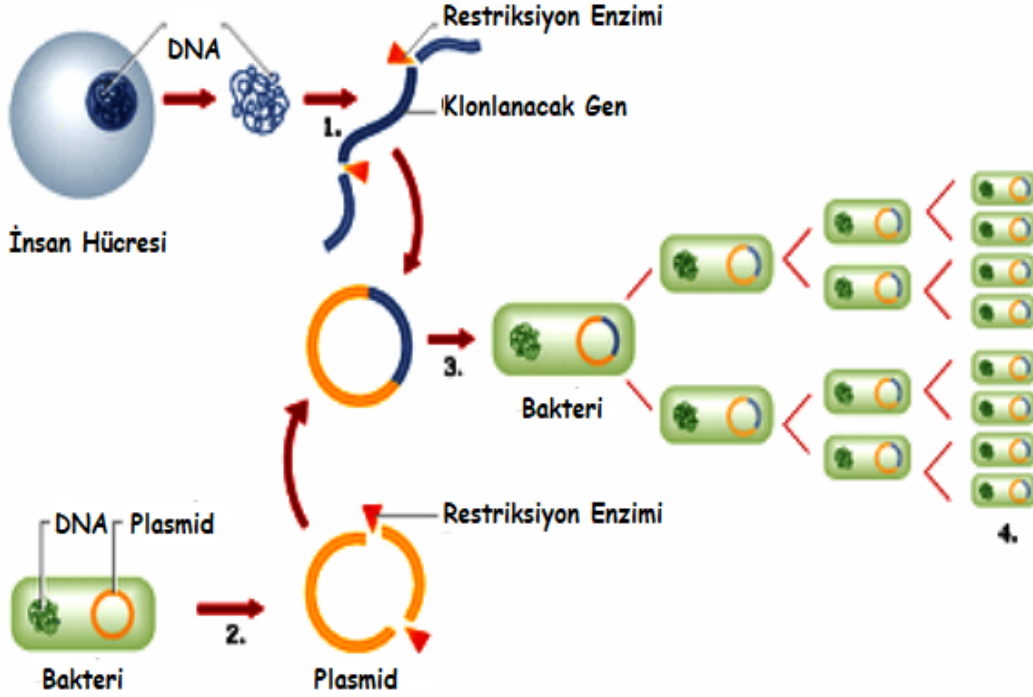


Gen Klonlanması ve Klonlama Araçları

Ekonomik açıdan değeri olan bir ürünün üretiminden sorumlu genin, bir vektör aracılığıyla bakterilere aktararak çoğaltılması işlemine gen klonlaması denir.

Restriksiyon enzimleri bakterilerde hücre içine girmiş virüs DNA'larını keserek etkisiz hale getirmekle görevli enzimlerdir. Bu enzimlerin keşfi rekombinant DNA oluşturulması ve gen klonlaması için gereken makasları bilim dünyasına sağlamıştır.



Klonlanacak olan genin bakteriye aktarımında aracılık yapan plazmit ya da virüs, vektör olarak adlandırılmaktadır.

Daha önceki konulardan da hatırlanacağı gibi plazmitler, bazı bakteri türlerinde hücre DNA'sına ilave olarak bulunan ve onlara extra özellikler kazandıran halkasal DNA parçacıklarıdır.

Plazmitlerin çoğu antibiyotiklere dirençle ilgili genetik bilgi taşısa da, bir plazmit bakteriye daha önce besin olarak kullanmadığı bazı maddeleri metabolize etme imkanı sağlayacak bilgileri de taşıyor olabilir.

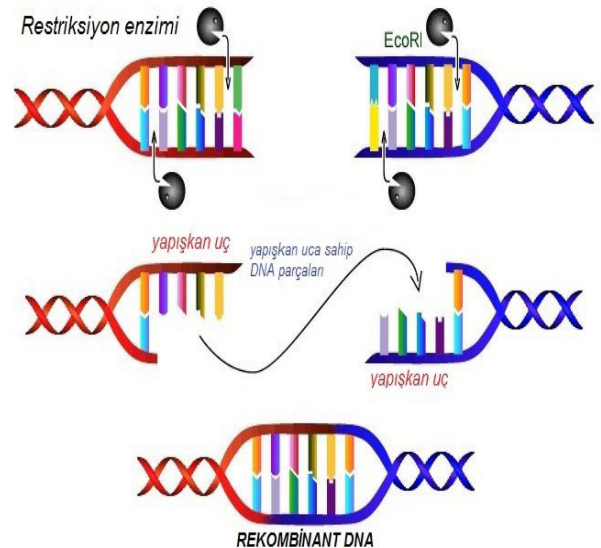
Gen klonlaması yoluyla bakterilere insan insülini üretme bilgisi kazandırılabilir. Bunun için yapılması gereken ilk iş vektör olarak kullanılacak plazmit ve insan DNA'sının saf olarak elde edilmesidir.

Bundan sonra yapılacak iş, saf halde elde edilmiş insan DNA'sı ve plazmit DNA'sının yapışkan uçlar oluşturacak şekilde aynı restriksiyon (kesme) enzimleri ile kesilmesidir.

Restriksiyon endonukleazlar denen enzim grubu DNA molekülünü belli nükleotid dizilerinden tanıma ve bu noktalardan kesme yeteneğinde olan enzimlerdir.

Burada önemli olan asıl nokta plazmit DNA'sı ve insana ait genin alınacağı DNA'nın aynı tip restriksiyon enzimi ile kesilmesidir.

Ancak bu şekilde iki DNA parçasında da yapışkan uçlar oluşturulabilir ve iki DNA parçası sorunsuzca birleştirilebilir.



Aynı tip restriksiyon enzimi ile kesim sonucu elde edilen yapışkan uca sahip DNA parçaları **ligaz enzimi** ile birleştirilip, rekombinant plazmit DNA'sı elde edilir.

Yapılması gereken işlerden sıradaki, rekombinant plazmit DNA'sının bakteriye aktarılmasıdır. Bakteriler genel olarak çevrelerindeki çıplak DNA parçalarını bünyelerine alarak transformasyona uğrayabilirler.

Rekombinat plazmit DNA'sının bakterilere aktarılabilmesi için bakterilerin bulunduğu ortama yüksek voltajlı elektrik akımı verilir ve bu sayede hücre duvarında açılan delikler sayesinde gen aktarımı sağlanmış olur. Bahsi geçen yöntem **elektroporasyon** olarak isimlendirilir.

Bundan başka DNA kaplı küçük mermilerle hücreye atış edilmesi süreci olan **biyolistik** ve DNA'nın hücre içine enjekte edilmesini sağlayan **mikroenjeksiyon** yöntemleri de hücrelere DNA aktarımının alternatif yollarıdır.



Bakteriler uygun besiyerlerinde çoğalırken aynı zamanda rekombinant DNA'ya sahip plazmitler de çoğalmakta ve bu özelliğe sahip bakteri sayısı gittikçe artmaktadır.

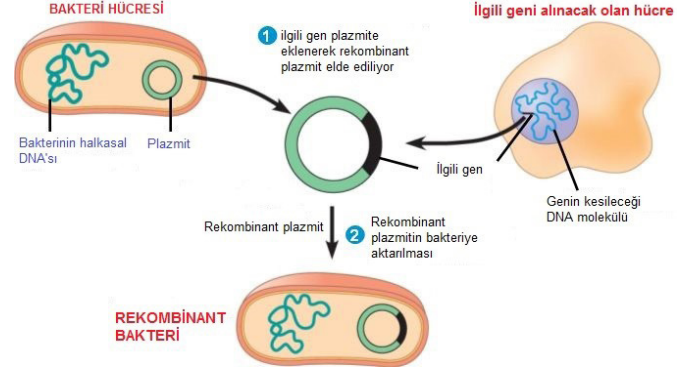
Ancak tüm bakteriler bu plazmidi almayabileceğinden istenilen geni taşıyan ve taşımayan bakterilerin birbirinden ayrılması gerekmektedir.

Bu ayrımın yapılmasında plazmidin bünyesinde bulunan antibiyotik karşı direnç geni kullanılmaktadır.

Örneğin rekombinant DNA üretiminde kullanılan plazmit, ampicilin antibiyotikine direnç genini de üzerinde bulunduruyorsa bakterilerin çoğaldığı ortama bu antibiyotik eklenerek plazmiti bünyesine almayana bakterilerin öldürülmesi sağlanabilir.

Bu uygulamanın sonucunda elimizde sadece istediğimiz geni bünyesine almış olan bakteriler kalır ve ilgili genin ürünü bu bakteriler tarafından üretilmeye başlanır.

Bu yolla, büyüme hormonu, insülin, kalp krizi esnasında oluşacak pıhtıları çözen proteinler ya da deterjanlarda kullanılan enzimler bakterilere ekonomik yoldan ve bol miktarda üretilirebilmektedir.



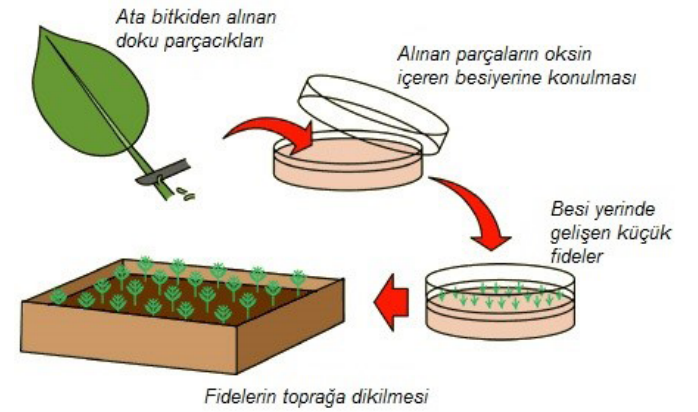
Canlılarda Klonlama

Çok hücreli organizmalardan alınan tek bir somatik hücrenin genetik bilgisi kullanılarak kalıtsal yapı olarak birbirinin aynısı olan organizmaların üretilmesi olayına **klonlama**, klonlama süreciyle oluşturulan organizmaya ise **klon canlı** adı verilir.

Bitkilerde Klonlama

Bitkilerde klonlama bir çeşit vejetatif üreme olarak değerlendirilebilir.

Canlıdan alınan diploid hücrelerin geliştirilmesiyle kalıtsal olarak ata bitkiyle ve birbirleriyle aynı olan yeni bireyler elde edilebilmektedir.



Bu şekilde istenen özelliklere sahip genetik varyasyon korunmuş olur.

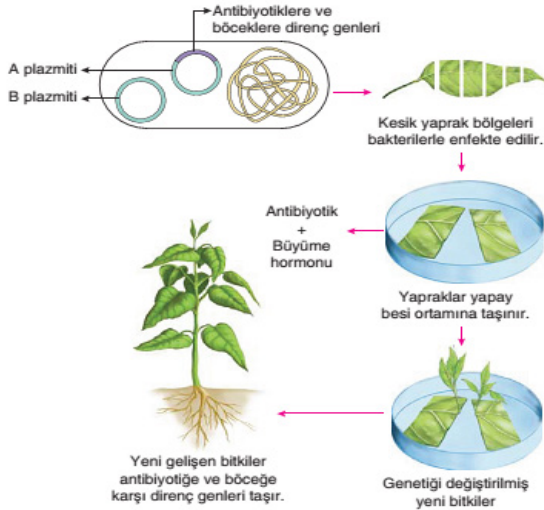
Gen klonlaması yoluyla bitkilere daha önce sahip olmadıkları özellikler de kazandırılabilir. Bitkilere gen aktarımında plazmitini doğal olarak bitki hücrelerine aktarma yeteneğinde olan *Agrobacterium tumefaciens* (*Rhizobium radiobacter*) bakterisi aracı olarak kullanılmaktadır. Bu bakteri bitkilerin çoğunda genetik bilgi aktararak taç uru denen bir tümör oluşturmaktadır.

Bu metodun başlangıcında *Agrobacterium tumefaciens* bakterisinin vektör olarak kullanılacak plazmidine böcekler direnç geni ve antibiyotik direnç geni birlikte aktarılır. Daha sonra gen aktarımı yapılacak bitkinin yaprağı kesilerek yaralanmış olan bölgeye bakteri bulaştırılır.

Sonrasında bakterinin gen aktarımı yaptığı ve yapmadığı hücrelerin birbirinden ayrılabilmesi için ortama antibiyotik eklenir.

Gen aktarımının sağlandığı bitki hücreleri böcekler direnç geni ile birlikte antibiyotik direnç genini de aldıklarından ortama antibiyotik eklenmesinden etkilenmezler.

Canlı kalan hücreler, kültür ortamında çoğaltılarak istenen özelliğe sahip yeni bitkiler yetiştirilmiş olur. (Transgenik bitki)



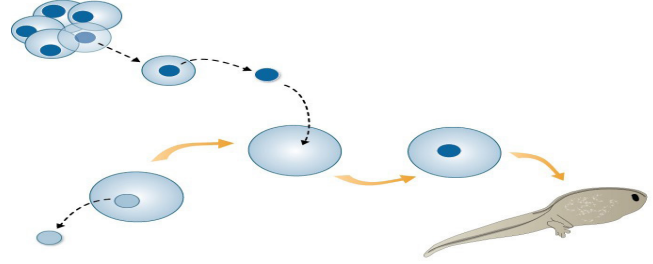
Bitkilere gen aktarımı süreciyle,

- besleyici değeri ve verimliliği yüksek (yağ kalitesi yüksek),
 - geç olgunlaşan ve raf ömrü uzun,
 - tarım ilaçlarına ve böcekler dirençli,
 - biyoyakıt üretimi için uygun,
 - sıcak - soğuk toleransı yüksek,
 - eczacılık için gereken maddeleri bol miktarda üretebilen
- bireyler elde edilmeye çalışılmaktadır.

Hayvanlarda Klonlama

Hayvanlarda klonlama çalışmaları 1997 yılında Dolly'nin doğumuyla birlikte kamuoyunun dikkatini çekmiş olsa da bu çalışmalar çok eskilere dayanmaktadır.

Örneğin ilk iribaşın (kurbağa) klonlanması 1952 yılında başarılmıştır. Burada belirli bir kademeye kadar ilerlemiş olan kurbağa embriyosundan alınan diploid bir hücreye ait çekirdek, çekirdeği çıkarılmış bir kurbağa yumurtasına aktararak gelişimine devam etmesi sağlanmış ve klon bir kurbağa elde edilmiştir.



Hal böyle olsa da 1997 yılında İngiltere'deki Roslin Üniversitesi'nden Ian VILMUT ve arkadaşlarının koyun klonladıklarını açıklamaları memeli bir canlının klonlanmasının başarılmış sebebiyle dikkatleri çekmiştir. Dolly, 2003 yılında akciğer tümöründen dolayı ötenazi edilmiştir.

Hayvanlarda klonlama,

- Kök hücre çalışmalarında kullanmak üzere hücre sağlamak
- Kök hücreleri iyileştirme amacıyla kullanmak
- Soyu tükenme tehdidiyle karşı karşıya olan türleri korumak
- Soyu tükenmiş canlıların tekrar yaşama döndürülmesi
- İnsan antikollarının bol miktarda üretilmesi
- İnsan sütüne benzer süt üretimi
- Gen silerek genlerin görevlerini öğrenmek

gibi amaçlarla kullanılabilir.

Hayvanlarda klonlamanın mekanizmasını, Dolly'nin oluşma süreci üzerinden anlamaya çalışabiliriz. Dolly'nin oluşma sürecinde gerçekleşen olaylar şu şekilde sıralanabilir.

Ergin bir koyunun memesinden bir hücre alınır.

Bu hücre, alındığı canlıyı yeniden oluşturabilecek tüm genetik bilgiye sahiptir.

Ancak hücredeki DNA üzerindeki tüm genler aktif durumda olmayıp sadece ilgili hücre tipinin ihtiyaç duyacağı genler aktiftir.

Zigotta tüm genler aktif iken embriyonik gelişimle birlikte farklılaşan hücrelerde bazı gen bölgeleri hücrenin faaliyetleriyle uyumlu olarak kapatılmaktadır.

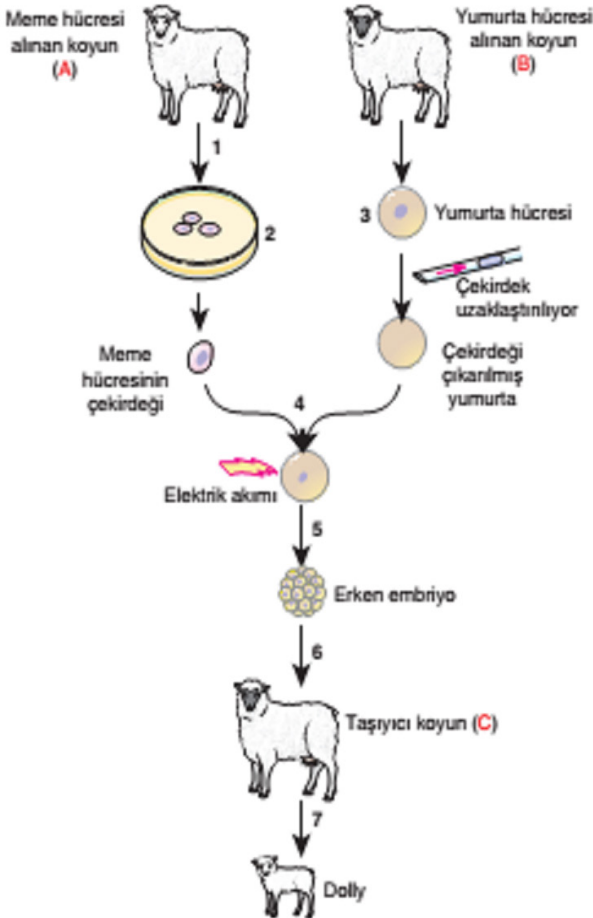
Sadece bazı gen bölgeleri aktif olan meme hücresi, besin bakımından fakir bir ortama konarak hücre döngüsü durdurulur ve hücre tüm gen bölgelerinin aktif olduğu G_0 evresine geçirilir. G_0 evresindeki hücrenin çekirdeği çıkarılır.

Bu esnada başka bir koyundan alınan haploid yumurta hücresinin çekirdeği çıkarılır.

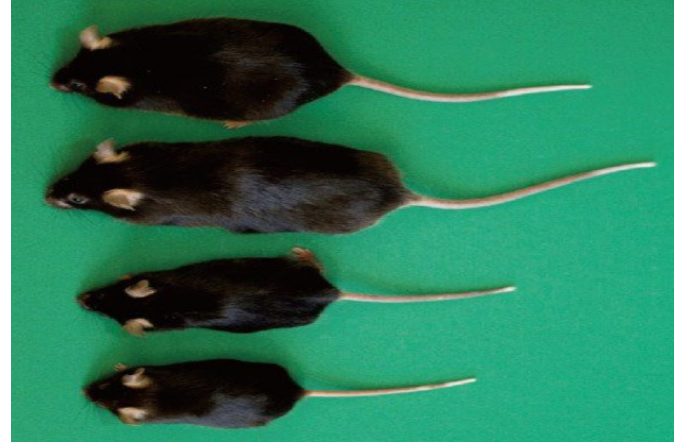
İlk koyundan alınan meme hücresinin çekirdeği, çekirdeği çıkarılmış yumurta hücresi içerisine yerleştirilir ve elektrik akımı yardımıyla kaynaşmaları sağlanır. Hücre bölünmesi için uyarılır.

Mitoz bölünmeler sonucu oluşan embriyo, taşıyıcı anne olarak görev yapacak üçüncü bir koyunun rahmine yerleştirilir ve gelişmesi sağlanır.

Normal gebelik süresinin sonunda genetik materyalini birinci koyunun meme hücresinden alan klon bir canlı meydana gelir.



Klonlama çalışmalarından insanlar açısından umulan temel fayda **embriyonik kök hücreler** oluşturmaktır. Vücuttaki tüm doku ve organlara dönüşebilme yeteneğinde olan bu hücrelerin oluşturulması yetişkin bireylerin karşılaştıkları sağlık sorunlarını çözmeye bir umut ışığı olarak durmaktadır. Ancak henüz kök hücrelerin hangi şartlar altında hangi doku ya da organa dönüşüyor olduğunun bilinmemesi, bunun yanı sıra bu amaçla üretilen embriyonun yaşam hakkının elinden alınması gibi dikkate değer etik kaygılar bilim dünyasını meşgul etmektedir.



Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak hayvan türlerine farklı özellikler kazandırmak da mümkündür. Örneğin insan büyüme hormonu salgılanmasından sorumlu gen bölgesi farelere aktararak normalden daha iri fareler üretilmiştir.

Gen aktarımı sonucunda kendisinde daha önce mevcut olmayan özellikleri kazanmış canlılara **transgenik** ya da **genetiği değiştirilmiş organizma** denmektedir.