Bakteriyel plazmitin gen klonlanmasında takip edilen aşamalar aşağıda verilmiştir:

1. İstenilen genin klonlanması için önce plazmit, bakteriden ayrıştırılır.

 2. Klonlanacak geni taşıyan DNA parçası ve plazmit aynı enzimle kesilir.

3. Kesilen plazmit ve klonlanacak genin uçları birbirini tamamlayan nükleotitlerden oluşur. Bu uçlar ligaz enzimi ile birleştirilerek klonlanacak gen plazmite eklenmiş olur. Bu durumda plazmit, farklı kaynaktan gelen iki DNA'nın kombinasyonu olduğu için bir **rekombinant (yeni bileşenli) DNA** molekülüdür.

4. Genetiği değiştirilmiş plazmit, bakteri hücresine tekrar aktarılır.

5. Bakteri, klonunu oluşturmak üzere kültürde çoğaltılır. Plazmite aktarılan gen klonlanmış ve yeni hücrelere de aktarılmış olur. Böylece bir canlıya ait gen, diğer bir canlıya yeni bir metabolik özellik kazandırmak amacıyla kullanılır.

 Rekombinant DNA teknolojisinden ilaç üretimi, sanayi, tarım gibi birçok alanda yararlanılmaktadır. Bitki ve hayvanlardaki eksik genlerin meydana getirdiği olumsuzluklar rekombinant canlıların oluşturdukları ürünlerle giderilebilir. Örneğin böbreklerde sentezlenen ve alyuvar üretimini uyaran eritropoietin hormonu rekombinant DNA teknolojisiyle de elde edilir ve böbrek hastalarında oluşan kansızlığın tedavisinde kullanılır.

Rekombinant DNA teknolojisiyle oluşturulmuş enzimler; deterjan, şeker ve peynir üretiminde kullanılmaktadır.

**1. Bitkilerde Klonlama**

Bitkilerde rekombinant DNA teknolojisi tarım için oldukça önemli bir gelişmedir. Bu yöntemle bitkinin ürün kalitesi, tohum verimliliği yükseltilir. Aynı zamanda bitkinin böcek ilacına, hastalığa, soğuğa, tuza, kuraklığa vb. karşı direncini artırmak da mümkündür.

Genetiği değiştirilmiş tek bir hücreden verimli bitki türleri elde edilebilir. Oluşan türler sonraki nesillere yeni özelliklerini tohumla taşır. Bitki hücrelerine yeni genlerin aktarılmasında kullanılan taşıyıcı (vektör), çoğunlukla bir toprak bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens* (Agrobakteriyum tumefasiyens) ten elde edilen ve kendini eşleme özelliğine sahip olan plazmittir. *Agrobacterium* doğal olarak plazmitini bitki hücresine aktarabilme özelliğine sahiptir. Bu bakterinin plazmiti konukçu bitki hücresinin çekirdeğindeki DNA'ya katılır. Rekombinant olan bu plazmit bitki hücrelerini enfekte etmekte kullanılır. Sonrasında doku kültürü yöntemi kullanılarak rekombinant DNA taşıyan bitkiler elde edilebilir.

Örneğin *Agrobacterium'*un plazmitlerinden birine (A plazmiti) rekombinant DNA tekniğiyle antibiyotik direnç geni ve böceklere karşı direnç geni aktarılır. Bitki yaprağı kesilerek yaralanma bölgesine *Agrobacterium* bakterisi bulaştırılır (Şekil 2.40). Yaralanan bitki hücrelerinden salgılanan özel bir madde, bakterideki diğer plazmiti (B plazmiti) aktif hâle geçirir. B plazmiti, rekombinant A plazmitin bitki hücresine geçmesini sağlar. Böylece istenilen gen bitkilere aktarılmış olur. Genetiği değiştirilmiş bitki hücreleri antibiyotik ve büyüme hormonu içeren kültür ortamına taşınır. Genetiği değiştirilmemiş hücreler antibiyotik sebebiyle ölürken genetiği değiştirilerek direnç kazanmış hücreler çoğalır ve yeni bitkiyi oluşturur. Oluşan yeni bitki hem antibiyotiğe hem de böceklere karşı dirençli olur.

**2. Hayvanlarda Klonlama**

Hayvan hücrelerinde genetik yapının değiştirilmesiyle hayvanlara yeni özellikler kazandırılır. Bir hayvan ücresine rekombinant DNA'nın aktarımı sonucu kalıtsal bir özelliğin değişmesi aşağıdaki örnekle açıklanabilir(Şekil 2.41).

Döllenmiş fare yumurtaları (zigot) dişi farenin döllenme kanalından çıkarılarak deney tüpüne aktarılır. İnsanda büyüme hormonu içeren hücrenin genini taşıyan DNA parçası enzimle kesilir. İnsan büyüme hormonu geni taşıyan DNA, mikroenjeksiyon yöntemiyle deney tüpündeki döllenmiş yumurta hücrelerine aktarılarak

rekombinant DNA elde edilir. Böylece fare genomuna yeni bir gen katılmış olur. Yeni özellikteki bu hücreler mikropipetle vakumlanarak taşıyıcı anne farenin döl yatağına aşılanır ve gelişmeye bırakılır. Rekombinant DNA'yı bulunduran yumurtalardan meydana gelen farelerin normal DNA'ya sahip yumurtalardan meydana

gelen farelere göre olağanüstü büyüklüğe sahip olduğu görülmüştür. Üç nesil boyunca farelerin kuyruğundan alınan hücrelerin DNA analizi yapılmış ve bu farelerin insan büyüme hormonu geni taşıdıkları görülmüştür.

 Gen mühendisliği alanında kök hücreler üzerine de çalışmalar yapılmaktadır. Kök hücreler; kendini yenileme özelliğine sahip, vücut içinde veya laboratuvar ortamında uygun şartlar sağlandığında birçok farklı hücre tipine dönüşebilen farklılaşmamış hücrelerdir. Örneğin kemik iliğindeki kök hücreler kan hücrelerinin tüm çeşitlerine dönüşebilir.

Yetişkin kök hücreleri, kordon kanından elde edilen kök hücreler ve embriyonik kök hücreler günümüzde bilinen üç temel kök hücre kaynağıdır.

Yetişkin kök hücreleri, vücutta birçok doku ve organda bulunur. Bulundukları bölgedeki hücrelerin hasar görmesi durumunda çoğalarak hasarlı kısmın onarılmasını sağlar. Embriyonik kök hücreler, erken gelişim dönemindeki embriyolardan elde edilir. Bu hücreleri kültür ortamında yetiştirmek daha kolaydır. Embriyonik kök hücreler zamana bağlı olmaksızın çoğalırGünümüzde kök hücrelerle ilgili çalışmalar en çok kalp kası, karaciğer, sinir, pankreas ve kan hücreleri üzerine yoğunlaşmıştır. İnsan embriyonik kök hücrelerinin sürekli kendini yenileme ve tüm hücrelere dönüşebilme yetenekleri vardır. Kök hücrelerinin bu özellikleri sayesinde omurilik yaralanmaları, parkinson, enfarktüs, Alzheimer ve diyabet gibi günümüzde tedavisi olmayan veya tedavisi son derece sınırlı olan hastalıklara yakın gelecekte tedavi olanağı sağlanabilecektir.

**B. Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Uygulamaları**

Genetik mühendisliği ve biyoteknoloji uygulamaları tıp, endüstri, tarım, çevre vb. alanları kapsamaktadır. Dolayısıyla bu çalışmalar yaşamımızı her alanda etkilemektedir. **Tıp alanındaki uygulamalar:** DNA teknolojisi, tıp ve eczacılık endüstrisine yeniden şekil vermiştir. Modern biyoteknoloji hastalıklara tanı konulmasında ve çeşitli ilaçların geliştirilmesinde tıbbi yönden sayısız katkılar sağlamaktadır. Bu teknoloji ile elde edilen ilk ürün **insülin** hormonudur. 1980'li yıllarda gen mühendisliğinin ürettiği doğal insülin yaygın olarak kullanılmaya

başlanmıştır. Bundan önceki yıllarda insülin, domuz ve sığırdan elde ediliyordu; ancak bu yöntem oldukça masraflıydı. Ayrıca hayvanlardaki insülinin kimyasal yapısının insandakinden farklı olması bazı alerjik tepkilere de neden olmaktaydı. Gen mühendisliğiyle elde edilen insülin, kimyasal olarak insan insülininin aynısıdır. Ayrıca bu yöntemle daha ucuz ve çok miktarda insülin üretilir (Şekil 2.42).

 İnsülin üretiminde kullanılan bu yöntem daha sonra büyüme ve kalsitonin hormonunun

üretimi için de kullanılmıştır.

Hücrelerin virüslere karşı oluşturduğu protein yapısındaki özel savunma maddesi olan **interferon,** önceleri binlerce litre kandan sadece birkaç gram üretilebiliyordu. 1980'li yıllarda izole edilen insan interferon

geninin *E.coli* bakterisinin genomuna yerleştirilmesiyle çok daha ucuz ve fazla miktarda interferon üretimi gerçekleştirilmiştir. Üretilen interferondan virüs enfeksiyonlarının engellenmesinde yararlanılmaktadır.

 **Endüstri alanındaki uygulamalar**:

Günlük hayatımızın bir parçası olan bazı endüstriyel ürünlerin yapısında enzimler bulunmaktadır. Bazıları sentetik olarak da üretilen enzimlerin biyoteknolojik yöntemlerle mikroorganizmalar tarafından daha hızlı ve ekonomik üretimi sağlanmaktadır. Enzimler çevre kirliliğinin önlenmesinde; besin, bira, malt üretiminde ve ilaç, deri, deterjan vb. sanayi sanayisinde kullanılmaktadır.

**Tarım alanındaki uygulamalar:**

Bilim insanları, tarımsal yönden önemli bitkilerin ve hayvanların genomları hakkında daha fazla bilgi edinebilmek için çalışmalar yapmaktadır. Günümüzde çiftlik hayvanlarının tedavisinde kullanılan aşılar, büyüme hormonları, tıp ve eczacılıkta kullanılan proteinler DNA teknolojisi ile üretilmektedir.

Tarımda en önemli sorunlardan biri ürünlere zarar veren böceklerdir. Böceklerle mücadelede en yaygın yöntem böcek öldürücü kimyasalların kullanımıdır. Ancak uzun süre kullanılan böcek öldürücüler doğal dengeyi bozmaktadır. Bu nedenle gen mühendisliği yoluyla mücadele yöntemleri önem kazanmaktadır. Örneğin bir bakteri türünden elde edilen toksin, 48 saat içinde böcek larvalarını öldürmektedir. Böcek larvalarını öldüren toksini şifreleyen gen, bakteri plazmitine aktarılır. Bu bakterilerin bulaştığı domates, tütün ve pamuk gibi bitkiler, böceklere karşı direnç kazanır. Dirençli bitkilerin üretimi sonucu kimyasal böcek öldürücülerin kullanımı azalmaktadır.

Gen mühendisliği sadece tarımsal mücadeleye yönelik değildir. Bitkiler üzerinde verimi artırıcı çalışmalar da yapmaktadır. Örneğin yoncaya, amino asit sentezine yardımcı olan bir gen aktarılarak bitkinin protein değeri yükseltilmiştir.

Gen mühendisleri bazı bitkileri köklerinden daha fazla sitrik asit salgılayacak şekilde genetik olarak değiştirmeyi başarmışlardır. Kazandırılan bu yeni özellik bitkinin topraktaki fosfatı daha fazla emmesini sağlamış, ayrıca zararlı alüminyum iyonlarına karşı bitkiyi daha dayanıklı kılarak verimi artırmıştır.

**Çevre alanındaki uygulamalar:**

Gen mühendisleri çevreyle ilgili sorunların çözümü için oldukça yoğun çalışmalar içerisindedir.

Bilim insanları, bazı çevresel problemlerin çözümünde mikroorganizmalara gen aktarılması yöntemini kullanmaktadır. Örneğin pek çok bakteri; bakır, kurşun ve nikel gibi ağır metalleri ortamdan alarak bakır sülfat, demir sülfat gibi bileşiklerin yapısına katar. Böylece ağır metaller canlıların tekrar kullanımına hazır hâle getirilir. Gen mühendisliğiyle elde edilen mikroorganizmalar, mineral madenciliğinde ve doğadaki zehirli atıkların temizlenmesinde önemli rol oynar. Lağım sularının arıtıldığı sistemlerde, çok sayıda organik bileşiği parçalayarak zararsız hâle getiren mikroorganizmaların rolü oldukça önemlidir

 **Genom Projesi**

Gen mühendisliği uygulamalarının biri de genom projesidir. Gen mühendisleri, bir organizmanın genomundaki tüm genleri sistematik olarak tanımlamak ve haritalamak için projeler geliştirmişlerdir. Bu çalışmalarda özellikle meyve sineği, mısır, fare, bakteri ve mayalar üzerinde yoğunlaşılmıştır. Meyve sineği gibi organizmalarda kromozom sayısının az olması (2n=8) nedeniyle genlerin kromozomlar üzerinde yerleşimlerinin fiziksel haritaları daha kolay oluşturulmuştur. Yaklaşık 90 yıl önce geliştirilen bu çalışmalar, genetik alanındaki uygulamalara ışık tutmuştur.

Günümüzde prokaryot ve ökaryotlarda yüzlerce genom dizisi saptanmıştır. Binlerce proje üzerinde çalışmalar hâlen devam etmektedir. Genom projelerinin en iyi bilineni ve en büyüğü **İnsan Genom Projesi** (İGP)dir. İGP çalışmaları, insan genomundaki tüm DNA baz dizilimini belirleyerek kalıtsal hastalıklardan sorumlu

genlerin tanımlanması ve haritalanması amacıyla 1990 yılında başlatılmıştır.

İnsan genomu 3 milyarın üzerinde nükleotit ve 25-30 bin civarında gen içerir. Kalıtsal hastalıkların kökeninin araştırılması ve bu hastalıkların tedavi edilmesi ancak insan genomunun tamamının deşifre edilmesiyle mümkün olacaktır.

 İGP'nin insanlarda yarattığı ahlaki, yasal ve sosyal sorunları ortadan kaldırabilmek için ELSİ (Ethicali Legal and Social İmplacitions) programı başlatılmıştır. Bu şekilde genetik bilginin korunması garanti altına alınmıştır. **DNA Parmak İzi** Canlılarda genetik bir bozukluğun olup olmadığı ve türler arasındaki farklılıklar DNA parmak izi yöntemiyle belirlenebilmektedir.

Her bireyin DNA dizilimi, tek yumurta ikizleri hariç, kendine özgüdür. DNA parmak izi yöntemi, bir insanın DNA'sını oluşturan baz sırasının diğer insanların DNA baz sıralarından farklı olmasına dayanır.

 DNA parmak izi suçluların tespitinde kullanılan yaygın bir yöntemdir. Bu yöntemle olay yerinde bulunan kan, tükürük, kıl ve tırnak gibi canlı kalıntıları kriminal çalışmalarla incelenerek suçlunun bulunması sağlanır. İki kişinin aynı DNA parmak izine sahip olma olasılığı oldukça düşük olduğundan birçok adli vakada bu yöntemden faydalanılır.

DNA parmak izi yöntemi günümüzde göçmen sorunları, safkan köpek ırklarının belirlenmesi, babalık davaları, bitki ve hayvan türlerinin korunması çalışmaları dâhil çok geniş bir uygulama alanına sahiptir.

Gen mühendisliği ve biyoteknolojinin yanı sıra son yıllarda nanoteknoloji alanında araştırmalar yapılmaya ve ürünler oluşturulmaya başlanmıştır. **Nanoteknoloji Alanındaki Uygulamalar**

Nanoteknoloji 1-100 nm arasındaki boyutlarda malzemelerin özelliklerini inceleyen, mühendislik, fizik, kimya, biyoloji ve tıp alanlarını kapsayan disiplinler arası bir alandır. Nanoteknoloji ile maddelerin önceden bilinmeyen özellikleri keşfedilmiş, elde edilen bulgular kullanılarak yeni cihaz ve sistemler geliştirilmiştir. Bu

cihaz ve sistemlerden hastalıkların tanı ve tedavisinde yararlanılmaktadır.

Nanopartiküller kanserli hücrelerin büyümesini önlemede, nano lifler biyomedikal alanda, tıbbi protezlerde (yapay organlarda ve yapay damarlarda), teletıp malzemelerinde, ilaç transferinde, yara örtü malzemelerinde, tıbbi yüz maskelerinde ve doku iskeletlerinde kullanılmaktadır.

Tarımda kimyasal yolla pestisit aktivitelerinin iyileştirilmesi, besinlerin ve çevrenin kalite kontrolünün yapılması, hücre içi aletler, hücre uyarımı ve tanısı, DNA dizilimi, manipülasyonu ve tanısı, tarımsal aletler, ilaç salınımı, sentetik biyoloji, nano aletler, biyorobotikler ve tedavilerin düzenlenmesi gibi çalışmalar da nanoteknolojik alandaki uygulamalar içerisine girmektedir.

**C. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar**

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO) gen mühendisliği çalışmalarıyla genomu değiştirilmiş organizmalardır. GDO üretilmesinin amacı dünya nüfusunun beslenmesine ve açlığın önlenmesine

yardımcı olmaktadır. Bilim insanları, DNA teknolojisinin gücünü fark edince bu gücün doğaya ve canlılara zarar vermesi konusunda endişe duymaya başlamışlardır.

 GDO'ların üretimi ve kullanımıyla ilgili Birleşmiş Milletler bünyesinde 1992 yılında yapılan Rio Konferansında Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesi ile ilgili bir protokolün hazırlanması karara bağlanmıştır.

BM Biyolojik Çeşitlilik Sözleşmesine ek Biyogüvenlik Protokolü 2000 yılında ülkelerin imzasına açılmış, Türkiye'de bu 184 protokol 24 Ocak 2004'te yürürlüğe girmiştir. Ülkemizde biyoteknoloji ile ilgili çalışmaların yasal zemini Mart 2010'da yürürlüğe giren Biyogüvenlik Kanunu ile oluşturulmuştur.

Doğal olmayan, yapay yöntemlerle elde edilen GDO'lu ürünlerin doğaya ve insan sağlığına etkilerinin neler lduğu hâlen araştırılmakta ve tartışılmaktadır. GDO kapsamındaki bitkiler, doğal bitkilerden farklı olarak genomlarında kendi türlerine ait olmayan genleri taşıdıklarından, bu bitkilerin yetiştirildikleri ülkelerde başta

sağlık olmak üzere, çevre ve sosyoekonomik yapı üzerinde önemli riskler söz konusu olmaktadır.

GDO'lu ürünleri tüketen insanlarda besin alerjisi oluşması en sık görülen sağlık riskidir. Bu tür gıda maddelerinin etiketlerine gerekli uyarıların yazılması besin alerjisi olan bireyleri koruma açısından oldukça önemlidir.

 GDO'lu besinlerin kanserojen etkisinin olabileceği birçok bilim insanı tarafından belirtilmektedir. Ayrıca günümüzde kullanılan biyoteknolojik tekniklerle bitkilere aktarılan genlerin çoğunluğu bakteri ve virüs kökenlidir. Bu genler hastalık yapan bakterilerle birleştiğinde antibiyotikle tedavisi mümkün olmayan hastalıkların ortaya çıkabileceği bilim insanları tarafından tartışma konusudur. GDO'lu ürünlerin insan sağlığına etkilerinin tam olarak anlaşılması için bilimsel araştırmalar hâlen devam etmektedir.

Genetiği değiştirilmiş ürünlerin patentli olması gerekmektedir. Genetiği değiştirilmiş ürünleri kullanan gıda endüstrileri, tüketicilerin GDO'lu ürünleri satın almamaları endişesiyle çoğu kez gıda etiketleme işine karşı çıkmaktadır. Diğer taraftan gıda alerjisi bulunan insanların bir ürünü satın alırken sağlıklı karar verebilmek

için etiket bilgilerine ihtiyaç duyduğu bir gerçektir.

 Günümüzde birçok ülke tarım, endüstri ve tıp gibi alanlarda biyoteknolojik ürünlerin ve uygulamaların güvenliğini sağlarken diğer taraftan biyoteknolojinin kullanımını nasıl kolaylaştırabilecekleri konusunda çalışmalar yapmaktadır. Çevre ve sağlık açısından potansiyel tehlikelerle ilgili endişelerin yanında etik endişeler de yeni biyoteknoloji tekniklerinin uygulanmasını yavaşlatabilir.İnsanların biyoteknoloji ile ilgili bilinçli olması, gen mühendisliği konusunda yapılan bilimsel denemelerin sonuçlarını doğru değerlendirebilmek açısından önemlidir. Genetiği değiştirilmiş organizmalar ve diğer gen mühendisliği ürünlerinin insan sağlığı ve çevre için güvenilirliliği açısından gerçekleştirilen bilimsel denemeler kamuoyu tarafından doğru değerlendirilmelidir.