

Rekombinant DNA Teknolojisi ve Günümüzdeki Kullanımı

Ege SOYDEMİR, Zeynep Büşra AKSOY

Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara

Günümüz moleküler biyolojisi şu an bulunduğu noktanın büyük bir kısmını rekombinant DNA teknolojisine borçludur. Moleküler biyolojinin temellerini atan bu teknoloji, diğer bütün bilim dallarında olduğu gibi uzun bir süreçten geçerek günümüzdeki yerini almıştır. Fakat keşfinden sonra moleküler biyoloji bilim dalının (dolayısıyla medikal alanın) eksponansiyel bir şekilde büyümesini sağlamıştır. Günümüzde birçok ilacın üretiminde rekombinant DNA teknolojisi kullanılmaktadır.

Rekombinant DNA (rDNA) terimi basitçe, iki farklı türün DNA'larının birleştirilmesi ile ortaya çıkan DNA molekülüne denmektedir. Rekombinasyon'un temelleri, ilk defa 1928 yılında İngiliz Frederick Griffith tarafından araştırma dünyasına sunulmuştur. Dönemin Londra'sındaki zatürre salgınının sebebi olan bakteriler üzerinde çalışan Griffith, genetik maddenin hücreler arasında iletilip yeni bir genetik bilgi olarak dönüştürülmesine "genetik transformasyon" adını vermiştir (1-3). 1973 yılında rekombinant DNA teknolojisinin temelini oluşturan ilk in vitro plasmid, Stanley Cohen ve Annie Chang tarafından geliştirilmiştir (2,4). Bu çalışmaların üzerine hala, rekombinant DNA teknolojisi gün geçtikçe gelişmektedir.

Rekombinant DNA Teknolojisinin Prensipleri Nelerdir, Nasıl Çalışır?

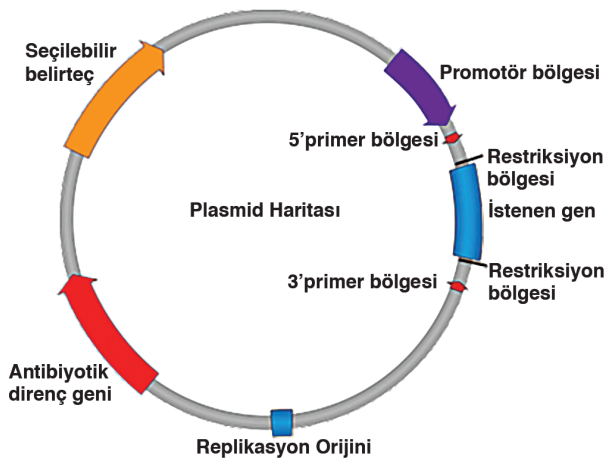
Rekombinant DNA teknolojisi, hedeflenen bir genin büyük miktarlarda üretimini veya hedeflenen bir geni ifade etme-

yen bir hücrenin, o hedeflenen geni ifade edebilmesini (bir diğer deyişle hedeflenen RNA'yı ya da proteini üretebilmesini) amaçlamaktadır. Rekombinant DNA iki ana parçadan oluşur; vektör plasmidi ve hedeflenen geni içeren DNA parçası (5). Plasmidler hücrelerin kromozomal DNA'larından ayrı, halkasal ve çift zincirli DNA molekülleridir. Plasmidler bakterilerde, mayalarda ve bazı ökaryotik canlılarda hali hazırda bulunmaktadır. Bu plasmidler ise genetik mühendisliği sayesinde vektör olmak üzere tasarlanmaktadır (6). Bakteriyel plasmidler dışında da tasarlanan vektörler bulunmaktadır. Başlıca, çalışılması istenen genin ve vektörün büyüklüğüne göre sırasıyla (küçükten büyüğe) şöyledir; fajlar, kosmidler, bakteriyel yapay kromozom (bacterial artificial chromosome) ve maya yapay kromozom (yeast artificial chromosome, YAC). Plasmidler bu vektörler arasında en küçükleridir (7).

Klonlama vektörleri, içerdikleri elementlere göre shuttle vektörleri, ifade vektörleri, gen knockdown vektörleri, reporter plasmidler ve viral plasmidler olmak üzere bir kaç türde farklılaşır (7,8). Klonlama plasmidleri, belirli DNA bölgelelerinin hücrenin içerisinde çoğaltılmasında kullanılır. Shuttle vektörleri birden fazla hücre türünde kullanılabilme için tasarlanmaktayken, ifade vektörleri ise belirli bir genin ifade edilmesi için tasarlanılmaktadır (7). Gen knockdown vektörleri, bir hücrenin ifade ettiği belli bir genin ifadesini azaltmak için tasarlanmaktadır (8). Reporter plasmidler ise başka gen-

leri çalışmak için kullanılmaktadır, bu plasmidler içerisinde reporter geni adı verilen başka genlerin ifadesi ile etkileşime girebilen DNA bölgesi bulunmaktadır, bu sayede başka genlerin ifadesi incelenebilmektedir (8). Viral plasmidler ise hedefleme çalışmaları için, ilaçların hedeflenmesinde kullanılabilen viral kapsidlerin üretiminde kullanılabilir (8). Vektör yapısında temel birkaç tane element vardır (Şekil 1) (8).

Sayılan vektörlerin ortak içerdiği temel elementler antibiyotik direnç geni, replikasyon orijini bölgesi (“origin of replication”) ve hedeflenen DNA bölgesinin eklenebileceği vektör bölgesidir (Şekil 1) (1,8). Antibiyotik direnç genleri konakçı olarak kullanılan bakterilerin kültür içerisinde seçimi için kullanılmaktadırlar. Rekombinant DNA vektörünün verildiği bakteri kültürlerine verildiğinde sadece vektörün çalıştığı bakteriler antibiyotik muamelesinde hayatta kalabilmektedirler (1). Antibiyotik direnç geni hücre seçimini sadece bakteriler arasında gerçekleştirebilmektedir, buna ek olarak farklı hücre kültürlerinde seçimi kolaylaştırması için antibiyotik direnç geni yerine seçilebilir belirteçler (“selectable marker”) kullanılmaktadır. Bu belirteçler belli maddeler ile hücre kültürleri muamele edildiğinde çalışmakta ve vektörü içeren hücrelerin kolayca seçilebilmesini sağlamaktadır (8). Replikasyon orijini ise, plasmid replikasyonunun hücre içerisinde başlayabilmesi için, ökaryotik kromozomal DNA üzerinde de birden fazla olarak bulunan DNA bölgesidir. Ana görevi replikasyonun başlaması için gerekli proteinleri bağlamasıdır (9). Hedeflenen gen bölgesinde çoklu klonlama bölgesi (“multiple cloning site”) denilen belirlenmiş restriksiyon bölgeleri

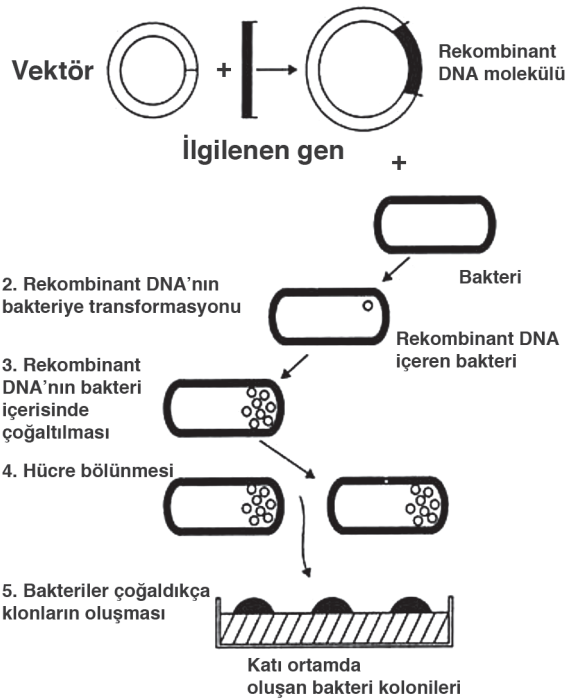


Şekil 1. Plasmid vektör haritası (8).

(“restriction site”) olan bölge bulunmaktadır. Bu bölgenin amacı vektör ile birleştirilecek olan DNA parçasının kolayca DNA ligaz tarafından birleştirilmesi ya da daha sonra kolayca belirli “restriksiyon endonükleaz” enzimlerini (EcoRI, HindIII vb.) kullanarak kesmektir (8,10). Promotör bölgesi (“promoter region”) ise ifade vektörlerinin olmazsa olmaz parçasıdır. Promotör bölgeleri, DNA üzerinde kendisinden sonra gelen genin ifade edilmesinin başlangıcı için gerekli olan transkripsiyon faktörleri ve RNA polimeraz gibi enzimlerin bağlanmasını sağlayan bölgedir (11). Restriksiyon bölgesine ek olarak “3’ ve 5’ primer bölgeleri” de vektör yapısına eklenebilir, bu bölgeler sayesinde daha sonraki bir klonlama ya da dizileme çalışması için vektörler hazır hale getirilir (8).

Kullanılan vektör ve DNA parçası DNA ligaz enzimi ile birleştirildikten sonra rekombinant DNA bir hücreye verilmek için hazır hale gelir. Rekombinant DNA hücrelere kimyasal ya da fiziksel yollarla verilebilmektedir. Bu olaya transformasyon adı verilmektedir, eğer konakçı hücre ökaryot ise transfeksiyon adı verilmektedir (12). Rekombinant DNA’nın hücreye girişi eğer virüsler tarafından sağlanıyorsa, buna da transdüksiyon denmektedir (13). Transfeksiyon, transformasyon ya da transdüksiyon uygulanmış hücrelere transgenik hücreler adı verilmektedir (6). Transgenik hücreler içerdiği rekombinant DNA’yı vektörün tipine göre klonlamaya, ifade etmeye ya da diğer rekombinant DNA özelliklerini (gen knockdown vektörleri, reporter vektörler vb.) göstermeye başlar, bu da rekombinant DNA teknolojisinin işlevselliğini ortaya koymaktadır (6) (Şekil 2) (14).

Rekombinant DNA teknolojisi medikal sektörde, ilaç sektöründe yoğun olarak kullanılmıştır ve hala günümüzde tedavi amaçlı ya da geliştirme amaçlı üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Çoğunlukla insan proteinlerinin (ya da hormonlarının) üretiminde kullanılmış olan rekombinant DNA teknolojisi (15) zaman geçtikçe aşilar ve gen terapileri üzerindeki çalışmalara (16) kadar geniş bir tedavi yelpazesine ulaşmıştır. Protein ve hormon üretimine verilebilecek en klasik örnek insülin ilaçlarıdır. Diyabet hastalıklarının (tip 1 ve 2) sebebi olan insülin hormonu eksikliği ya da yokluğuna karşın insülin üretiminin kolaylaştırılması amacıyla rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, insülin üretiminde ilk defa 1978-1981 yılları arasında adımlar atılmıştır (17-19). İnsan insülin hormonunun geni kimyasal olarak sentezlendikten sonra (19), rekombinant DNA teknolojisi ile insülin geni *Escherichia*



Şekil 2. Klonlama vektörü olarak bakteri plasmidi kullanılan rekombinant DNA teknolojisinin temel basamakları (14).

coli bakterisinde ifade edilmiştir (18). *Escherichia coli* üzerindeki ifadesinden bir yıl sonra 1981'de ise bu bakteride ifade edilen insülin hormonunun insan insülin reseptörleri ile etkileşime geçebildiği ve ilaç amaçlı kullanılabilceği ortaya çıkartılmıştır (17). 1982 yılında ise kullanımı birçok yerde kabul görmüştür (20). Rekombinant DNA teknolojisi ilaçların yanında birçok aşının üretiminde de rol almıştır, bu teknoloji ile hem viral kapsidler üretilebilmiş hem de aşıda kullanılacak olan virüsün patojenik etki yaratacak olan genomunun silinmesi sağlanmıştır (21). Hepatit B virüsü için aşlar ilk olarak serumdan hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) eldesi ile yapılmaktaydı. Daha sonra ilk olarak 1984 yılında rekombi-

nant DNA teknolojisi ile *Saccharomyces cerevisiae* mayasında, HBsAg gen dizisi içeren bir vektör hazırlanarak rekombinant HBsAg üretimi gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada şempanzeler üzerinde HBsAg içeren aşı denendiğinde Hepatit B virüsüne karşı direnç gösterdiği ortaya çıkmıştır (22). Bu aşının yetişkinlerde ve çocuklarda dozları ayarlanarak kullanıldığında güvenli ve etkili olduğu da daha sonra kanıtlanmıştır (23). Bu çalışma rekombinant DNA teknolojisi ile oluşturulan ilk aşığı ortaya çıkartmıştır. 1998 yılında yapılan bir çalışmada ise *Pichia pastoris* mayası kullanılarak ilk rekombinant insan serum albümini üretilmiştir ve klinik olarak denenmiştir (24). Çalışmanın sonunda ise rekombinant insan serum albüminin güvenli olduğu sonucuna varılmıştır (24). Bu üç çalışma gibi birçok çalışma, medikal dünyada tedavi amaçlı kullanılan birçok ilacın üretiminde büyük kolaylık sağlamıştır.

Temel moleküler biyoloji araştırmalarında da rekombinant DNA teknolojisi yoğunlukla kullanılmaktadır. Örneğin 2015 yılında yapılan bir çalışmada insan insülin benzeri büyüme faktörü bağlayan proteinleri (IGFBPs) rekombinant teknoloji ile HEK293 (embriyonik böbrek hücre kültürü) hücre hattında ifade edilmiştir (25). Bu çalışma sayesinde bu proteinlerin yapısal ve işlevsel görevinin daha kolayca ve hızlı bir şekilde çalışılabileceğine, dolayısıyla bu proteini hedefleyen yeni ilaçların çalışılmasına yol göstereceğine inanılmaktadır (25).

Günümüze kadar birçok ilacın, aşının veya tedavinin yollarını açmıştır rekombinant DNA teknolojisi. Bunun yanı sıra moleküler biyoloji ve genetik dallarının da gelişmesinde çok önemli bir role sahiptir. Günümüzde ise birçok projede kullanılmaktayken, bu projelerin bir kısmında tedavi amaçlı ilaç ve aşı geliştirmesinde kullanılmakta, bir kısmında ise temel moleküler biyoloji ve genetik araştırmalarında araç olarak kullanılmaktadır. İlerleyen bilim sayesinde rekombinant DNA teknolojisi gün geçtikçe gelişmekte ve geliştirilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Pray, L. Recombinant DNA technology and transgenic animals. Nat. Educ. 1, (2008).
2. Committee on the Independent Review and Assessment of the Activities of the NIH Recombinant DNA Advisory Committee; Board on Health Sciences Policy. in Oversight and Review of Clinical Gene Transfer Protocols: Assessing the Role of the Recombinant DNA Advisory Committee (National Academies Press (US), 2014). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK195888/>
3. Krebs JE, Goldstein ES, K. in Lewin's Genes X 4-5 (Jones and Bartlett Publishers, 2008).
4. Kiermer, V. The dawn of recombinant DNA. Nat. Milestones DNA Technol. 1028, 2246 (2007).
5. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. in Molecular Cell Biology 176-190 (W. H. Freeman, 2007).
6. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. in Molecular Cell Biology (W. H. Freeman, 2000).
7. Krebs JE, Goldstein ES, K. & ST. in Lewin's Genes X 49 (Jones and Bartlett Publishers, 2008).
8. AddGene. What is a Plasmid? AddGene at <https://www.addgene.org/mol-bio-reference/plasmid-background/>

9. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. in Molecular biology of the cell (Garland Science, 2002). at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26826/>
10. NewEnglandBioLabs. Types of Restriction Endonucleases. at <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases/restriction-endonucleases/types-of-restriction-endonucleases>
11. NatureEducation. Promoter. Nature Education (2014). at <http://www.nature.com/scitable/definition/promoter-259>
12. Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, et al. in An Introduction to Genetic Analysis 2–3 (W. H. Freeman, 2000). doi:http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21760/
13. Holmes RK, J. M. in Medical Microbiology (ed. Baron Samuel) (1996).
14. BiologyDiscussion. Principle Recombinant Technology (4 Steps). (2013). at <http://www.biologydiscussion.com/dna/recombinant-dna-technology/principle-of-recombinant-dna-technology-4-steps-2/12101>
15. Cederbaum, S. D., Fareed, G. C., Lovett, M. A. & Shapiro, L. J. Recombinant DNA in medicine. West. J. Med. 141, 210–22 (1984).
16. Neda Mousavi, N., Memarnejadian, A., Hadjati, J. & Aghasadeghi, M. R. Construction and Production of Foxp3- Fc (IgG) DNA Vaccine / Fusion Protein. Med. Biotechnol. 8, 57–64 (2016).
17. Keefer, L. M., Piron, M. a & De Meyts, P. Human insulin prepared by recombinant DNA techniques and native human insulin interact identically with insulin receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78, 1391–5 (1981).
18. Göddel, D. V et al. Expression in Escherichia coli of chemically synthesized genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 76, 106–10 (1979).
19. Crea, R. & Kraszewski, A. Chemical synthesis of genes for human insulin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75, 5765–5769 (1978).
20. Johnson, I. S. Human insulin from recombinant DNA technology. Science 219, 632–637 (1983).
21. Jackwood, M., Hickie, L., Kapil, S. & Silva, R. Vaccine development using recombinant DNA technology. Counc. Agric. Sci. Technol. Issue Pap. 7, 1–11 (2008).
22. McAleer, W. J. et al. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature 307, 178–180 (1984).
23. Zajac, B. A., West, D. J., McAleer, W. J. & Scolnick, E. M. overview of clinical studies with hepatitis B vaccine made by recombinant DNA. J. Infect. 3, 39–45 (1986).
24. Chen, Z., He, Y., Shi, B. & Yang, D. Human serum albumin from recombinant DNA technology: challenges and strategies. Biochim. Biophys. Acta 1830, 5515–25 (2013).
25. Wanscher, A. S. M. et al. Production of functional human insulin-like growth factor binding proteins (IGFBPs) using recombinant expression in HEK293 cells. Protein Expr. Purif. 108, 97–105 (2015).
26. A. Mithat Bozdayi, Kubilay Çınar, Ramazan İdilman, Ersin Karataylı, Senem Ceren Özen, Y. Ç. Klinisyenler İçin Moleküler Biyoloji Sözlüğü. (Türk Gastroenteroloji Vakfı, 2011).

TERİMLER ve ANLAMLARI (26)

DNA: Deoksiribonükleik asit. Dört çeşit deoksiribonükleotitten (A, T, G, C) oluşmuş iki polinükleotid molekülünün, hidrojen bağlarıyla antiparalel konumda bir arada tutulduğu, genetik bilgiyi taşıyan bir molekül.

RNA: Ribonükleik asit. Adenin, guanin, sitozin ve urasil bazlarının bir araya gelmesiyle oluşan ve riboz şekeri içeren organik asit.

In vitro: “Hücrelerin, dokuların ve organların ait oldukları organizmaların dışında, yapay ortamlarda (petri kapları, kültür şişeleri vb.) yetiştirilmesi veya bulunması” anlamına gelen terim.

Vektör: Konakçı hücre içinde çoğalma yeteneğine sahip, içine yabancı DNA yerleştirilmiş faj ya da plasmid gibi yapılar.

Plasmid: Hücrelerde bağımsız olarak replike olabilen küçük halkasal ekstrakromozomal (kromozom dışı) DNA molekülü. Çoğunlukla klonlama vektörü olarak kullanılır. Plasmidler, araştırmacı tarafından eklenen farklı DNA'lara sahip olabilir. Yaygın olarak kullanılan plasmidler pRB322, pGEM ve pUC18'dir.

Gen: Bir jenerasyondan sonrakine genetik bilgi taşıyan, kromozomun özgül bir bölgesinde yerleşim gösteren, kalıtımın fiziksel ve fonksiyonel birimi.

Gen ekspresyonu (gen ifadesi): Bir gende kodlanmış bilgiyi gözlenebilir bir fenotipe dönüştürmek için gerekli tüm işlemler (genellikle bir proteinin üretimi).

Fenotip (phenotype): Hücre ya da organizmanın, genetik yapısına bağlı olarak dış etkenlerin de etkisiyle ortaya çıkan gözlenebilir özelliği.

Faj (phage): Hücreleri enfekte eden herhangi bir virüs. (Örnek: bakteriyofajlar)

Kosmid (cosmid): 40kb'a kadar DNA parçalarını klonlamak için kullanılan, “cos” bölgesinin bir plasmide aktarıldığı klonlama vektörü.

Replikasyon (replication): DNA'nın kendini eşlemesi.

Belirteç (işaretleyici, marker): Bilinen bir genotipi belirlemek amacıyla kullanılan allel.

DNA ligaz (DNA ligase): İki DNA molekülünün, birbirlerine fosfodiester bağlarıyla 3' hidroksil ve 5' fosfat gruplarından bağlanmasını gerçekleştiren enzim. Genellikle T4 bakteriyofajından elde edilir. RNA ligazlar da vardır, ancak moleküler biyolojide nadir olarak kullanılır.

Restriksiyon enzimi: Çift zincirli DNA moleküllerinde, restriksiyon tanıma bölgeleri olarak adlandırılan kısa özgül nükleotid dizilerini tanıyan ve kesen enzim.

Transkripsiyon faktörleri: Ökaryotik hücrelerde, RNA polimeraz hariç, transkripsiyonu başlatmak ve kontrol etmek için gerekli her türlü proteine verilen genel ad.

Polimeraz: DNA'nın ve RNA'nın sentezini katalizleyen enzim. RNA polimerazlar RNA sentezini gerçekleştirirler.