

9 REKOMBİNANT DNA VE İNSAN GENOM PROJESİ

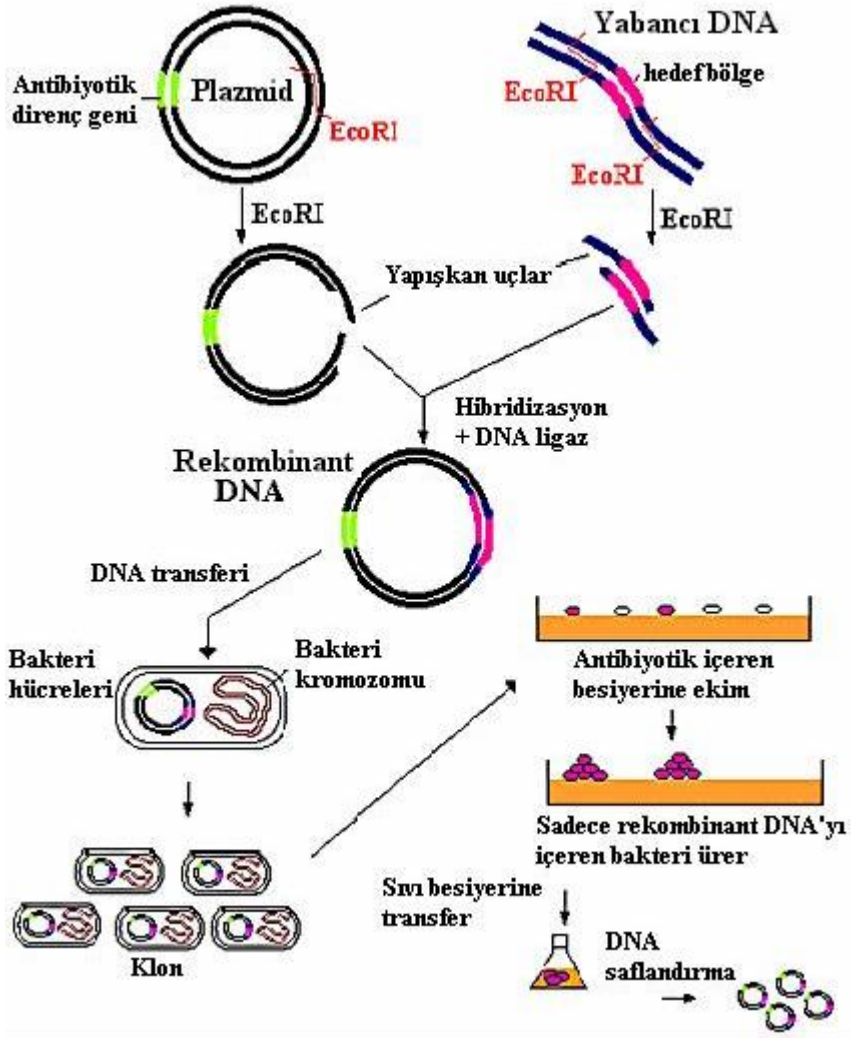
9.1 Rekombinant DNA Teknolojisi

Moleküler genetik araştırma tekniklerinin gelişmesi araştırmacılara, farklı kaynaklardan yani farklı organizmalardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro*'da birleştirilebilme yeteneğini sağlamıştır. Farklı kaynaklardan gelen DNA moleküllerinin birleştirilmesiyle oluşturulan DNA moleküllerine **rekombinant DNA** denir. Rekombinant DNA üzerinde restriksiyon endonükleaz analizleri, DNA dizileme ve yönlendirilmiş mutasyon gibi genetik analiz ve manipulasyonlar gerçekleştirilebilir. Rekombinant DNA elde etmek ve rekombinant DNA üzerinde genetik manipulasyonlar yapmak için kullanılan tekniklerin tamamına **rekombinant DNA teknolojisi** denir. Rekombinant DNA teknolojisi **genetik mühendisliği** olarak da adlandırılır.

Bir genomun belli bir bölgesi (sözgelimi bir gen bölgesi) üzerine moleküler genetik araştırmalar yapılmak istendiğinde bir bütün olarak genomla beraber bu bölgenin analizi muhtemelen mümkün olamayacaktır. Bunun nedeni organizmaya ait tam bir gen seti içinde ilgili gene veya DNA bölgesine doğrudan müdahalenin zorluğu ve diploit bir organizmada ilgili gen bölgesinin interfazdaki bir hücrede sadece iki kopyasının bulunmasıdır. Bunun yerine ilgili gen bölgesinin genomdan ayrılıp daha küçük olan ve bir hücrede çok sayıda temsil edilen plazmid veya virüs gibi bir vektör DNA molekülüne bağlanarak incelenmesi daha kolay ve etkili olacaktır. Bir hedef DNA bölgesinin bir vektör ile birleştirilerek özel konak hücreler içinde çok sayıda kopyasını elde etme işlemine **gen klonlama** denir. Şekil 9.1'de genomik DNA'dan tipik bir gen klonlamanın basamakları özetlenmiştir.

Klonlanan gen bölgesi üzerinde bir çok analiz yapmak mümkündür. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

1. Klonlanan DNA molekülü restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerinin sayısı ve konumları bakımından analiz edilebilir. Bunun sonucu olarak o bölge için spesifik problemler elde edilebilir. (Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı özel bir diziyeye bağlanarak iç kısımlardan kesen enzimlerdir)
2. İlgili DNA bölgesindeki genlerin transkripsiyon ve düzenlenme mekanizmaları incelenebilir.
3. İlgili DNA bölgesinin nükleotit dizisi belirlenebilir. DNA bölgelerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesiyle, ilgili DNA molekülü üzerindeki gen bölgeleri, düzenleyici elementler ve hurda DNA bölgelerinin nükleotit dizileri belirlenebilir.
4. Klonlanan genin baz dizisi yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle değiştirilebilir.



Şekil 9.1: Genomik DNA'dan bir gen bölgesinin klonlanmasının temel basamakları.

Rekombinant DNA teknolojisinde ve genel olarak moleküler genetikte çok önemli ilerlemelere neden olan diğer bir teknik de **polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)**'dur. PCR her iki ucundaki nükleotit dizisi bilinen veya büyük oranda tahmin edilebilen bir DNA bölgesinin milyarlarca sayıda çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlar. Bu yöntem uygulanarak çok yetersiz miktarda mevcut olan DNA örneklerinin amplifikasyonu veya büyük bir DNA molekülünün belli bir bölgesinin amplifikasyonu sağlanabilmektedir. Ayrıca teknik birçok diğer rekombinant DNA işlemlerine uygulanabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinin birçok uygulama alanı vardır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmektedir:

1. Biyolojik mekanizmaların ve süreçlerin analizi.
2. İnsan genetik hastalıklarının DNA analizleriyle tanısı (restriksiyon fragment boyu farklılıkları -RFLP-, tek nükleotit farklılığı -SNP- gibi yöntemlerle).
3. İnsan genlerinin izolasyonu.
4. İnsan ve diğer hedef organizmaların genomlarının nükleotit dizilerinin belirlenmesi.

5. DNA tipleme veya DNA parmak izi yöntemiyle polisiye olaylarda ve hukuki davalarda kanıt sağlama (RFLP ve değişken sayıda peş peşe tekrarlar –VNTR- gibi yöntemlerle).
6. Gen tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi.
7. Ticari ürünlerin üretimi (İnsan gelişme hormonu ve insülini, rekombinat aşılar, genetik yapısı değiştirilmiş bakteriler yardımıyla endüstriyel enzim üretimi, zararlı atıkların işlenmesi ve bitkileri donma hasarından koruma gibi).
8. Transgenik bitkiler ve hayvanlar elde etme.

Bunların her biri ayrıca incelenmesi gereken konular olup burada sadece genomik ve fonksiyonel genomik araştırmalar anlatılacaktır.

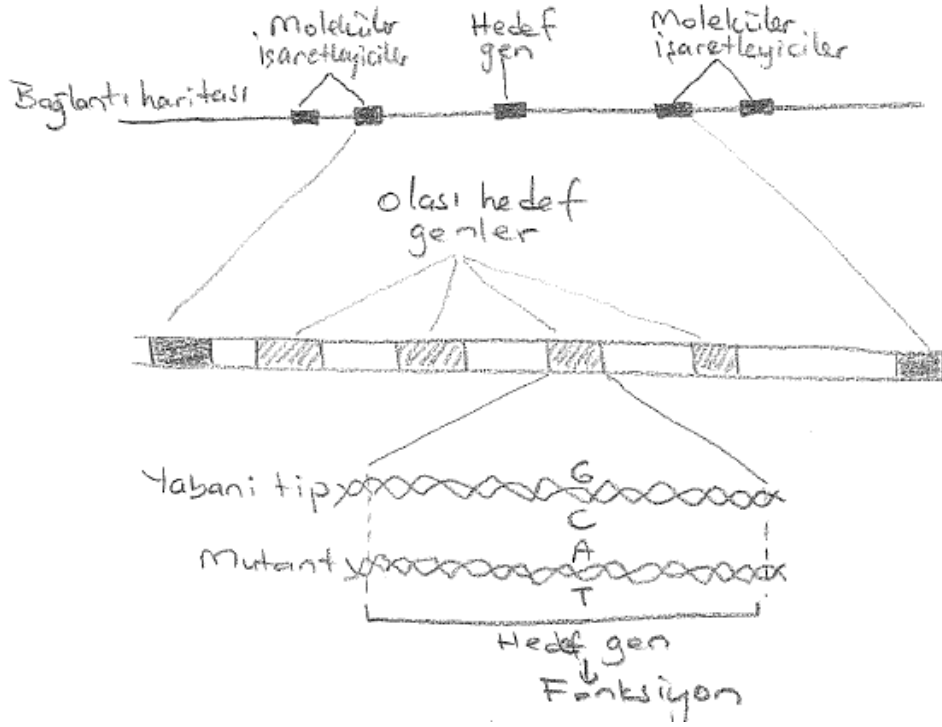
9.2 Genomik

Bazen bilim, beklenenin çok üzerinde bir hızla gelişebilmektedir. Birçok kıdemli genetikçi, ilk çalışmalarına bazı fenotipik analizlerle başladılar. O zamanlar bir organizmanın genomunun fiziksel ayrıntılarının bir bütün olarak belirlenmesi hayal bile edilemezdi. 1970'lere gelindiğinde gen klonlama, dizileme ve manipülasyon tekniklerini içeren rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle, genlerin moleküler seviyede analizini yapmak mümkün oldu. Bu tarihlerden sonra büyük hayaller olarak bir organizmanın, tabii ki öncelikle insan genomunun tamamının nükleotit dizisinin belirlenmesi düşüncesi gelişmeye başladı. Çok geçmeden 1990'lı yıllarda insan ve diğer bazı organizmaların genomunun tamamının dizilenmesi için genom projeleri uygulamaya konuldu.

Bir genomunun tamamını çalışmayı hedef alan araştırma alanı **genomik** olarak adlandırılır. Genom araştırmalarının geliştirilmesi ve hızla tamamlanmasında, DNA dizileme tekniklerinin geliştirilmesi ve otomasyonunun katkısı çok büyük olmuştur. Büyük genomlar daha küçük ve üst üste gelen DNA segmentleri halinde klonlanıp baz (nükleotit) dizisi belirlenir. Sonra hedef gen bölgeleri belirlenerek bu genlerin fonksiyonları analiz edilir (Şekil 9.2).

Şüphesiz bu tip çalışmaların ilk basamağını, belli bir hedef genomun tam baz dizisinin belirlenmesi oluşturur. İnsan genom projesi 1990 yılında başladığında 15 yıllık bir sürede tamamlanacağı düşünülmesine rağmen, 13 yılda tamamlanmıştır. Bu gün için geliştirilmiş olan etkili dizileme teknikleriyle, bir bakterinin genomu bir gün, bir mantarınki bir hafta, bir böceğinki 1-2 ay ve bir memelininki 1-2 yıl gibi kısa sürelerde tamamlanabilir.

İnsan genomunun kaba dizisi 2001 yılında tamamlanmıştır. Bir kaba dizi, genomun tam dizisini içerir. Ancak bu dizi içerisinde bazı hataların olması muhtemeldir ve bazı problemler mevcut olabilmektedir. Bu kaba dizi sonradan son kalite diziyeye dönüştürülür. Son kalite dizide hata oranları en aza indirilmiş durumdadır.



Şekil 9.2: Genomik analizlerin genel seyri.

9.2.1 İnsan genomundan çıkarılan bilgiler

Bu gün için elde edilen genomik bilgi birikiminde bütün bilgilerin ve sonuçlarının tartışılması süphesiz çok daha hacimli olacaktır. Dolayısıyla burada bir genomdan elde edilen bilgiler geniş bir şekilde sunulamayacaktır. İnsan genomundan elde edilen bilgiler verilecektir. Daha ayrıntılı bilgilere bölümün sonunda verilmiş ağ (web) kaynaklarından ulaşılabilir.

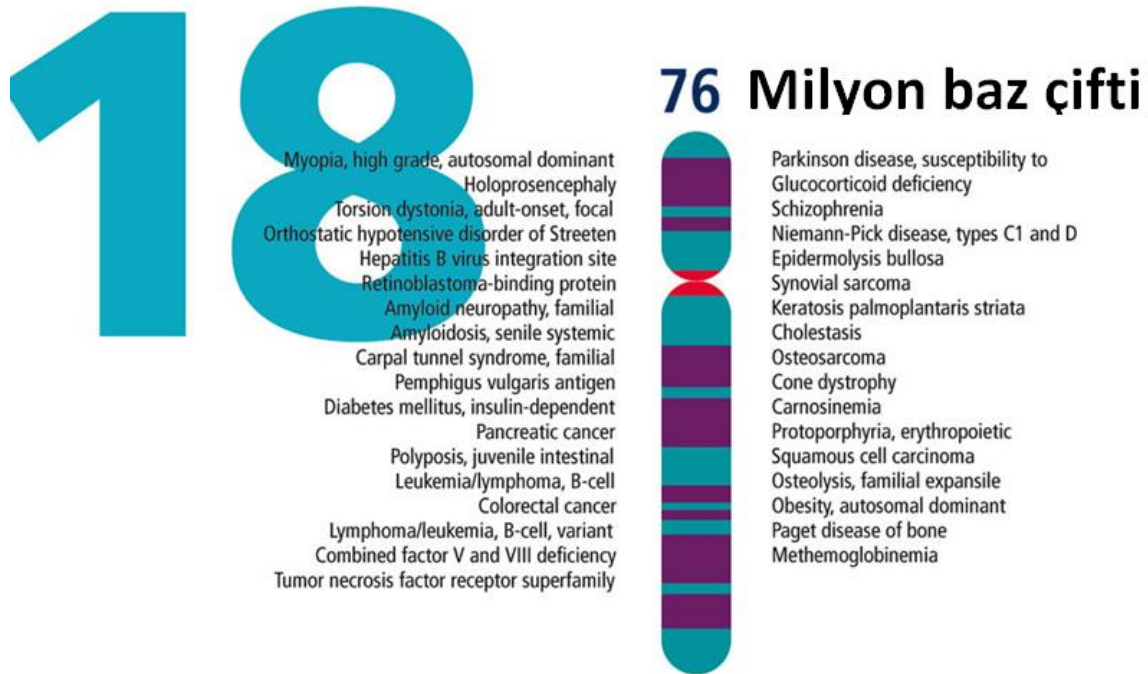
İnsan genomu 3×10^9 bp büyüklüğündedir ve yaklaşık %45'i tekrar dizileri olup bunlar transpoşıl elementlerin kalıntılarıdır. Yapılan analizler, bu dizilerin ilkel transpoşıl elementlerden (özellikle retrotranspozonlardan) köken aldıklarını, zamanla mutasyonların birikmesine bağlı olarak hareket yeteneklerini kaybettiklerini göstermektedir. İnsan genomunu oluşturan 24 kromozomun büyüklükleri ve taşıdıkları gen sayıları Tablo 9.1'de verilmiştir. Şekil 9.3'de 18. kromozomu ve taşıdığı bazı genetik bozukluklara neden olan genler gösterilmektedir.

Genomun çok küçük bir parçası protein kodlayan genlerden yani eksonlardan meydana gelmiştir. Bu oran yaklaşık %3'tür. Eksonlar küçük diziler (~150 bp) şeklinde, büyük diziler (1000 bp->100 000 bp) şeklinde bulunan intronlar arasında yer alır. Transkriptler ortalama 10 eksondan oluşur, ancak çok daha fazla sayıda ekson içeren gen bölgeleri de vardır. Gen sayısının 20 bin ile 25 bin arasında olduğunu son yapılan biyoinformatik analizleri göstermektedir. İnsanda yaklaşık 25 000 gen varken bir nematod solucanda 18 bin, *Drosophila*'da 13 bin, *Saccharomyces*'de 6 bin ve verem etkeni *Mycobacterium* bakterisinde 4 bin gen vardır. Kompleksliği ile oranlandığında insandaki gen sayısının az olduğu görülmektedir. Ancak belli bir gen bölgesinin farklı şekilde spayslanmasıyla (farklı pozisyonların intron olarak algılanmasıyla, alternatif spayslama) belli bir gen bölgesinden farklı özelliklerde proteinlerin sentezlenmesi

mümkün olabilmektedir. Yapılan en son cDNA analizleri, protein kodlayan genlerin % 60'ının iki veya daha fazla splays varyantının olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, insan genomu, sahip olduğu protein kodlayan gen sayısının üç katı kadar protein kodlama kapasitesine sahiptir.

Tablo 9.1: Kromozomların taşıdığı gen sayıları [Wellcome News Supplement Q1:13-23 (2001)] ve baz çifti olarak büyüklükleri [Nature 409:860-921 (2001)].

Kromozom	Gen Sayısı	Baz Çifti	Kromozom	Gen Sayısı	Baz Çifti
Kromozom 1	2968	279 x 106	Kromozom 13	748	118 x 106
Kromozom 2	2288	251 x 106	Kromozom 14	1098	107 x 106
Kromozom 3	2032	221 x 106	Kromozom 15	1122	100 x 106
Kromozom 4	1297	197 x 106	Kromozom 16	1098	104 x 106
Kromozom 5	1643	198 x 106	Kromozom 17	1576	88 x 106
Kromozom 6	1963	176 x 106	Kromozom 18	766	86 x 106
Kromozom 7	1443	163 x 106	Kromozom 19	1454	72 x 106
Kromozom 8	1127	148 x 106	Kromozom 20	927	66 x 106
Kromozom 9	1299	140 x 106	Kromozom 21	303	45 x 106
Kromozom 10	1440	143 x 106	Kromozom 22	288	48 x 106
Kromozom 11	2093	148 x 106	Kromozom X	1184	163 x 106
Kromozom 12	1652	142 x 106	Kromozom Y	231	51 x 106



Şekil 9.3: İnsan 18. kromozomundaki bazı genetik bozukluklara neden olan genler ve pozisyonları. (<https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Chrom18.jpg> web kaynağından alınmıştır. 12.02.2012).

Proteinler yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre familyalar şeklinde gruplandırılabilir. Benzer familyalara ait protein sayısı, genomları belirlenmiş diğer

omurgasızlarla karşılaştırıldığında insanlarda daha fazladır. Yine proteinler farklı veya koordine görevler yapan modüler domain denilen alt yapılara sahiptirler. İnsan proteinleriyle diğer organizmalara ait proteinler karşılaştırıldığında, insan proteinlerinin daha fazla modüler domainlerden oluştuğu görülmektedir. Proteinlerin yapısal benzerliklerinden faydalanarak fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Fonksiyonel yapıların nisbi olarak karşılaştırılabilmesi mümkünse de bu gün için birincil amino asit dizilerinin karşılaştırılarak fonksiyonların belirlenmesi çalışmalarında kat edilmesi gereken önemli bir yol vardır. Bütün protein familyalarının üç boyutlu yapılarının ayrıntılarını araştıran alan **yapısal genomik** olarak adlandırılır.

Genetikçiler, yaklaşık son 50 yıldır gen ürünlerinin ekspresyonu ve etkileşimleri üzerine çalışmaktadır. Fakat bu çalışmalar bir defasında bir veya bir kaç gen ile yürütülmekte idi. Genomik sayesinde bugün bir veya birkaç genin değil, bir organizmaya ait bir çok genin veya tamamının ekspresyon ve etkileşimlerini bir anda incelememiz mümkün olmuştur. Gen ürünlerinin ekspresyonu ve etkileşimini araştırmak için uygulanan bu küresel (bütün olarak hücreyi kapsayan) çalışmalar **fonksiyonel genomik** olarak adlandırılmaktadır. Fonksiyonel genomik araştırmalarla ilgili diğer bazı kavramlar da vardır. Bunlar kısaca tanımlanmıştır:

Transkriptom: Transkriptlerin dizilerini ve ekspresyon şekillerini (nerede, ne zaman, ne kadar ekspresyonu yapılacak?) ifade eder.

Proteom: Proteinlerin dizilerini ve ekspresyon şekillerini (nerede, ne zaman, ne kadar ekspresyonu yapılacak?) ifade eder.

İnteraktom: Protein ve DNA segmentleri arasındaki, proteinlerle RNA segmentleri ve proteinlerle proteinler arasındaki bütün fiziksel etkileşimleri ifade eder.

Fenom: Genomdaki her bir genin etkileşimi ile oluşturulmuş bütün fenotiplerin tanımlanması çalışmalarıdır.

Transkriptom ve interaktomlar mikrosıra (microarray) denilen bir teknikle belirlenir. Bu teknikte mümkün olan bütün genlerin belli bölgeleri olan oligonükleotitler bir mikroyonga (mikroçip) üzerine tuturulur, böylece bir DNA mikroyonga elde edilir. Sonra hedef hücrelerden elde edilmiş bütün RNA moleküllerini içeren karışım bu mikroyongaya eklenir. RNA moleküllerinin hangi oligonükleotitlerle hibritleştiği bilgisayar ortamlarda belirlenip analiz edilir. DNA moleküllerinin prob olarak kullanıldığı bu teknik **DNA mikrosıra (mikroarray)** olarak adlandırılır.

Bu özetlerin ötesinde, insan genom projesinin ve diğer organizmaların genom projelerinin tarihi gelişimi, hedefleri, sonuçları ve toplumsal etkileri hakkında daha ayrıntılı bilgilere aşağıdaki kaynaklardan ve burada sözü edilmeyen diğer bir çok kaynaktan ulaşılabilir.

İnsan genom projesi güncel bilgiler için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> ağ kaynağından ve diğer ağ kaynaklarından ayrıntılı bilgiye ulaşılabilir.