

1 GİRİŞ

Temelleri çok eskilere dayansa da bilim çevrelerinde biyoteknoloji terimi, ilk defa 1961 yılında İsveçli bilim insanı Carl Gören Heden tarafından kullanılmıştır. Bilimsel bir disiplin olarak kabul edilmesinden sonra biyoteknoloji şu şekilde tanımlanmıştır: “*Biyoteknoloji, organizmaların, biyolojik sistemlerin ve süreçlerin kullanımıyla endüstriyel ürünlerin ve hizmetlerin üretimidir*”. Bir endüstriyel mikrobiyolog biyoteknolojiyi “*endüstriyel uygulaması olan kimyasal işlemleri yürütmek üzere canlı organizmaların kullanılması*” şeklinde tanımlar. Diğer yandan 1970'lerde rekombinant DNA tekniklerinin geliştirilmesinden sonra biyoteknolojiye yeni kavramlar girmiş ve büyük bir değişim ve hamle gerçekleşmiştir. Amerikan çevre koruma teşkilatının bu günkü biyoteknolojiyi daha modern bir şekilde tanımlar: “*İnsan için faydalı ürünler üretmek üzere canlı organizmaların kullanılması biyoteknoloji olarak adlandırılır. Bir bakıma canlı organizmaların teknik ve endüstriyel işlemlere uygulanmasıdır. Ayrıca genetik mühendisliği (rekombinant DNA) teknikleriyle manipüle edilmiş yeni mikropların kullanılması da biyoteknoloji kapsamına girer.*” Rekombinant DNA teknolojisinin temel tekniklerinden biri gen klonlamadır. **Gen klonlama** bir DNA fragmentinin izole edilerek birlikte replike olabileceği bir vektör ile birleştirilmesi işlemidir. Gen klonlamanın yanı sıra polimeraz zincir reaksiyonu (PZR), DNA dizileme, gen ekspresyonu ve fonksiyonel genomik gibi diğer teknikler de biyoteknolojik uygulamalar için esasi tekniklerdir. Daha genelleştirilerek şöyle bir biyoteknoloji tanımı yapılabilir: **“Biyoteknoloji, endüstriyel, medikal ve tarımsal uygulamalarda organizmaların, özellikle genetiği değiştirilmiş organizmaların kullanılmasıdır”**.

Biyoteknoloji iki ana evreye ayrılarak incelenebilir. Rekombinant DNA öncesi ve rekombinant DNA sonrası evreler. 1973 yılında Boyer ve Cohen'in rekombinant DNA teknolojisini tanımlamalarıyla geleneksel biyoteknoloji büyük bir değişim yaşamış ve yeni boyutlar ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji kullanılarak istenilen karakterde mikroorganizmalar ve sonra bitkiler ve hayvanlar daha hızlı, güvenli ve kontrollü bir şekilde üretilmiş ve uygulamaya sürülmüştür.

Rekombinant DNA öncesi biyoteknoloji çok eskilere uzanır ve esas olarak mikroorganizmaların metabolik farklılıklarından faydalanarak özellikle besin maddeleri üretmek esasına dayanır. Alkollü içkiler, sirke, peynir ve yoğurt üretimi için mikroorganizmalar tarih öncesinden bu yana kullanıla gelmiştir. Başlangıçta mikroorganizmaların doğal olarak meydana gelmiş olan değişik suşları verimi artırmak üzere kullanılmış, daha sonra değişik mutajenler (radyasyon, kimyasal maddeler) kullanılarak daha

iyi karakterlere sahip mutantlar elde edilmeye çalışılmıştır. Rekombinant DNA uygulamalarına kadar, ekonomik verimi yüksek mutant suş elde etme çalışmaları sınırlı bir başarı sağlayabilmiştir. Rekombinant DNA devri öncesinde ve sonrasında klasik biyoteknoloji teknikleri kullanılarak birçok mikrobiyal ürünler üretilmiş olup bunların ekonomik değeri oldukça büyüktür. Genel olarak uygulamalı mikrobiyoloji olarak adlandırılabilen bu çalışmalar şu ana konuları içerir:

1. Mayalanmış besin ve içki üretimi,
2. Antibiyotik üretimi,
3. Atık su arıtımı,
4. Biyoremediasyon.

Rekombinant DNA öncesi devrinin ana ürünleri ve kullanım alanları başlıca şöyledir:

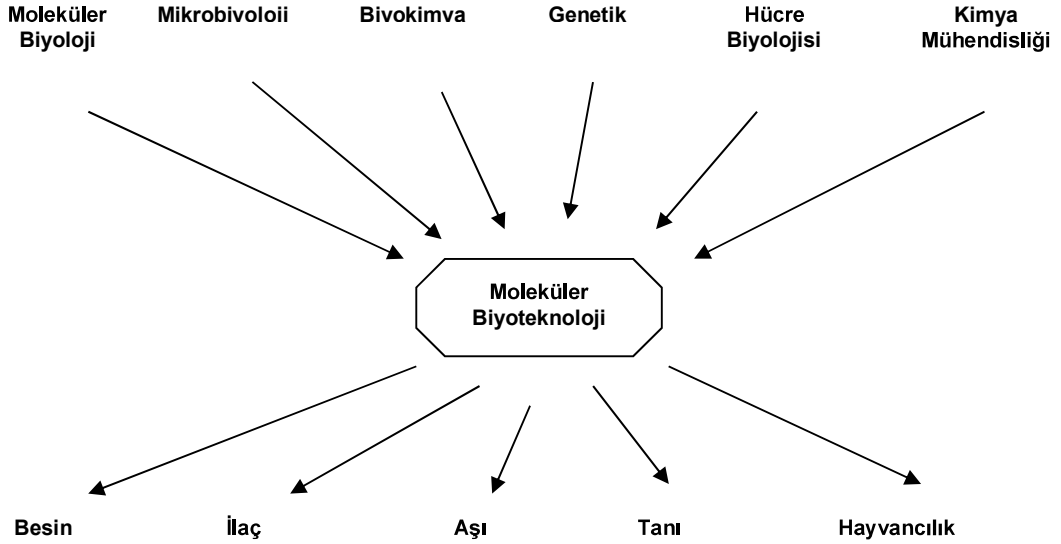
<u>Ürün</u>	<u>Kullanım Alanı</u>
Mayalanmış içecekler ve distile likörler	İçki
Antibiyotikler	İlaç
Peynir	Yiyecek
Endüstriyel alkol	Yakıt katkısı
Vitaminler	Yiyecek ve yem katkısı
Aşılar	Hastalıktan korunma
Enzimler	Besin işleme, deterjan katkısı

Rekombinant DNA tekniklerinin uygulanabilir hale gelmesiyle biyoteknolojinin çehresi en azından bazı konularda hızla değişmiştir. Bu teknoloji, DNA'nın in vitro'da manipülasyonuna izin vermektedir. Bir organizmanın belirli bir gen bölgesi izole edilebilmekte ve bir başka organizmaya bu genin transferi mümkün olmaktadır. Ayrıca nükleotit dizileme teknikleri bir genin nükleotit seviyesinde tanımlanmasına izin verir. Nükleotit dizisi bilinen bir genin kodladığı polipeptitin amino asit dizisi genetik koddan hareketle belirlenebilmekte ve yönlendirilmiş mutasyon yöntemleriyle proteinlerin yapısı değiştirilebilmektedir. Bunun da ötesinde tamamen sentetik DNA molekülleri veya genler üretilmektedir. Yine bu teknoloji, kontrollü rekombinasyonlara izin vermekte ve istenilen özellikte mutasyonlar eklenerek bir organizmaya doğal olarak sahip olmadıkları karakterler eklenebilmektedir.

Bunun yanında, mikroorganizmalar klasik yöntemlerle oldukça az üretilen ve ekonomik maliyeti çok yüksek olan hayvansal, özellikle insan proteinlerinin üretimi amacıyla da kullanılmaktadır. Bunun en çarpıcı örneği insan insülininin *Escherichia coli* hücrelerinde üretilmesidir. Rekombinant DNA öncesi devrede tonlarca domuz pankreasından elde edilen

ve çok pahalıya mal olan insülin, üstelik antijenik uyuşmazlıktan dolayı verilen hastalarda allerjik reaksiyonlara da neden olmaktadır. Rekombinant DNA teknikleri yardımıyla insan insülin geni klonlanarak *E. coli* hücrelerine transfer edilmiş ve insan insülini daha ekonomik olarak üretilmiştir. Üstelik domuz insülininden kaynaklanan allerjik reaksiyonlar da ortadan kalkmıştır.

Rekombinant DNA sonrası evresinde, tedavi edici ajanların üretiminde, tarımda, atık su arıtımında, zararlı maddelerin yok edilmesinde ve yeni tip antibiyotiklerin sentezlenmesinde moleküler seviyeye doğru bir yönelim ve büyük atılımlar olmuştur. Bu atılımlarda mikroorganizmaların önemi gittikçe artmıştır. Bunun yanında, moleküler genetik, moleküler biyoloji, biyokimya ve biyolojinin diğer dalları da biyoteknolojideki bu gelişmelere katkı sağlamaktadır. Şekil 1.1’de moleküler biyoteknolojinin diğer bilim dallarıyla ilişkisi gösterilmektedir.



Şekil 1.1: Moleküler biyoteknolojinin diğer bilim kollarıyla ilişkisi

Modern biyoteknolojinin ana faaliyet alanları biyo ilaç, endüstriyel biyoteknoloji, besin biyoteknolojisi, çevre ve biyoinformatiktir. Kullanılan başlıca teknolojiler nanobiyoteknoloji, doku mühendisliği ve rejenerasyonu, DNA dizileme, hücre düzeyi analizler, fermentasyon, PCR teknolojisi ve kromatografidir. Uygulama alanları ise sağlık, besin ve tarım, doğal kaynaklar ve çevre, endüstriyel işleme ve biyoinformatiktir. 2021 yılı küresel biyoteknoloji pazarı 1,024 trilyon ABD doları olarak hesaplanmıştır. 2030 yılında bu büyüklüğün 3,880 trilyon dolara çıkması beklenmektedir.

Kuzey Amerika ülkeleri bu pazarın %44.21'ine sahiptir. Bu bölgede biyoteknoloji pazarı birçok faktörün etkisiyle gelişmektedir: Kilit piyasa oyuncularının bu bölgede bulunması, yoğun araştırma-geliştirme aktivitelerinin mevcudiyeti ve yüksek sağlık hizmeti harcamaları. Bölge; yaşam bilimleri araçlarının geliştirilmesini kolaylaştıran genomik, proteomik ve hücre biyolojisi tabanlı çok sayıda platforma ev sahipliği yapmaktadır. Bunun ötesinde kronik hastalıkların sıklıklarının artmasının ve yaşamı tehdit edici hastalıkların tedavisi için kişiselleştirilmiş ilaç uygulamalarının artışının bu bölgede biyoteknoloji piyasasının gelişmesine pozitif katkısı olmaktadır. Asya Pasifik bölgesinin 2022-2030 döneminde biyoteknoloji piyasası bakımından en hızlı gelişen bölge olması beklenmektedir.

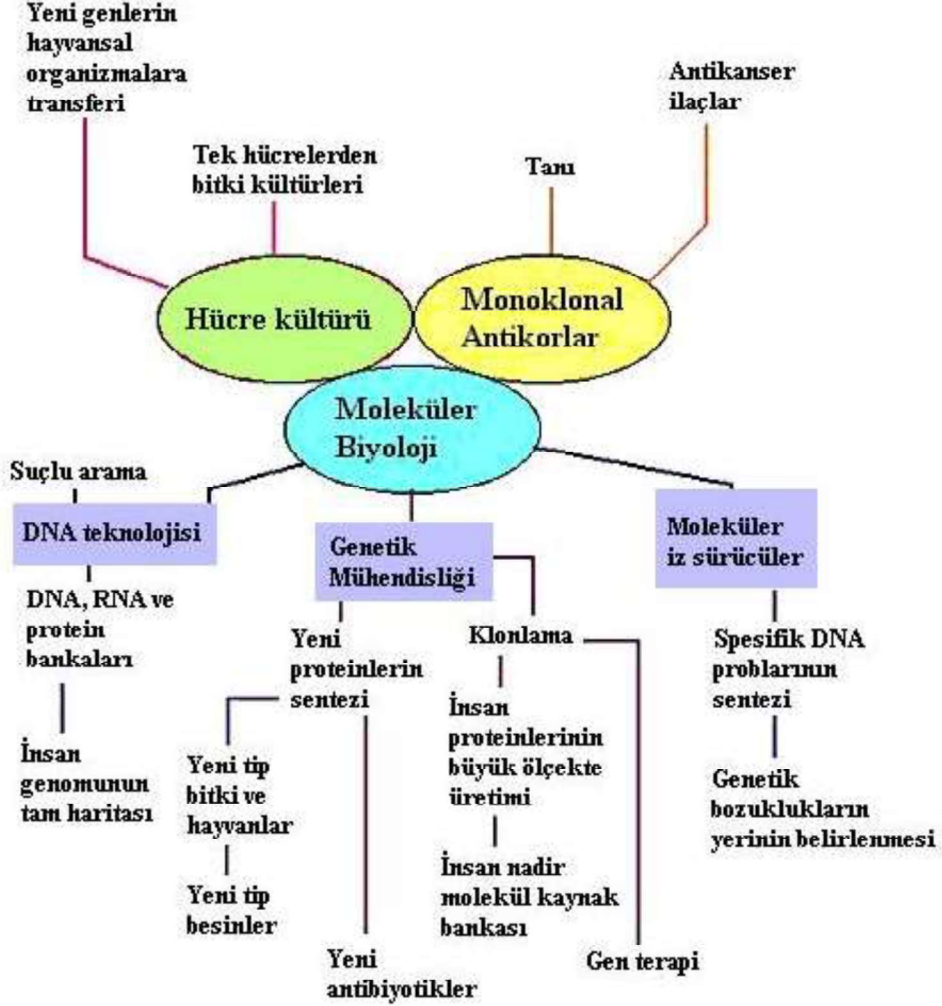
Rekombinant DNA teknikleriyle üretilmiş insan tedavi edici proteinlerine örnekler Tablo 1.1'de verilmektedir:

Tablo 1.1: Rekombinant DNA teknikleriyle üretilmiş bazı tedavi edici ürünler.

Ürün	Fonksiyon
Kan proteinleri	
Eritropoietin	Bazı anemilerin tedavisinde
Faktör VII, VIII ve IX	Pıhtılaşmayı uyarıcı
Doku plaminojen aktivatör	Pıhtı açıcı
Urokinaz	Kan pıhtılaştırıcısı
İnsan hormonları	
Epidermal gelişme hormonu	Yara iyileşmesi
FSH	Üreme bozukluklarının tedavisi
İnsülin	Şeker hastalığının tedavisi
Relaksin	Doğum uyarıcı
Somatotropin (GH)	Cücelik tedavisi
İmmün düzenleyiciler	
İnterferonlar (α)	Antiviral, antitümör etki
İnterferonlar (β)	Çoklu skleroz tedavisi
Koloni uyarıcı faktör	Enfeksiyon ve kanser tedavisi
Lizozim	Antienflamatuvar
Aşılar	
Sitomegalovirüs	Enfeksiyonun engellenmesi
Hepatit B	Serum hepatitinin engellenmesi
Kızamık	Kızamığın engellenmesi
Kuduz	Kuduzun engellenmesi

Rekombinant DNA'nın uygulanmasıyla, moleküler seviyedeki biyoteknolojik uygulamalar artmış ve mucizevi sonuçlar doğurmuşsa da birçok klasik metot hala

ekonomikliğini ve etkinliğini korumaktadır. Biyoteknolojinin geniş uygulama alanları olması nedeniyle, burada modern biyoteknolojinin temelini oluşturan rekombinant DNA teknolojisi (genetik mühendisliği) ve uygulamalarına daha fazla ağırlık verilecektir. Şekil 1.2 modern biyoteknolojinin bugünkü ve gelecekteki olası yönelim alanlarını göstermektedir.



Şekil 1.2: Biyoteknolojinin bugünkü ve gelecekteki yönelim alanları

1.1 Mikroorganizmaların Genel Özellikleri

Mikroorganizma terimi, mikroskobun icadından sonra varlığı ortaya çıkarılan organizmaları ifade etse de ağırlıklı olarak virüsleri, bakterileri ve mantarları kapsar. Bunun dışında algler ve protozoonlar da geleneksel mikroorganizma tanımına girer. Geleneksel olarak bakteri terimi bütün prokaryotik organizmaları kapsar. Ancak güncel filogenetik araştırmalar prokaryotların *Archaea* ve *Bacteria* olmak üzere iki ayrı domain oluşturduklarını ortaya koymuştur. Pratik kullanımda bakteri terimi hala bu iki filogenetik grubu ifade etmektedir. Mikroorganizmalar arasında biyoteknolojik bakımdan bakteriler ve mantarlar daha fazla ön plana çıkmaktadır.

Mantarlar, ökaryotik organizmalar olup tek hücreli yapıdan filamentli ve daha kompleks çok hücreli yapıya doğru değişen yapısal kompleksliğe sahiptirler.

Bakteriler, prokaryotik organizmalardır. Kromozomları, hücrenin nispeten merkez bölgesinde olup tek bir DNA molekülü şeklindedir. Bütün bakteri hücreleri (istisnalar hariç), bir polisakkarit türevi olan peptidoglikan yapısında bir hücre duvarına sahiptir. Duvar yapısında sadece peptidoglikan içeren bakteriler Gram boyama ile mavi-mor bir renge boyanırlar ve Gram pozitif olarak adlandırılırlar (*Bacillus* sp.). Diğer bazı bakteriler, ince bir peptidoglikan tabakasının dış tarafında lipopolisakkarit, protein ve lipoproteinlerden oluşmuş bir dış zara sahiptir. Bu bakteriler Gram boyama ile pembeye boyanır ve Gram negatif olarak adlandırılır (*Escherichia coli*). Hücre duvarının iç kısmında hücre zarı ve sitoplazma yer alır. Hücre sitoplazmasında zarla çevrili organeller bulunmaz. Mitokondri olmadığından hücresel solunum sitoplazmik zar üzerinde gerçekleşir. Hücreler küçük yapıya sahip olup ortalama bir bakteri hücresi 2 µm civarındadırlar.

Mikroorganizmalar ve özellikle bakteriler çok büyük bir metabolik çeşitlilik gösterirler. Bu, mikroorganizmalar kullanılarak bir çok metabolitin ekonomik amaçlarla üretilmesi imkânını sağlar.

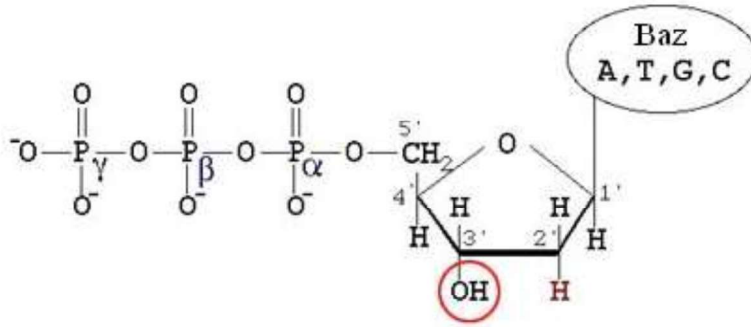
Temel ve uygulamalı bilimsel araştırmalarda bakterileri kullanmanın bazı avantajları vardır:

1. Bakteriler kolay ve hızlı üretilirler.
2. Yapı ve organizasyonları ökaryotlara göre daha basit olduğundan birçok metabolik olayın izlenmesi daha kolaydır.
3. Genetik özellikleri ve kontrol sistemleri nispeten basit olup bu mekanizmaların işleyişi büyük oranda anlaşılmıştır. Daha iyi karakterize edilmiş bu sistemlerin temel bilimsel araştırmalarda ve biyoteknolojide kullanımları daha kolay olmaktadır.
4. Bakteriyel kromozomda genler bir bütün halindedir, yani yapılarında intron bulundurmazlar. Bu da bir genin doğrudan klonlanmasına izin verir.
5. Bazı bakteri türleri doğal bir özellik olarak transformasyona izin verirler. Bu da yabancı DNA'nın hücre içine transferi için önemlidir.
6. Bakteriler plazmit denilen kromozom dışı otonom DNA molekülleri taşırlar. Bu plazmitler bazı genler taşırlar ve bu genler bakterinin hayatı için olduğu kadar rekombinant DNA metotlarının uygulanması için de önem taşır. Bu genlere en karakteristik örnek antibiyotik direnç genleridir.

7. Bakteriler kolay üretilir ve tek hücreler halinde kolayca izole edilebilir. Seyreltik bakteri kültürleri katı besiyerine yayma veya çizgi ekim yöntemleriyle ekilerek izolasyon işlemleri yapılabilir.

1.2 DNA'nın yapısı

DNA molekülü birbirinin komplementeri antiparalel iki zincirin oluşturduğu çift sarmal yapıda bir makromoleküldür. Birbiri üzerine kıvrılarak sarmal yapıyı oluşturan her bir zincir nükleotit denilen yapıtaşlarından meydana gelir (Şekil 1.3). Nükleotitler bir baz (adenin, guanin, sitozin veya timin), bir beş karbonlu şeker (deoksiriboz) ve fosfat grubundan meydana gelir.



Şekil: 1.3: Bir deoksinükleotit trifosfatın (dNTP) kimyasal formülü.

Nükleotitler buldukları baza göre isimlendirilirler. Bir DNA zincirine eklenecek olan nükleotitler, deoksinükleotit trifosfat şeklindedir: dATP, dTTP, dGTP ve dCTP. DNA polimeraz tarafından zincire bağlanırken dıştaki iki fosfat grubu molekülden ayrılırken, içteki fosfat grubu uzamakta olan DNA zincirinin 3' OH grubuyla bir fosfodiester bağı oluşturarak zincire katılır. DNA'nın aksine RNA genellikle tek zincirden meydana gelir. Nükleotitlerin yapısındaki şeker ribozdur. Ayrıca timin RNA yapısına katılmaz bunun yerine urasil nükleotit geçer.

DNA molekülü nükleotitlerin yapısında bulunan bazlar arasında oluşan hidrojen bağları yardımıyla çift zincirli sarmal yapısını korur. Kural olarak her bir pürin bazı (A veya G) bir pirimidin bazı (C, T veya U) ile eşleşir. Bu eşleşme daima A ile T ve G ile C arasında olur. DNA'nın replikasyonu sırasında, DNA'dan RNA sentezi sırasında ve mRNA ile tRNA arasındaki eşleşmede A-U eşleşmesi gerçekleşir. Çift zincirli RNA moleküllerinde de A-U eşleşmesi vardır. Bir DNA molekülündeki zincirlerin birbirinden ayrılmasına denaturasyon denir. Denaturasyon A-T oranı yüksek olan DNA moleküllerinde daha kolay meydana gelir.

Giriş

Bunun nedeni bir A-T çifti sadece iki hidrojen bağı oluştururken bir G-C çiftinin üç hidrojen bağı oluşturmasıdır.

DNA molekülünün büyüklüğü daha yaygın olarak baz çifti (bç) olarak ifade edilir (base pairs = bp). 1000 bç 1 kilobaz (kb), 1000 kb 1 megabaz (mb) olarak ifade edilir. 1.55 kb DNA yaklaşık 1 megadalton (mDa) kütleyle sahiptir.