

Biyoteknolojinin Önemi , Kısa Tarihçesi, Restriksiyon Endonukleazlar ve RNA'dan cDNA Elde Edilmesi

Prof. Dr. Mustafa Arda

Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi
Temel Mikrobiyoloji [1](#)

[01. Genel Bilgiler](#) _

[02. Biyoteknoloji ve Rekombinant DNA Teknolojisinin Çok Kısa Tarihçesi](#) _

[03. Bazı Restriksiyon Endonukleazlar](#) _

[04. RNA'dan cDNA Elde Edilmesi](#)

01. Genel Bilgiler

İnsanoğlu, eskiden beri, hayvanlarda ve bitkilerde özel seleksiyon yöntemleri kullanarak, genetik yapıyı değiştirmeye çalışmış ve bir çok konuda da başarıya ulaşmıştır. Ancak, bu tarzda, yeni ve istenilen karakterde nesillerin oluşturulması çok zaman almakta ve hatta çoğu zaman sonuçlar arzu edilen yönde gitmemektedir.

Son yıllarda geliştirilen ileri tekniklerin biyoteknolojiye uygulanması, kısa sürede yeni türde ve istenilen karakterde organizmaların meydana getirilmesine büyük yardımları olmuş ve teknikler çok daha ileri düzeye çıkarılmıştır. Böylece, biyoteknolojinin etkinliği ve ufukları çok fazla gelişmiş ve genişlemiştir.

Çok özet olarak, biyoteknoloji, genetik materyallerde moleküller düzeyde yapılan manipulasyonlarla yeni ve istenilen fenotipte organizmalar ve faydalı ürünler elde etmektir. Bu gün biyoteknoloji denildiğinde, ilk akla gelen, embriyonik ve genetik manipulasyonların da içinde bulunduğu "Moleküler genetik ve Rekombinant DNA teknolojisidir. Bu teknolojiler yardımı ile, organizmaların genomlarında (DNA veya RNA) bulunan bütün informasyonları ve şifreleri değiştirmek; aynı veya farklı cinsten organizmalara DNA sekansları veya genleri aktarmak; istenilen DNA sekanslarını veya baz sıralarını çıkarmak, genlerin birbirlerine olan konumlarını ve ilişkilerini saptamak; transgenik hayvanlar, mikroorganizmalar elde etmek, yeni genotipte ve fenotipte organizmalar hibrid hücreler oluşturmak; hücre füzyonları yapmak, antikorların bakteriler tarafından üretilmesini sağlamak, insan ve hayvanların sağlığında çok önemli rolleri olan biyoteknolojik aşılarda, proteinler, enzimler, antibiyotikler, hormonlar, sitokinler, monoklonal antikorlar, teşhis, tedavi, koruma ve araştırma amacı ile kullanılan diagnostik maddeler, kimyasallar, vs. elde etmek konularında biyoteknolojik yöntemlerden çok fazla yararlanılmaktadır. Bu yöntemler yardımı ile, doğal koşullarda, ancak, yüz binlerce yıl içinde meydana gelebilecek mutasyonları, in vitro koşullarda kısa bir süre içinde oluşturmak olanak dahiline girmiştir.

Yukarıda açıklanan çok önemli konular nedeniyle, biyoteknoloji, multidisipliner bir karakter gösterir. Her sahanın kendine özgü yöntemleri bulunmaktadır. İnsan ve veteriner hekimlik, tarım, orman, endüstri, çevre, gıda ve diğer bir çok alanda biyoteknolojik yöntemlerden oldukça fazla yararlar sağlanmaktadır.

02. Biyoteknoloji ve Rekombinant DNA Teknolojisinin Çok Kısa Tarihçesi

1960 Restriksiyon endonukleazların bulunması

1969 *E. coli* 'de EcoRI'in varlığının belirlenmesi

1970 Revers transkriptase enziminin saptanması,

- İn vitro gen sentezi

1972 İlk rekombinant DNA molekülünün hazırlanması

1973 Plasmidlerin gen klonlamasında kullanılması

1975 Gen spesifik problemlerle parental DNA'nın saptanması

1977 DNA baz sıralarının belirlenmesi

- Somatostatinin rDNA teknolojisi ile üretimi

1978 İnsan genomik kütüphanesinin hazırlanması

1979 rDNA ile insülin hazırlanması

1979 Şap virusunun viral antijeninin *E. coli* 'de klonlanması

1982 İnsan insülinin *E. coli* 'de klonlanması ve ticarete sunulması

- İnsan kanser genin izolasyonu, klonlanması ve karakterizasyonu

- Rat büyüme hormonunun fare embriyosuna transferi

1985 Tütün bitkisinin herbicide (glyphosate) dirençli hale getirilmesi

- PCR tekniğinin geliştirilmesi

1987 Farelerdeki genetik hastalığın (shiverer mutasyon) fonksiyonel genin fare embriyolarına verilmesi ile tedavisi

1988 Genetik manipulasyonla elde edilen soya fasulyesinin üretimi

- Gen tabancasının (gene gun) geliştirilmesi

1990 İlk fertil mısırın üretimi

1991 Transgenik domuz ve keçinin elde edilmesi (insan hemoglobini üreten)

- İnsanlarda kanserin tedavisinde genlerin kullanılması

Biyoteknoloji teriminin kullanılması 1920•li yıllardan sonra başlar. Ancak, biyoteknoloji ile ilgili uygulamaların tarihi daha eskilere gitmektedir. Şöyle ki, ekmek, yoğurt, alkollü içki, sirke, peynir, vs. yapımında mikroorganizmaların kullanılması, biyoteknoloji içinde kabul edilmektedir.

Genom üzerinde, diğer bir ifade ile, genetik düzeyde manipulasyonları kapsayan uygulamalar ve çalışmalar, 1960•lı yılların sonlarına doğru Werner Arber ve Hamilton Smith tarafından bazı mikroorganizmalarda restriksiyon endonukleazların bulunması ve moleküler genetikte kullanılması ile başlamıştır denebilir. Çünkü, bu enzimler çift iplikcikli DNA'larda belirli yerlerden kesmeler yapabilmekte ve böylece de istenilen gen veya DNA sekansları kolaylıkla çıkarılabilmektedirler.

03. Bazı Restriksiyon Endonukleazlar

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde restriksiyon enzimi sentezleme yeteneğine sahiptirler. Bunların, bakterilerde esas görevi, dışardan hücrelere giren ve bazı özel gen veya markerler taşıyan genetik materyalleri ayrıştırarak hücrelerde mutasyonlar meydana getirmesine mani olmak ve böylece, türlerin genetik karakterlerinin stabilitesini korumaktır.

Restriksiyon endonukleazlar çift iplikcikli DNA da yaptıkları kesimlerin özelliklerine göre başlıca 3 gruba ayrılmaktadırlar.

Tip I: Bu grupta bulunan restriksiyon enzimleri büyük bir kimyasal kompleksiteye sahiptirler. Bunlar, DNA üzerinde spesifik sekansları tanırlar fakat başka yerlerden ve değişik uzunluktan keserler. Ayrıca, bu enzimler hem endonuklease ve hem de metilasyon yapma aktivitesine sahiptirler. Böylece DNA'daki kesim yerlerini modifiye ederek genomu korurlar. Bu gruptaki enzimler, genetik manipulasyonlarda güvenle kullanılamazlar. Örn, EcoAI, EcoBI, EcoDI, EcoK, vs. gibi.

Tip II: Bu gruptaki enzimler, çift iplikcikli DNA' da spesifik yerlere bağlanırlar ve belli bir uzunlukta (4-7 baz çifti kadar) iki iplikcik te kesmeler yaparlar. Bu enzimler rekombinant DNA teknolojisinde veya diğer genetik manipulasyonlarla güvenle kullanılabilirler. Bakterilerden çok sayıda Tip 2 enzim elde edilmiş ve pürifiye edildikten sonra biyoteknolojik çalışmalarda kullanılmak için ticarete sunulmuştur.

Tip III: Bu enzimler de etkinlik bakımından Tip I'e benzerler. Bu nedenle de kullanım alanları çok az veya yoktur.

Genetik manipulasyonlarda yararlanılan başlıca Tip II restriksiyon endonuklease (RE) enzimleri ve bunlara ait bazı özellikler aşağıda kısa olarak belirtilmiştir. Eğer bir bakteri birden fazla RE sentezliyorsa Romen rakamı ile ifade edilirler (I, II, vs.) .Eğer, RE, bir R plasmidinde ise, o zaman büyük R harfi de ilave edilir.

Bölünen DNA segmentinin iki ucunda, birbirleriyle veya aynı uçlara sahip yabancı gen DNA segmentinin uçlarıyla birleşmeye hazır iki yapışkan uç meydana gelir.

2) Küt uç oluşturanlar: Bazı enzimler de çift iplikcikli DNA'da kesimler yaparak küt uçlar oluştururlar.

Aşağıdaki çizelgede bu tür enzimler, kesim yerleri ve enzimleri sentezleyen mikroorganizma adları bildirilmiştir.

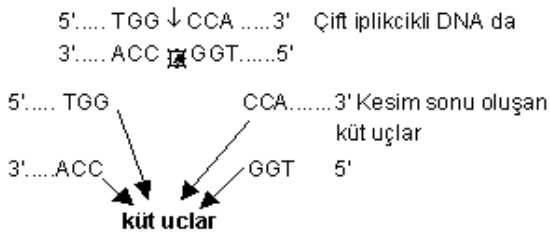
Etken kesme	Enzim	Tanıma ve
4 baz tanıyanlar		

<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Acc II	5'...CC/CG.....3'
<i>Aerobacter luteus</i>	Alu I	5'...AG/CT.....3'
<i>Haemophilus aegypticus</i>	Hae III	5'...GG/CC.....3'
<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	Rsa I	5'...GT/AC.....3'

6 baz tanıyanlar

<i>Brevibacterium albidum</i>	Bal I	5'...TGG/CCA...3'
<i>Deinococcus radiophilus</i>	Dra I	5'...GTT/AA.....3'
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Hpa I	5'...GTT/AAC...3'
<i>Proteus vulgaris</i>	Pvu II	5'...CAG/CTG...3'

Bu tür enzimlerden, Örn., Bal I, çift iplikcikli DNA'daki kesim tarzı şöyledir.



3) İzozizomerler (isoschizomer): Gerek yapışkan uç ve gerekse küt uç oluşturan RE'lerden bazıları DNA üzerinde aynı yeri tanırlar ve oradan kesim yapabilirler.Örn.

Bam HI	5'... G/GATCC ... 3'	yapışkan uçlar
Bst I	5'... G/GATCC ...3'	(5'-ucundan kesim)
Pal I	5'... GG/CC 3'	küt uçlar
Tha I	5'... GG/CC3'	
Pst I	5'... CTGCA/G ... 3'	yapışkan uçlar ®
Xma II	5'... CTGCA/G .. 3'	(3'-ucundan kesim)

4) Değişik tanıma yapanlar: Az da olsa bazı RE'lerin birden fazla tanıma ve kesme bölgeleri bulunabilmektedir. Örn.,

Hind II	5'... GTC ⁻ AAC ...3'
	5'... GTC ⁻ GAC ...3'
	5'... GTT ⁻ AAC ... 3'
	5'... GTT ⁻ GAC ...3'
Hea I	5'... AGG ⁻ CCA ...3'
	5'... AGG ⁻ CCT ...3'

5'... TGG⁻CCA ...3'

5'... TGG⁻CCT ...3'

Bu tür enzimler gen manipulasyonlarında bir çok kesim bölgesine sahip olması nedeniyle pek kullanılmamaktadırlar.

Bir RE tarafından oluşturulan DNA sekansları diğer bir RE ile kesilmiş fragmentler ile birleştirilirse, oluşan hibrid molekülü parental enzimler tanıyamaz ve kesemez. Örn., Sal I tarafından meydana gelen yapışkan uçlardan birisi (5'... G/TCGAC ...3'), Xho I ile kesilen uçlardan biri (5'... C/TCGAG ...3') ile birleşirse meydana gelen DNA segmentini ne Sal I ve ne de Xho I tanıyamaz ve kesemez.

Sal I Xho I

5'... G/ T/ CGAG ... 3'
3'... CAGTC + /C ... 5'
5'... GTCGAG 3'
3'... CAGCTC 5'

Bazı durumlarda da kesilen tetranukleotidler, heksanukleotid hedef sekansları içinde kalabilirler. Örn., Mbo I ve Sau 3 AI'lerin kesme bölgeleri Bam HI'in heksanukleotid sekansları içinde kesim bölgesine sahiptirler.

Bam HI 5'... G/GATTCC3'
Mbo I 5'... /GATC3'
Sau 3AI 5'... /GATC3'

Aşağıdaki çizelgede bazı RE'lerin çeşitli vektör DNA'larında kesim sayıları gösterilmiştir.

Enzim	pBR 322	Lambda	fX174	Ad - 2	SV 40
Ava I	1	8	1	40	0
Bal I	1	18	0	17	0
Bam III	1	5	0	3	1
Bst EII	0	13	0	10	0
Cla I	1	15	0	2	0
Dra I	3	13	2	12	12
EcoRI	1	5	0	5	1
Hae III	22	149	11	216	18
Hind III	1	7	0	12	6
Hind I	10	148	21	72	10
Hpa II	26	328	5	171	1
Hpa I	0	14	3	6	4
Mbo I	22	116	0	87	8
Pst I	1	28	1	30	2
Pvu II	1	15	0	24	3
Rsa I	3	113	11	83	12
Sal I	1	2	11	83	12
Xba I	0	1	0	5	0

RE'lerin DNA üzerindeki bu aktiviteleri için bazı optimal koşullara (ısı, buffer, pH, vs.) gereksinim vardır. Aksi halde enzimlerin aktivitesi azalır. Mezofilik bakterilerden elde edilen RE'ler, genellikle, 37° C - 40°C arasında aktif olmasına karşın, termofilikler de (*B. stearotherophilus*) optimal ısı 70°C'ye kadar çıkabilir. Bu ısı derecesi mezofilik mikroorganizma RE'leri için inaktive edicidir.

Şimdiye kadar 400 den fazla RE'nin izole edildiği ve karakterizasyonunun yapıldığı açıklanmıştır. Hücrelerin sentezlediği RE'ler, dışardan giren DNA sekanslarına etkili olmasına karşın, kendi genomu için zararsızdır. Modifikasyon enzimleri olarak tanımlanan proteinler, kendi sentezledikleri RE'lerin tanıma ve kesme bölgelerini modifiye ederek, kesilmesini ve tanınmasını önlerler. Bu son enzimler, RE'nin kesme bölgesinde bulunan bazlara metil grubu ekleyerek (metilasyon) kesilmeye mani olurlar. *E.coli* 'nin çoğunda DNA'yı metilize eden enzimler vardır (dam metilaz, dcm metilaz, gibi). Bunlardan, dam metilaz, kesme bölgesinde adenine metil grubu ve dcm metilaz da 5'... CmeCAGG ...3' veya 5'... CmeCTGG ...3' sekanslarında bulunan sitozine metil grubu katar. Bu nedenle de, restriksiyon metilaz enzimlerinin hücrelerdeki DNA'yı

koruma fonksiyonları oldukça önemlidir. Şimdiye kadar 100'den fazla modifikasyon enziminin izole edildiği açıklanmıştır.

Restriksiyon endonuklease enzimlerinin DNA'da yaptıkları kesimlerin özellikleri daha ayrıntılı olarak moleküler düzeyde aşağıda gösterilmiştir.

Yapışkan Komplementer Uç Oluşturanlar

1) EcoRI'in kesim tarzı (soldan sağa doğru), asimetrik kesim

```
5'... G- AATTC ..... G- AATTC .....3'
3'... CTTAA-G ..... CTTAA-G .....5'
5'... G   AATTC .....G   AATTC .....3'
3'... CTTAA   G.....CTTAA   G.....5'
```

2) PstI'in kesim tarzı (sağdan sola doğru), asimetrik kesim

```
5'.... CTGC A- G .....CTGCA- G...3'
3'.... G- ACGTC ..... G-ACGTC...5'
5'.... CTGCA- G.....CTGCA- G.....3'
3'.... G - ACGTC.....G - ACGTC.....5'
```

Küt Uç Oluşturanlar

3) Alu I'in kesim tarzı (ortadan), simetrik

```
5'..... AG- CT ..... 3'
3'..... TC- GA ..... 5'
5'..... AG       CT ..... 3'
3'.....TC       GA ..... 5'
```

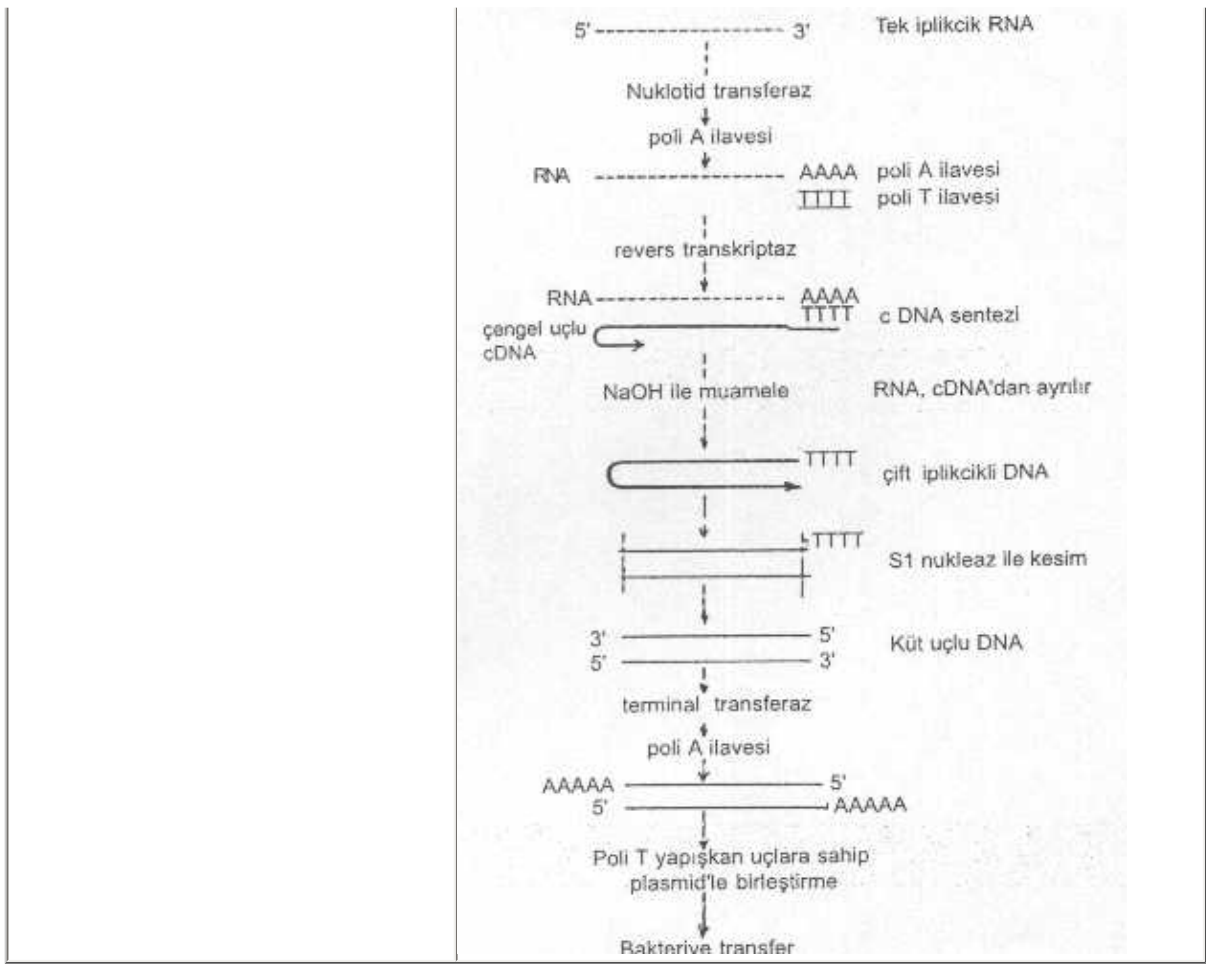
Daha sonraları, 1970 yılında, Howard Temin ve David Baltimore, birbirlerinden bağımsız olarak, reverse transkriptase enzimini bulmuşlardır. Bu enzim, retroviruslar tarafından, viral genomik RNA'nın hücre içinde cDNA'ya (veya proviral DNA'ya) çevrilmesinde kullanılmaktadır. Bu gün biyoteknolojide bu enzimden genomik RNA veya mRNA'lardan komplementer DNA elde etmede fazlaca yararlanılmaktadır.

04. RNA'dan cDNA Elde Edilmesi

Önemli bir ürünü veya antijenik faktörü kodlayan genler her zaman DNA üzerinde bulunmayabilirler. RNA karakterinde genetik materyal taşıyan viruslarda antijenik olan kapsid proteinini kodlayan genler RNA üzerinde lokalize olmuşlardır (ayrıca, hücre içindeki mRNA'da bulunurlar).

RNA'dan cDNA elde edilme aşamaları yandaki şekilde gösterilmektedir.

--	--



- 1) Önce virus bolca üretilir. Özel yöntemlerle genetik materyali olan RNA'ları çıkarılır ve saflaştırılır.
- 2) RNA'nın 3'-ucuna enzimatik olarak poli A nükleotidleri ilave edilir (bu amaçla terminal nükleotid transferaz enziminden yararlanır).
- 3) Poli A'ların karşısına, bunun komplementeri olan Poli T'ler ilave edilir ve kısa bir primer taban nükleotidleri oluşturulur. Bu, işlem transferaz enzimi yardımıyla gerçekleştirilir.
- 4) Poli T primerleri basamak olarak kullanılarak, revers transkriptaz enzimi yardımıyla, RNA'ya komplementer bir DNA (cDNA) sentezlenir ve bunun 3'-ucu da çengel tarzında kıvrılır. Böylece RNA-DNA hibrid molekülü oluşur.
- 5) Sentezlenen tek iplikcikli cDNA'dan RNA, NaOH'le muamele edilerek giderilir ve sadece çengel uçlu tek iplikcikli cDNA kalır. Bu çengel uç, Pol.I'nin sentezi için primer basamak oluşturur.
- 6) Pol. I enzimi çengel uçtan başlayarak ilk cDNA'ya buna komplementeri olan ikinci DNA'yı sentezler. Böylece DNA-DNA çift iplikcikli molekülü oluşur.
- 7) Sonra çengel uç kısmı S1 nükleaz enzimi ile kesilerek çıkarılır.
- 8) cDNA'nın 5'-ucundaki poli T'ler de S1 nükleaz enzimi ile çıkarılır. Böylece küt uçlar meydana getirilir.
- 9) Terminal transferaz enzimi yardımıyla cDNA'ların 3'-uçlarına poli A'lar ilave edilir. Bu işlem sonunda iki ucunda poli A'dan oluşan yeni uçlar meydana gelmiş olur.

Böylece çift iplikcikli DNA oluşturulduktan sonraki aşamalar önceden bildirildiği tekniklerle yürütülür. Şöyle ki, bu amaçla, plazmid DNA'sı Pst I ile kesilerek iki yapışkan uç meydana getirilir. Yapışkan uçlar enzimatik olarak giderilerek (giderilmese de olur), yerlerine terminal transferaz yardımıyla poli T'ler ilave edilir. Böylece, plazmid ile gen DNA'sı birbirinin komplementeri haline getirilir. Bu uçlar birleştirildikten sonra bir bakteriye (*E.coli* 'ye) aktarılır.

Yukarıda bahsedilen işlem aynen mRNA için de uygulanabilir.

Eğer denemeler karışık mRNA'larla yapılırsa yani hücrelerde birçok gene ait mRNA bulunursa o

zaman işler daha yoğun ve teknikler de daha değişik olur.

Hücre içinde mRNA'lar çıkarılarak NS filtre üzerine transfer ve sonra da fikse edilir ve üzerine işaretli cDNA prob (mRNA'ya göre hazırlanmış) ilave edilir. Otoradyografi ile istenilen mRNA'nın yeri belli olur ve sonra, mRNA buradan çıkarılır.

Messenger RNA sonra hücelere transfeksiyonla aktararak hücre içinde translasyonu sağlanır. Veya bu saf mRNA, enzimatik olan çift iplikçikli DNA'ya çevrilerek, önceki bahiste belirtilen işlemler yapılır.

[1] Kaynak : Temel Mikrobiyoloji