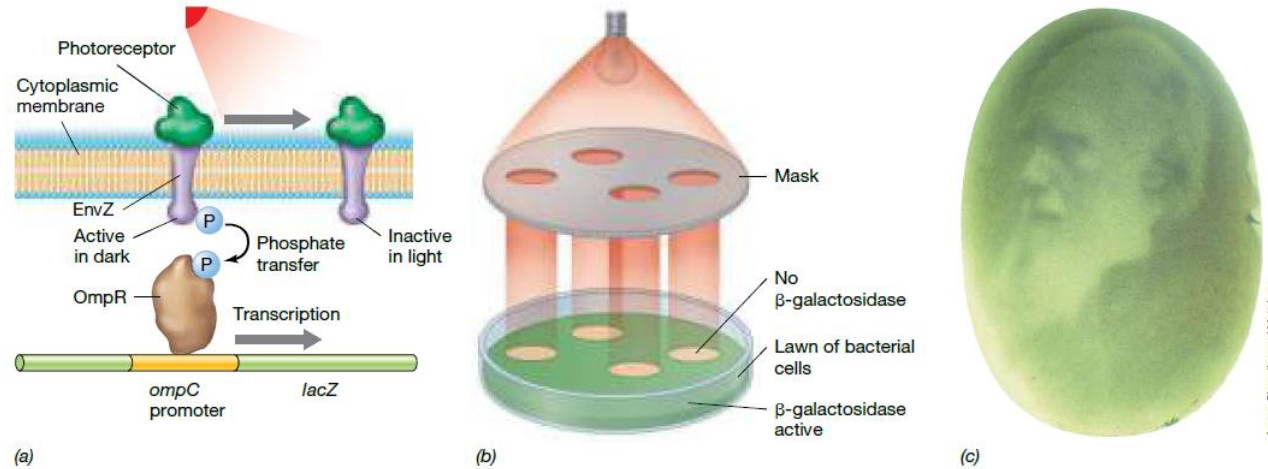


# Sentetik Biyoloji ile Ağrı Kesici Üretimi

- Sentetik biyoloji, güçlü ağrı kesicilerin öncüllerinin mikrobiyal üretiminde de başarı sağlamıştır.
- Araştırmacılar, glikozu kullanarak thebaine sentezleyebilen yeniden tasarlanmış maya suşları geliştirmiştir.
- Bu üretim, bitkilerden, bir sıçandan ve *Pseudomonas* adlı Gram-negatif bir bakteriden gelen toplam 21 heterolog genin maya içine aktarılmasıyla gerçekleştirilmiştir.
- Üretilen thebaine, kimyasal olarak çeşitli analjeziklere dönüştürülerek ilaç endüstrisinde kullanılmaktadır.

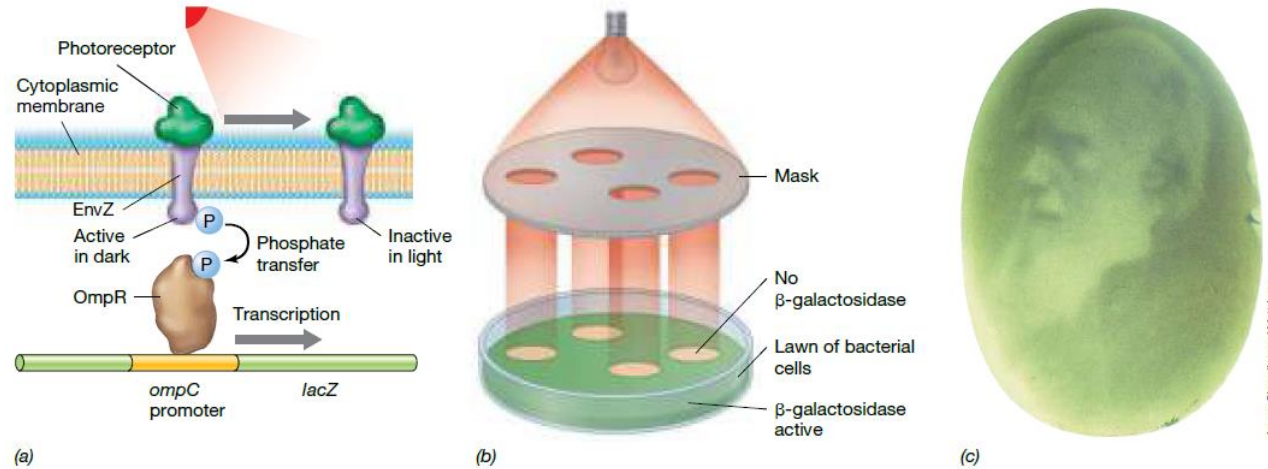
# Sentetik Biyolojide Bir Örnek: Fotoğraf Üreten *E. coli*

- Genetik olarak değiştirilmiş *E. coli* hücreleri, üzerine bir görüntü yönlendirildiğinde ışık ve karanlığa verdikleri yanıtla bir “fotoğraf” oluşturabilmektedir.
- Mühendislik ürünü bu bakteriler, agar yüzeyinde bir çim tabakası oluşturur ve karanlıkta pigment üretirken, ışık gören hücreler pigment oluşturmaz.



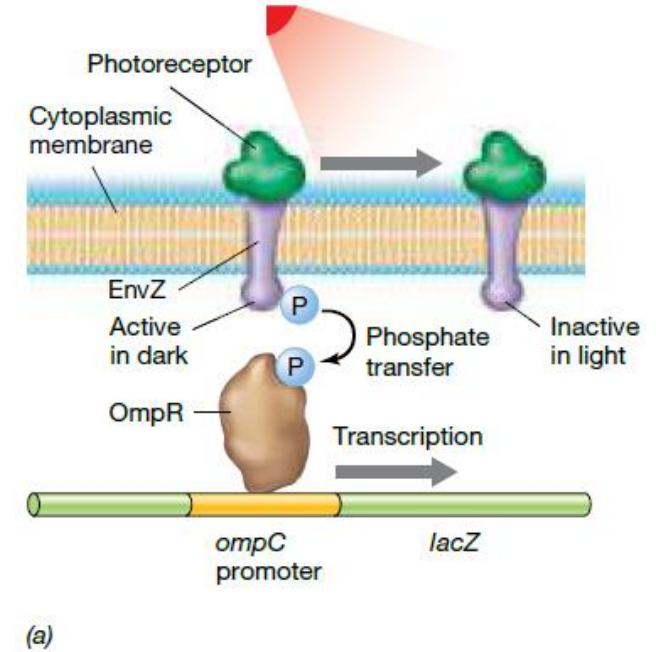
# Sentetik Biyolojide Bir Örnek: Fotoğraf Üreten *E. coli*

- Böylece projeksiyonun karanlıkta kalan bölgeleri koyu, aydınlık bölgeleri ise açık kalarak ilkel bir fotoğraf oluşur.
- Bu yaklaşım, sentetik biyolojinin erken fakat çarpıcı uygulamalarından biri olarak değerlendirilir.



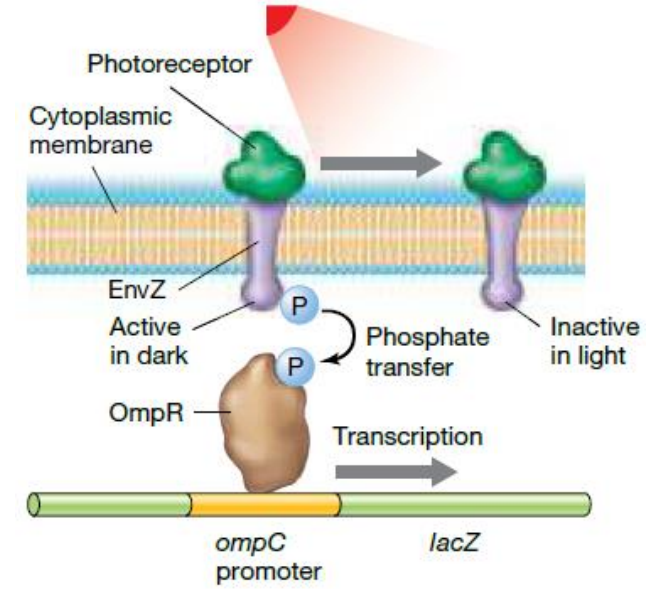
# Fotoğrafik *E. coli* İçin Gerekli Üç Biyobrick

- Sistem, ışığı algılayan ve sinyal ileten bir modül, *E. coli*'de doğal olarak bulunan hem'den fikosiyanobilin sentezleyen bir yol ve karanlıkta pigment üreten bir genin kontrolünü sağlayan modülden oluşmuştur.
- Fotoreseptör, siyanobakteri *Synechocystis*'den alınan fitokrom proteinine ait ışık algılayıcı kısmı içeren bir füzyon proteindir.
- *E. coli* fikosiyanobilin üretmediği için, bu pigmenti sentezleyen biyobrick sisteme özellikle eklenmiştir.
- Üçüncü biyobrick ise karanlıkta aktif hâle getirilerek pigment oluşumunu başlatan enzimin sentezini düzenler.



# EnvZ–OmpR Tabanlı Işık Duyarlı Düzenleme

- Fotreseptör füzyon proteinindeki ikinci kısım, *E. coli*'nin iki bileşenli düzenleme sisteminin sensör proteini olan EnvZ'nin sinyal iletim alanıdır.
- Normal koşullarda EnvZ, OmpR adlı DNA bağlayan proteini fosforile ederek hedef genleri aktive eder.
- Mühendislik ürünü hibrit protein, karanlıkta OmpR'yi aktive edecek, ışıktaki kırmızı ışığın fosforilasyonu engellemesi nedeniyle OmpR'yi aktive etmeyecek şekilde tasarlanmıştır.
- Böylece hedef gen karanlıkta “açık”, ışıktaki ise “kapalı” hâle gelir.

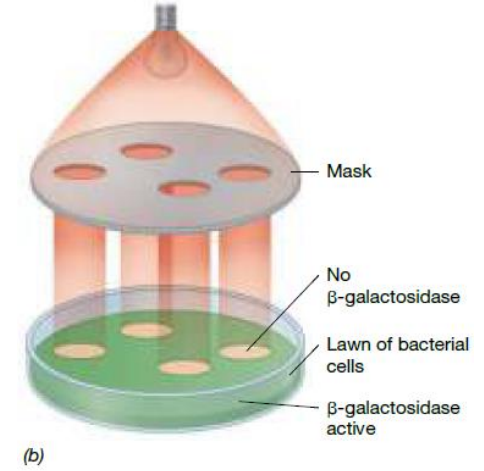


(a)



# Maskeler ve Görüntü Oluşumu

- Petri kabının üzerine bir maske yerleştirildiğinde, maskenin karanlık bıraktığı bölgelerde pigment oluşur ve ışığa maruz kalan bölgelerde pigment oluşmaz (Figür b).
- Bu karşıtlık, bakteriyel tabaka üzerinde maskenin görüntüsüne karşılık gelen bir fotoğrafın oluşmasını sağlar (Figür c).
- Fotoğrafın kontrastı, hücrelerin gördüğü ışık miktarına ve maskenin özelliklerine bağlı olarak değişir.
- Bu yöntem, ışığa duyarlı genetik devrelerin işleyişini görsel olarak değerlendirmek için etkili bir araçtır.



# Pigment Sentezinde lacZ Geninin Rolü

- Pigment oluşumu, *E. coli*'de doğal olarak bulunan  $\beta$ -galaktozidaz enziminin aktivitesine bağlıdır.
- Hedef gen olan lacZ, karanlıkta ifade edilerek enzimin sentezlenmesini sağlar; ışıktaki ise gen ekspresyonu baskılanır.
- Enzim, büyüme ortamındaki X-gal'i parçalayıp galaktoz ve siyah renkte bir boyar madde açığa çıkarır.
- Böylece karanlık bölgelerde siyah pigment oluşur ve fotoğrafın koyu tonları belirginleşir.



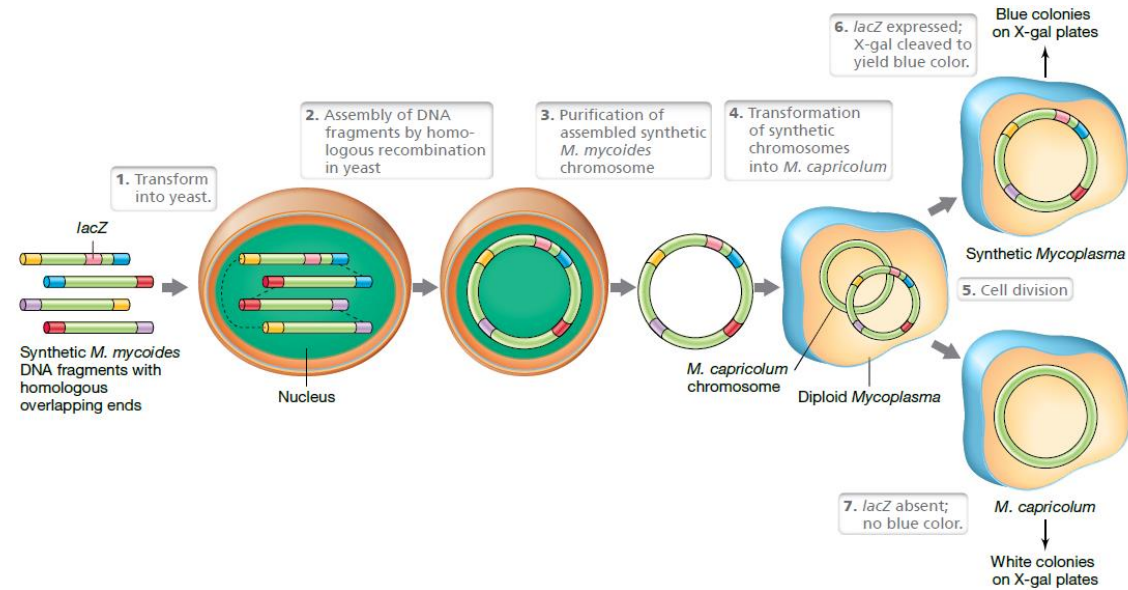
Aaron Chevalier and Matt Levy

# Sentetik Yaklaşımların Katkısı

- Fotoğrafik *E. coli* dijital fotoğraflarla kıyaslanamayacak kadar basit olsa da, bu çalışma sentetik biyoloji için önemli bir temel oluşturmuştur.
- Biobrick'leri bir araya getirme süreci, daha karmaşık biyolojik sistemlerin tasarlanması için gerekli kavramların gelişmesine katkıda bulunmuştur.
- Bu örnek, hücrelerin programlanabilir birer biyolojik araç hâline gelebileceğini göstermiştir.

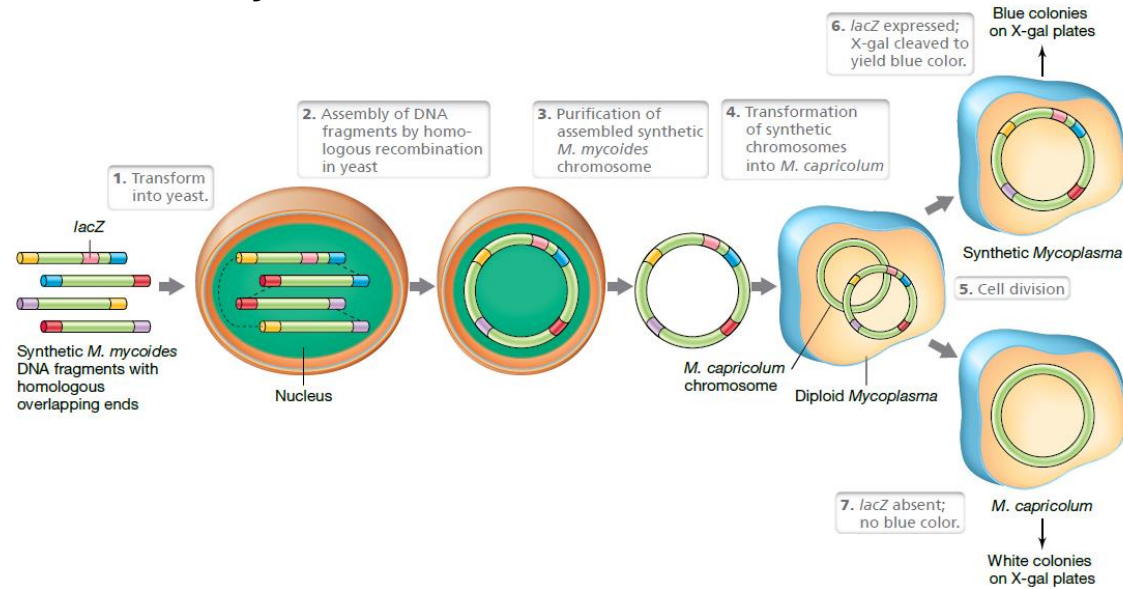
# Sentetik Bir Hücre Üretme Fikri

- Tümüyle sıfırdan bir hücre sentezlemek sentetik biyolojinin en üst hedefi olarak görülür, ancak bu henüz gerçekleşmemiştir.
- 2010 yılında buna yakın bir başarı elde edilerek “sentetik” bir bakteri oluşturulmuştur.



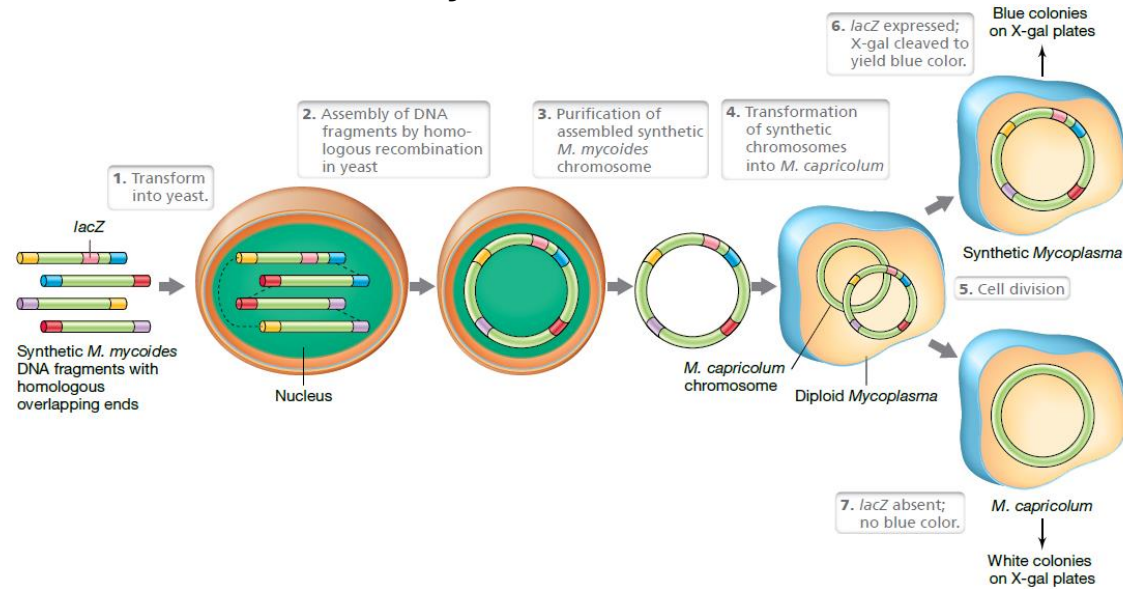
# Sentetik Bir Hücre Üretme Fikri

- Bu çalışma, farklı biyobrick'lerin bir araya getirilmesinden değil, bilinen bir genom dizisinden yapay bir genomun sentezlenip başka bir türe aktarılmasından oluşmuştur.
- Böylece canlı bir hücre, tamamen sentetik bir kromozomu kullanarak yaşamını sürdürebilmiştir.



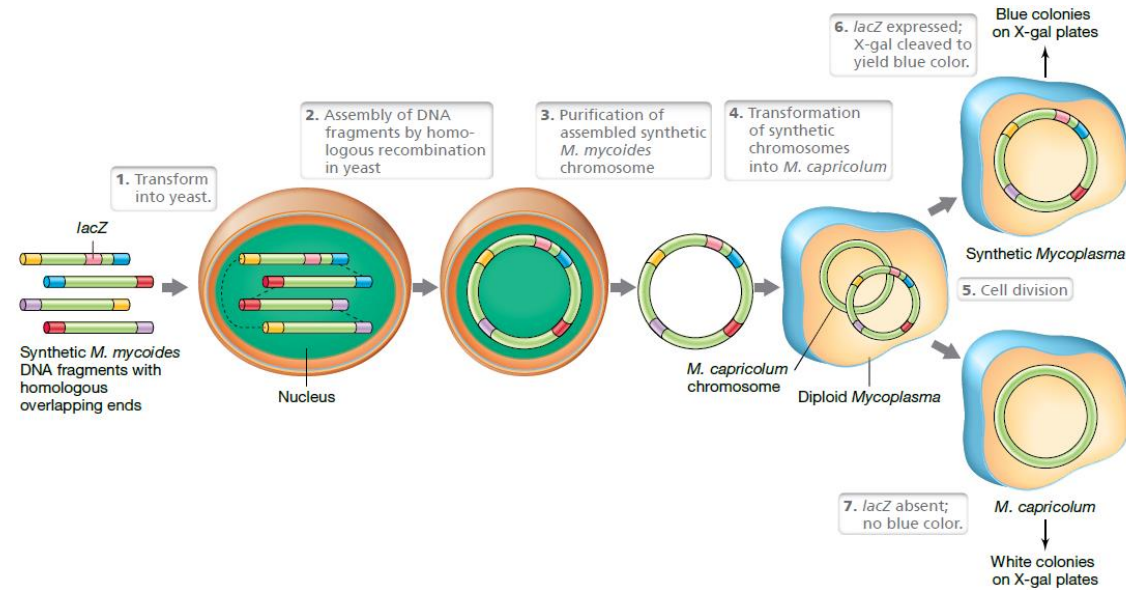
# 1.08 Mbp'lik Sentetik Genomun Oluşturulması

- *Mycoplasma mycoides*'in 1.08 milyon baz çifti uzunluğundaki halkasal genomu, homolog uçlar içeren lineer DNA parçalarının maya hücrelerinde rekombinasyonu ile sentetik olarak birleştirilmiştir.
- Tamamen monte edilen sentetik kromozom saflaştırılıp *Mycoplasma capricolum* hücresine aktarılmıştır.



# 1.08 Mbp'lik Sentetik Genomun Oluşturulması

- Sentetik kromozom, *lacZ* adlı bir raportör geni içerdiği için bu geni taşıyan hücreler X-gal ile mavi koloni oluşturmuş ve böylece ayrıştırılabilmıştır.
- Mavi kolonilerdeki hücreler incelendiğinde, tüm özelliklerinin doğal *M. mycoides* hücrelerine benzediği görülmüştür.



# Genom Transplantasyonunun Önemi

- Bu deney, tüm genomun bir türden başka bir türe aktarılmasının mümkün olduğunu göstermiştir.
- Aynı zamanda sentetik biyolojinin gelecekte ne kadar geniş imkânlar sunabileceğine dair önemli bir öngörü sağlamıştır.
- Sentezlenen genomlar aracılığıyla hücre özelliklerinin yeniden programlanabileceği anlaşılmıştır.
- Bu yaklaşım, insanlık ve çevre için pek çok potansiyel fayda vadeden sentetik biyoloji uygulamalarına kapı aralamaktadır.

# CRISPR ve Genom Düzenlemenin Temelleri

- CRISPR sistemleri, Bakteri ve Archaea hücrelerinde yabancı DNA'ya karşı savunma sağlayarak genom bütünlüğünü korur.
- *Streptococcus pyogenes*'deki CRISPR/Cas9 sistemi, belirli DNA dizilerini tanıyıp kesebildiği için hızla biyoteknolojik bir araç hâline gelmiştir.
- Bu sistemin optimize edilmesi, genomlara istenen noktadan müdahale edilmesini sağlayarak genom düzenleme teknolojisini kökten değiştirmiştir.
- CRISPR/Cas9, sentetik biyolojide hassas genetik değişiklikler yapmak için kullanılacak güçlü bir platform yaratmıştır.

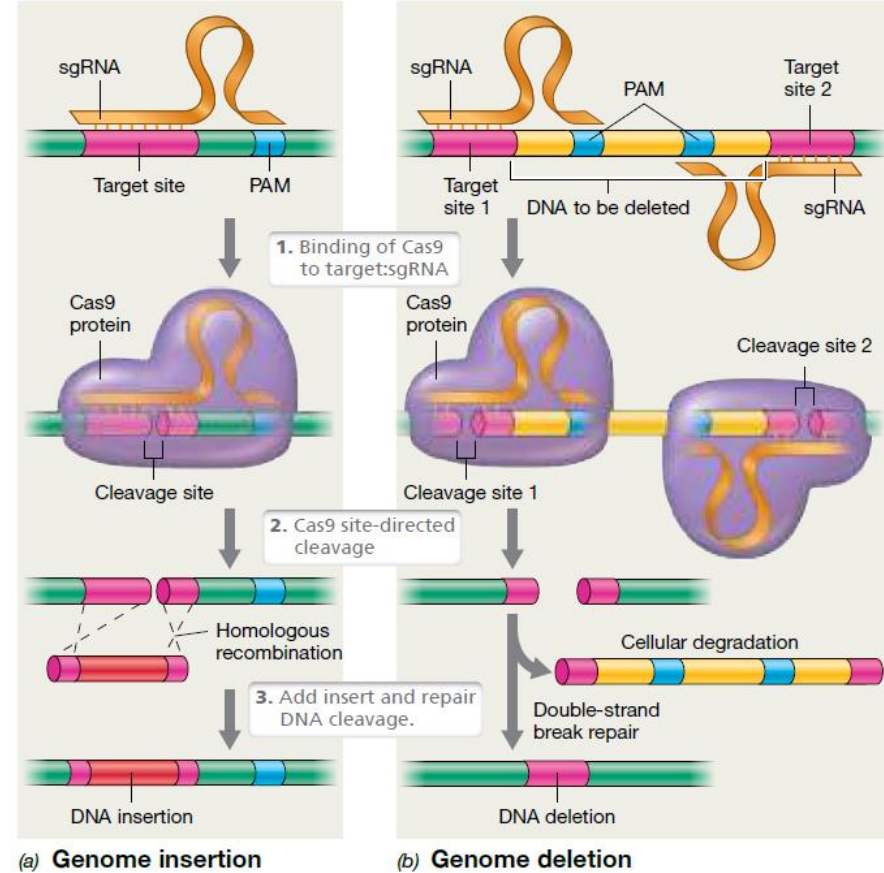


# CRISPR/Cas9 ile Genom Düzenlemenin Kapsamı

- CRISPR/Cas9, canlı ökaryotik hücrelerde genomu değiştirme konusunda bugüne dek elde edilmiş en kesin ve etkili yöntemlerden biridir.
- Bitkilerde, hayvan embriyolarında ve insan hücre hatlarında başarıyla uygulanmıştır.
- Sistemin sağladığı hassasiyet, belli genom bölgelerine yeni DNA parçalarının eklenmesine de olanak vermektedir.
- Bu özellikler, CRISPR teknolojisini sentetik biyolojinin gelecekteki gelişmeleri için vazgeçilmez bir araç yapmaktadır.

# CRISPR–Cas Sisteminin Hedef Tanıma Mekanizması

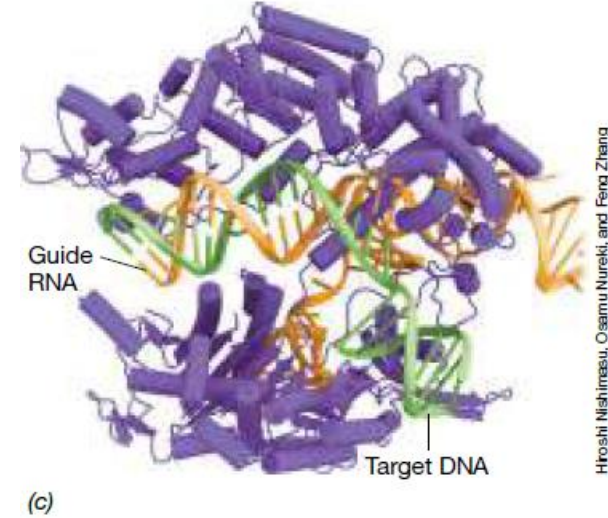
- CRISPR sistemleri, crRNA'ların hedef nükleik asitle tamamlayıcı bağlanması sayesinde Cas proteinlerini yönlendirerek endonükleaz aktivitesi oluşturur.
- Tasarlanmış bir RNA molekülü, *Streptococcus* Cas9 proteininin hedef DNA dizisine yönlendirilmesini sağlayarak genomda istenen bölgede kesim yapılmasına imkân tanır.
- Yapılan kesim sonrası DNA'nın ya ligasyonu gerçekleşerek bir gen bölgesi çıkarılmış olur ya da yeni DNA parçaları eklenebilir.





# sgRNA ve Cas9'un Birlikte Çalışması

- Gen düzenlemede kullanılan sentetik kılavuz RNA'ya (sgRNA) bağlanan *S. pyogenes* Cas9 proteininin hem sgRNA'yı hem de hedef DNA'yı tanıdığı yapı yandaki figürde gösterilmiştir.
- Cas9'un hedef DNA'yı kesebilmesi için, hedef bölgenin yakınında kısa bir PAM dizisi bulunmalıdır.
- Cas9, PAM dizisi varsa iki endonükleaz domaininin iş birliğiyle her iki DNA zincirini keserek çift zincirli kırıkları oluşturur.

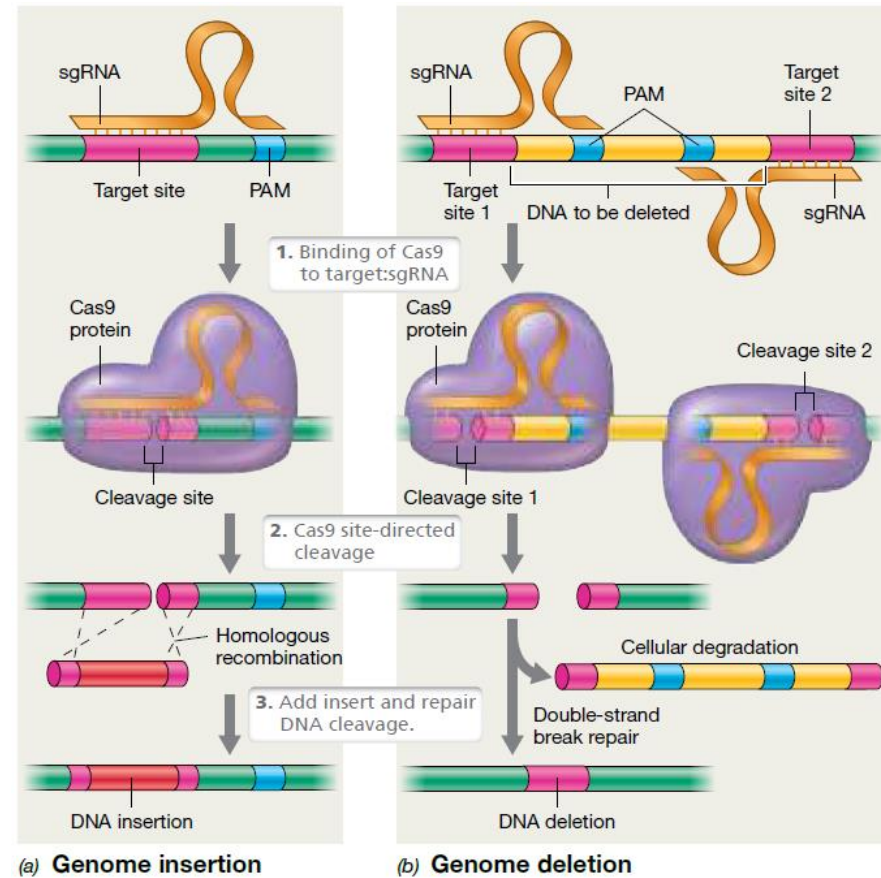


# CRISPR Bileşenlerinin Hücreye Aktarılması

- sgRNA ve Cas9'u kodlayan genler çoğunlukla güçlü bir promotör kontrolünde bir plazmite klonlanarak hedef hücrelere aktarılır.
- Alternatif bir yaklaşım olarak, sgRNA ve Cas9 mRNA'sı hücre dışında üretilip doğrudan hedef hücrelere enjekte edilir.
- Her iki durumda da hücreye verilen bu materyaller, genom düzenleme sürecinin başlamasını sağlar.

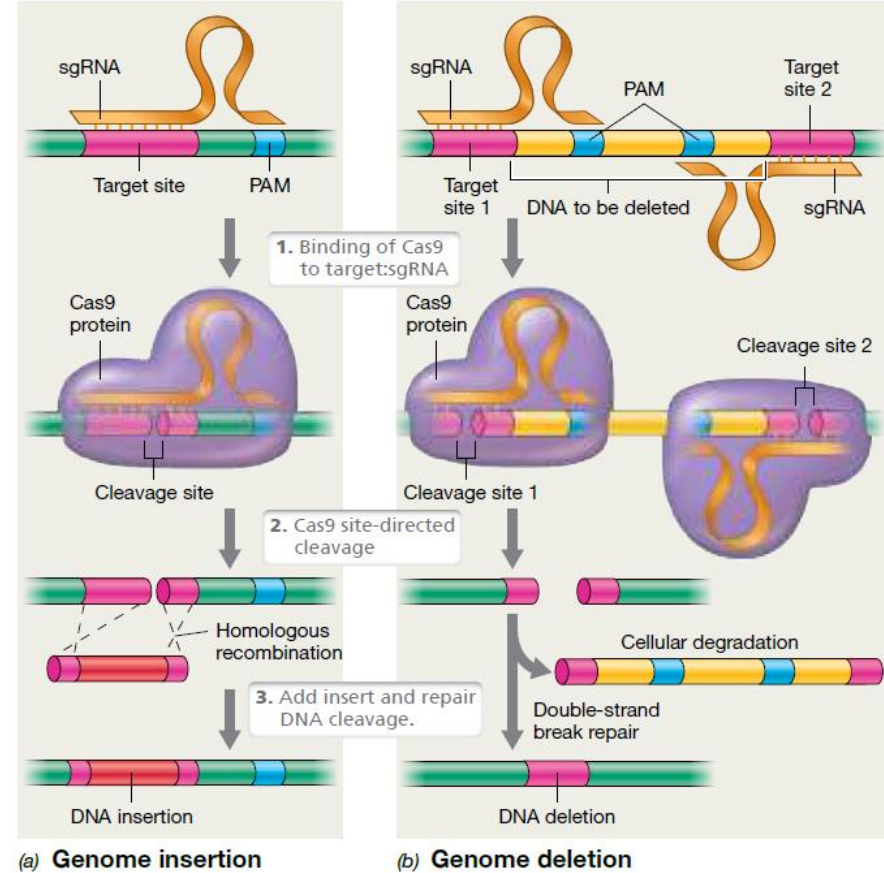
# PAM Dizisinin Sınırlılıkları ve Cas Proteinlerinin Seçimi

- Kesim yapılacak bölgenin yakınında PAM dizisinin bulunması çoğu zaman tek sınırlayıcı faktördür ancak yalnızca üç nükleotidden oluştuğu için genomlarda sıkça rastlanır.
- Farklı bakterilere ait CRISPR sistemleri farklı PAM dizilerini tanır ve bu nedenle gerektiğinde alternatif Cas proteinleri kullanılabilir.
- Bir DNA bölgesinin çıkarılabilmesi için hedef bölgeyi çevreleyen iki kesim noktasına uygun sgRNA tasarlanması gerekir.



# Kesim Sonrası DNA Onarımının Yönlendirilmesi

- Cas9'un yaptığı kesim sonrası yeni DNA'nın eklenmesi, hücrenin kendi homolog rekombinasyon mekanizmasıyla gerçekleşir.
- Eklenen DNA parçasının, kesim bölgesine homolog diziler içermesi genom içine doğru rekombinasyonu mümkün kılar.
- Eğer amaç yalnızca iki kesim noktası arasındaki bölgenin çıkarılması ise hücrenin non-homolog çift zincir onarım yolu devreye girerek DNA'nın yeniden ligasyonu gerçekleşir.



# CRISPR Düzenlemenin Uygulama Alanlarının Yaygınlaşması

- 2013'ten bu yana CRISPR genom düzenlemesinin kullanım alanları hızla artmış ve farklı organizmalarda gen düzenleme olanakları geliştirilmiştir.
- Cas9 geninin ilgili organizmaya uygun kodonlarla optimize edilmesi ve hedef gene özgü sgRNA tasarlanmasıyla neredeyse her DNA dizisi düzenlenebilir hâle gelmiştir.
- Bu gelişmeler, temel biyolojik araştırmalardan tarımsal iyileştirmelere kadar geniş bir yelpazede yeni uygulamaların ortaya çıkmasını desteklemiştir.



# Bitkilerde CRISPR Uygulamaları

- CRISPR/Cas9 sistemi pirinç, sorgum, buğday gibi bitkiler yanında domates gibi dikotillerde de gen düzenleme amacıyla kullanılmaktadır.
- Domateste yaprak şeklini iğnemsî hâle getiren bölgenin hedeflenmesiyle elde edilen mutant fenotip yandan gösterilmektedir.
- Bu çalışmada Cas9 ve sgRNA'yı kodlayan DNA, *Agrobacterium* aracılığıyla Ti plazmid sistemi kullanılarak bitki hücrelerine aktarılmıştır.



Joyce Van Eck and Zachary Lippman



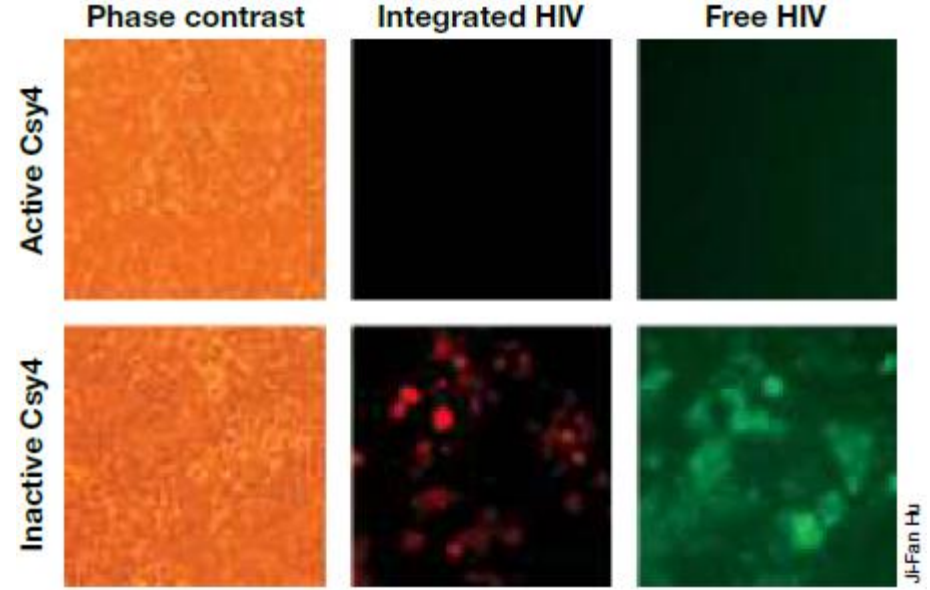
Yijun Qi and Biao Ding

# CRISPR ile Bitki Genomunun Kalıcı Düzenlenmesi

- Bitkilerde CRISPR ile oluşturulan mutasyonların kalıcı olması, bilinmeyen genlerin fonksiyonlarının araştırılmasında büyük avantaj sağlar.
- Bu yöntem, meyve ve sebzelerin besin değerlerinin ve diğer özelliklerinin geliştirilmesine yönelik potansiyel uygulamalar sunmaktadır.
- CRISPR'ın bitki biyolojisinde yaygınlaşması, gelecekte tarımsal iyileştirme programlarının hızını artıracaktır.

# Viral Genomların CRISPR ile Hedeflenmesi

- Cas9 sistemi, HIV genomunun enfekte insan hücrelerinden çıkarılmasını sağlayacak şekilde yeniden programlanmıştır.
- *Pseudomonas* kaynaklı Csy4 proteini, uzun CRISPR transkriptlerini işleyen bir endoribonükleazdır.
- Csy4'ün modifiye edilmiş bir formu, enfekte hücrelerde serbest HIV RNA'sını tanıyıp yok etmek için geliştirilmiştir.



# RNA Virüslerinin Hedeflenmesinde Alternatif CRISPR Sistemleri

- *Francisella novicida*'ya ait CRISPR/Cas9 sistemi, hepatit C virüsünün tek zincirli RNA genomunu hedeflemek üzere yeniden programlanmıştır.
- Bu uygulama, farklı Cas proteinlerinin yalnızca DNA'yı değil RNA'yı da hedefleyebileceğini göstermektedir.
- CRISPR teknolojisinin virüs biyolojisindeki kullanımı, gelecekte yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine zemin hazırlamaktadır.



# Çoklu Genom Düzenleme ve Uygulama Örnekleri

- CRISPR sistemleri tek bir hedef bölgeyi değil, aynı anda birçok genetik lokusu düzenleyebilecek kapasiteye sahiptir.
- Bunun dikkate değer bir örneği, domuz hücrelerinden 62 kopya porcine endogenous retrovirus genomunun çıkarılmasıdır.
- Bu virüslerin ortadan kaldırılması, domuz organlarının insan nakillerinde kullanılabilmesini engelleyen önemli biyolojik kısıtlamalardan birini azaltmaktadır.

# Etik Tartışmalar ve İnsan Embriyolarında CRISPR Kullanımı

- Günümüzde CRISPR genom düzenlemesinin sınırlamalarının azlığı, tekniğin giderek daha geniş bir alanda uygulanmasına olanak tanımaktadır.
- Canlı doğumla sonuçlanmayacak insan embriyolarının düzenlenebilmesi, alanın geleceğine dair önemli etik tartışmalar doğurmuştur.
- Bu teknik, gelecekte kalıtsal hastalıkların bebeğin doğumundan önce ortadan kaldırılmasını mümkün kılacaktır.

# Genetiği Değiştirilmiş Organizmaların evresel Riskleri

- Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalar değerli ürünlerin sentezi için önemli fırsatlar sunsa da çevreye kaçmaları durumunda genlerini doğal popülasyonlara aktarabilecekleri endişesi devam eder.
- Bu olası yayılımın, doğal topluluklarda öngörülemeyen biyolojik sonuçlar doğurabileceği düşünülmektedir.
- Bu nedenle, genetiği değiştirilmiş organizmaların (GDO'ların) güvenli biçimde sınırlandırılması sentetik biyolojide kritik bir araştırma alanı hâline gelmiştir.

# GDO'lar İçin Erken Dönem Biyogüvenlik Yaklaşımları

- İlk biyogüvenlik stratejilerinden biri, büyümek için belli bir besine ihtiyaç duyan oksotrof mutantların kullanılmasıydı.
- Ancak doğada bu mutantlar, diğer organizmaların metabolitlerinden yararlanarak büyüebildikleri için bu yaklaşım güvenilir bir çözüm oluşturamadı.
- Ayrıca oksotrofların geri mutasyonla yabani tipe dönerek besin bağımlılığını kaybetme ihtimali de her zaman vardı.

# Toksin Temelli Biyokontrol Yaklaşımı

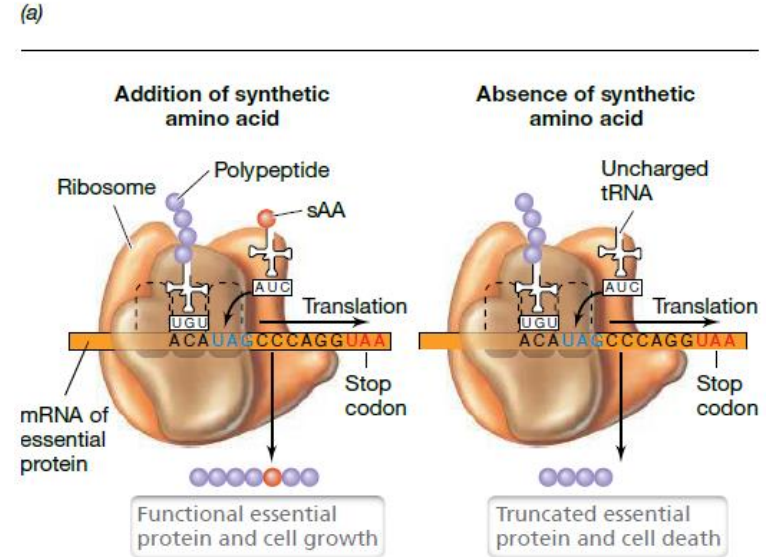
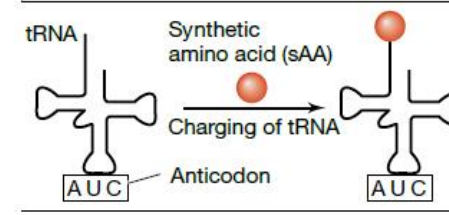
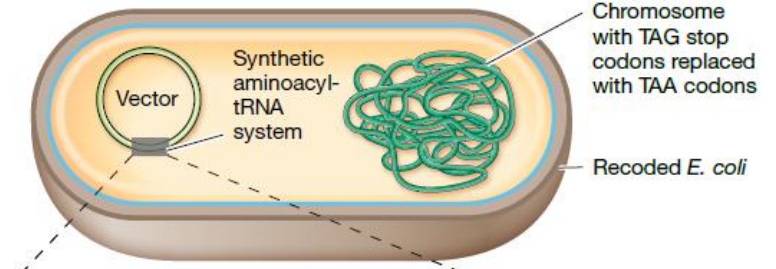
- Bazı bakteriler stres koşullarında büyümeyi yavaşlatan toksinler ürettiğinden, bu mekanizma da kaçan GDO'ları durdurmak için önerilmişti.
- Teorik olarak, biyoreaktörden kaçan bir GDO'nun toksin sistemi devreye girerek hücreyi geri döndürülemez bir durgunluk hâline sokacaktı.
- Fakat doğal ortamlardaki rekabet baskısı, toksin genlerini hızla etkisizleştiren mutasyonları seçebildiği için bu strateji sürdürülebilir bir güvenlik sağlamadı.

# Erken Yaklaşımların Eksik Kaldığı Noktalar

- Ne oksotrof kullanımına ne de toksin temelli sistemlere dayalı yöntemler, GDO güvenliğini tam olarak garanti edemedi.
- Bu yöntemlerin hiçbiri, endüstriyel atık akışlarıyla çevreye sızan DNA'nın başka mikroorganizmalara yatay gen transferiyle geçme riskini de engelleyemez.
- Bu nedenle, daha kapsamlı ve sağlam bir biyogüvenlik çözümü geliştirmek amacıyla sentetik biyolojinin imkânlarına başvurulmuştur.

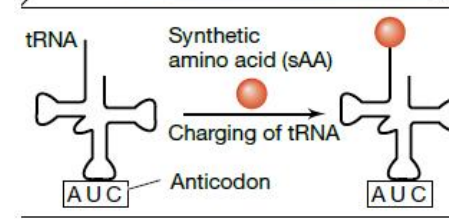
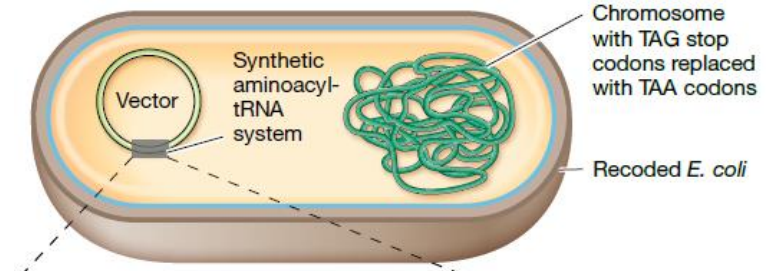
# Genomu Yeniden Kodlayarak Biyogüvenlik Sağlama Fikri

- Bu yeni yaklaşımda, GDO'nun genomu yeniden düzenlenir ve organizmanın büyüebilmesi yalnızca ortama sentetik bir amino asit eklenmesine bağlı hâle getirilir.
- Bu sistem, laboratuvar dışına kaçan bakterinin doğal ortamda yaşamını sürdürememesini sağlayacak şekilde tasarlanmıştır.
- Bu yenilikçi stratejinin çalışma mantığı yanda özetlenmiştir.

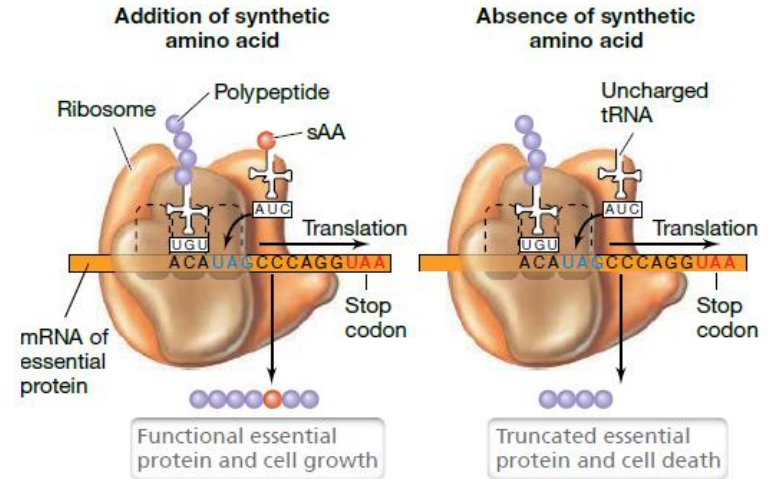


# Stop Kodonlarının Yeniden Düzenlenmesi

- İlk adımda, *Escherichia coli* genomundaki tüm TAG stop kodonları TAA ile değiştirilmiş ve böylece TAG kodonu boşa çıkarılmıştır.
- Aynı zamanda, UAG kodonunu tanıyarak translasyonu durduran salıverme faktörü 1 genomdan çıkarılmıştır.
- Bu düzenleme, proteinlerin doğru uzunlukta üretilmesini sağlarken TAG kodonunun yeni bir görev için yeniden atanabilmesine de olanak tanımıştır.



(a)

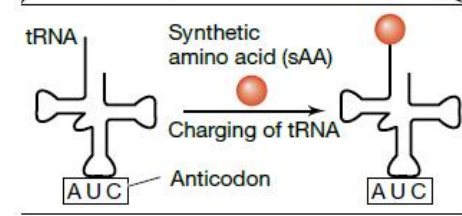
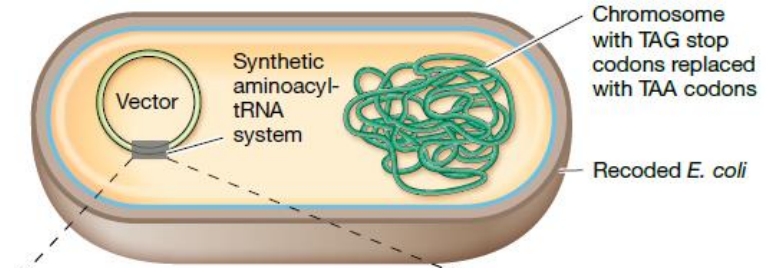


(b)

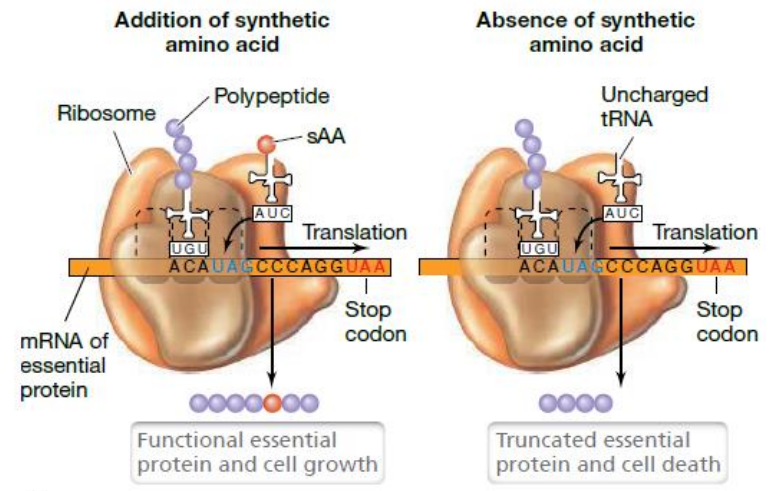


# Sentetik Amino Asite Bağımlılık Oluşturulması

- Mühendislik aşamasında, sentetik amino asidi tanıyan bir aminoasil-tRNA sentetaz ve AUC antikodonlu bir tRNA vektör üzerinden hücreye kazandırılmıştır.
- Böylece AUC antikodonlu tRNA'lar sentetik amino asidi taşıyarak TAG kodonunun yeni anlam kazandığı protein pozisyonlarına bu amino asidi yerleştirebilir.
- Ardından bazı hayati genler, işlevlerini bozmayacak pozisyonlarda TAG kodonu içerecek şekilde yeniden düzenlenmiştir (Figür a).



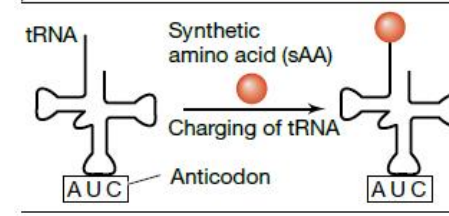
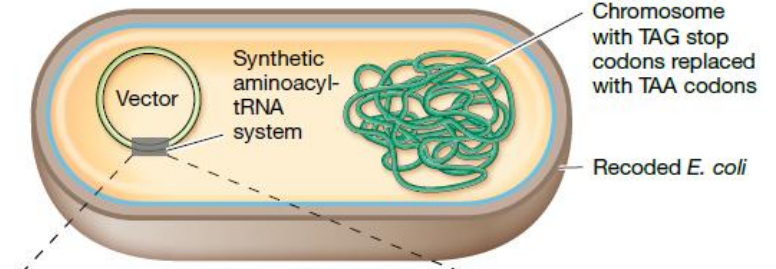
(a)



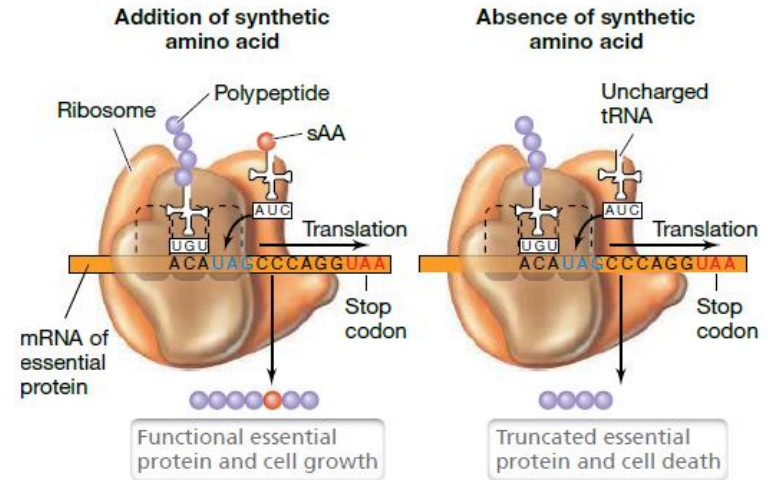
(b)

# Sentetik Amino Asit Olmadan Büyüyemeyen Hücre Tasarımı

- Bu yeniden kodlanmış bakteride, UAG kodonu içeren mRNA'ların doğru şekilde translasyona uğraması için mutlaka sentetik amino asidin bulunması gerekir.
- Eğer çevrede bu amino asit yoksa, UAG kodonu görüldüğünde yüklü olmayan tRNA'lar ribozoma girer ve translasyon durarak işlevsiz, kısalmış proteinler oluşur (Figür b).
- Hayati proteinlerin üretilmemesi hücre ölümüne yol açar ve böylece GDO'nun yaşam döngüsü tamamen insan kontrolüne bağlı hâle gelir.



(a)



(b)



# Sistemin Mutasyonlara Karşı Dayanıklılığı

- TAG kodonu üç ayrı esansiyel gene yerleştirildiği için, hücrenin sentetik amino aside olan bağımlılığını ortadan kaldıracak mutasyonların aynı anda gerçekleşmesi son derece düşük bir olasılıktır.
- Bu durum, biyogüvenlik sisteminin kaçan GDO'ların çevrede hayatta kalmasını neredeyse imkânsız hâle getirdiğini gösterir.

# Sentetik Biyolojinin Bir Adım Ötesi: Kontrollü Genom Düzenleme

- Araştırmacılar, yalnızca organizmaları yeniden kodlamakla kalmayıp CRISPR sistemini de belirli koşullar altında rekombinant DNA'yı seçici biçimde kesip çıkaracak şekilde tasarlamaya başlamıştır.
- Bu tür gelişmeler, hem üretim süreçlerinde daha güvenli ve kontrollü GDO kullanımını hem de tıp, tarım ve çevre yönetimi gibi alanlarda daha geniş uygulama imkânlarını beraberinde getirir.
- Sentetik biyolojinin ilerleyişi, GDO'ların insanlık için kritik sorunları çözmeye güvenli bir araç olarak kullanılabilmesini her geçen gün daha da mümkün hâle getirmektedir.

# Teşekkür ederim

Prof. Dr. Bektaş TEPE

