

# GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

## DOÇ. DR. MEHMET KARACA

# Genetik Mühendisliği

- Genetik mühendisliği bir organizmanın (hayvan, bitki veya mikroorganizma) genomunda (sitoplazmik ve/veya nükleer) bulunan gen veya genlerin kontrollü bir şekilde belirli amaçlar doğrultusunda “yerinde değiştirilmesi, kopya sayısının artırılması veya azaltılması”, veya başka bir organizmadan yeni gen veya genlerin transfer edilerek eklenmesi için gerekli kuralları araştıran bilim dalıdır.

# Genetik Mühendisliğinde Başlıca Aşamaları

İstenilen özelliği kontrol eden gen veya genlerin belirlenmesi

Bu gen veya genlerin transformasyon (ekspresyon) vektörüne yüklenmesi. Promotor, terminator, diğer regülatör ve destek nükleik asit dizinleri ile birlikte gen kasetinin kurulumu

Vektörün uygun bir transformasyon yöntemiyle hedef hücrelere (eksplant-totipotent hücrelere) transfer edilmesi- transformasyon

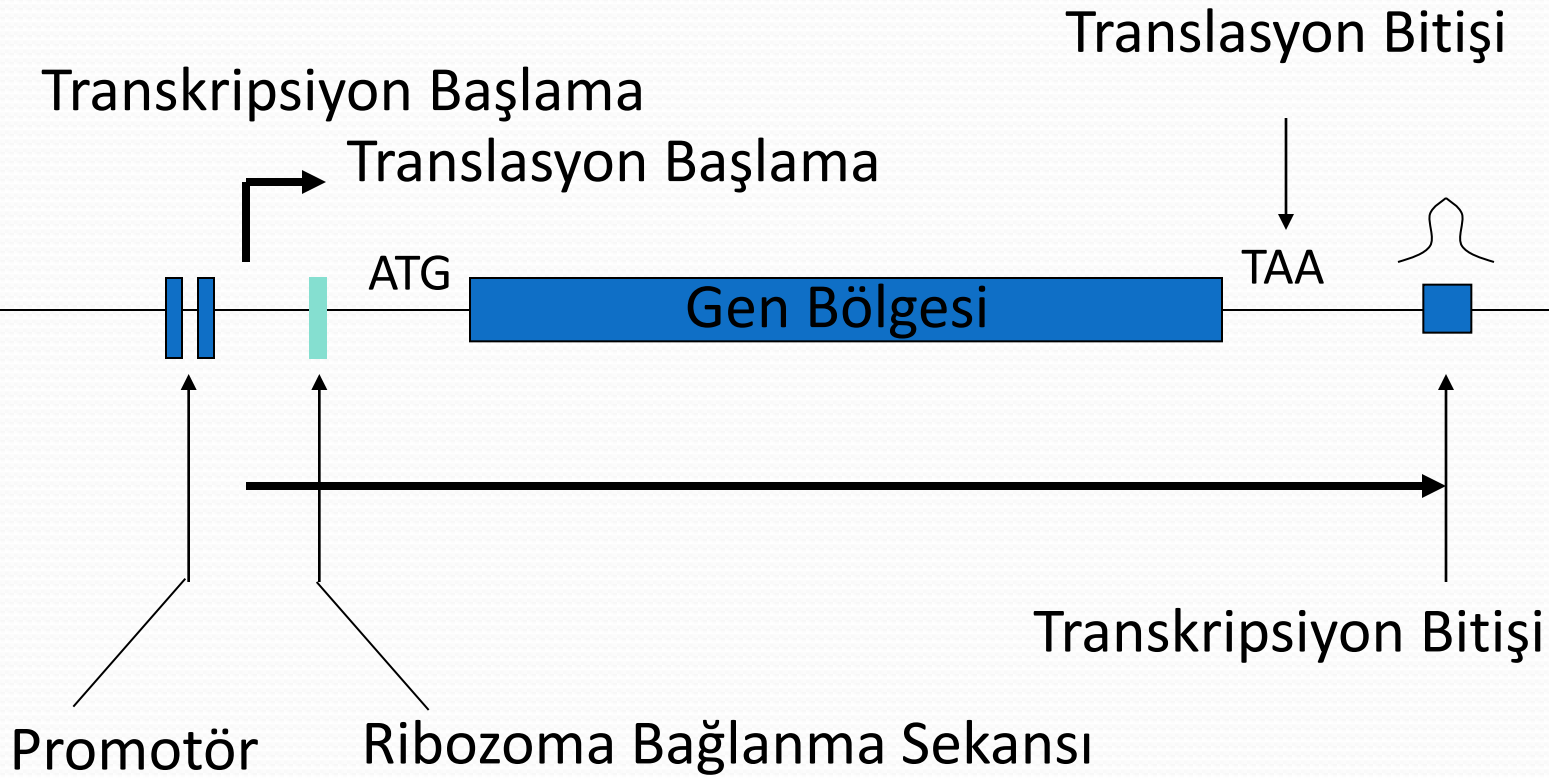
Transfer edilen hücrelerden bitkiciklerin elde edilmesi

Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi

Transgen ifadesinin saptanması

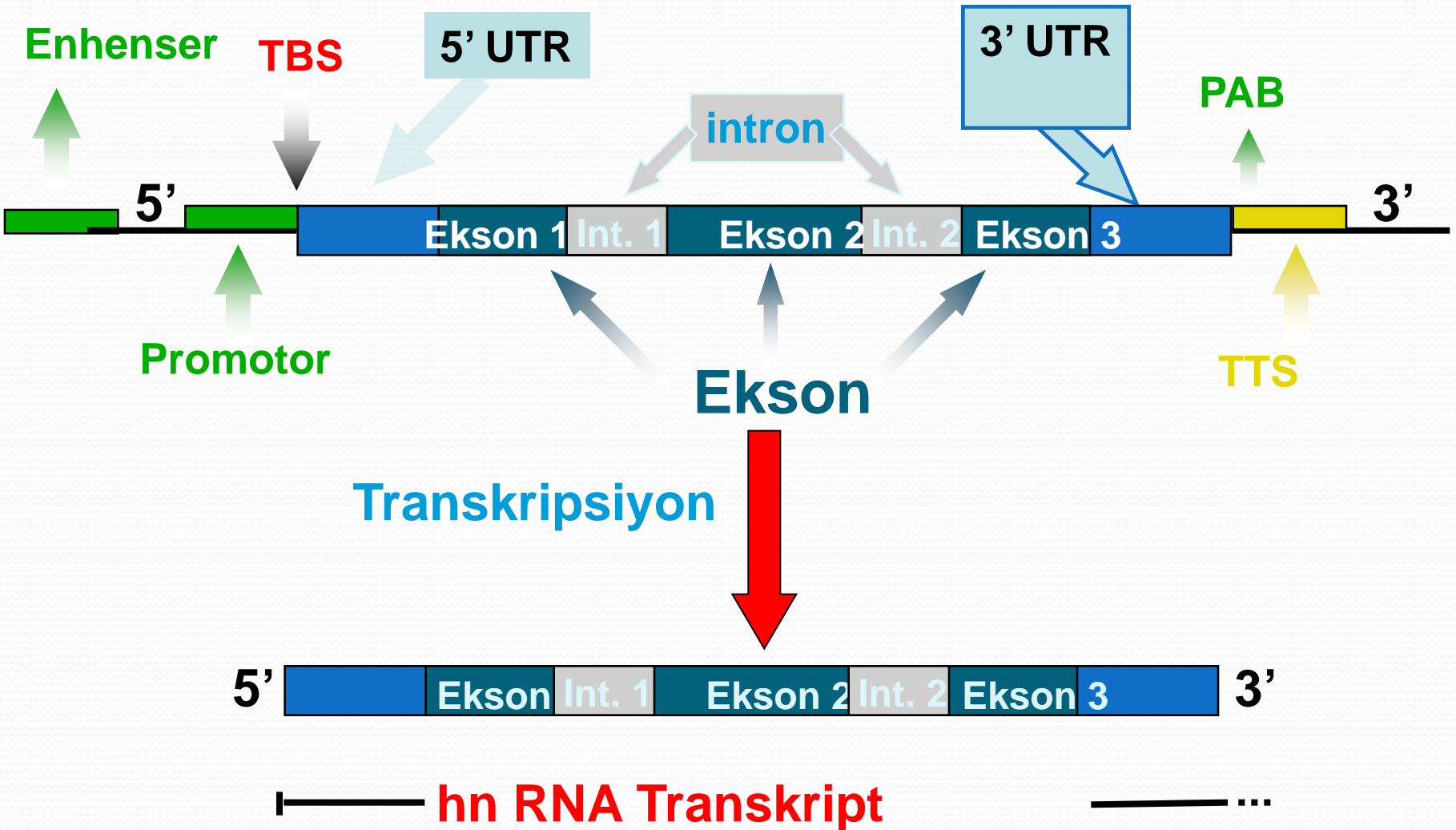
Transgenin uygun bir elit bitkiye geleneksel ıslah yöntemleriyle aktarılması ve hibrit tohumluk üretimi

# Basit Bir Bakteriye Gen Kaseti



**Regülatör (Promotör/RB dizileri) + Gen+ Regülatör (Terminatör)**

# Basit Bir Ökaryotik Gen Kaseti



# Bir genin hikayesi....

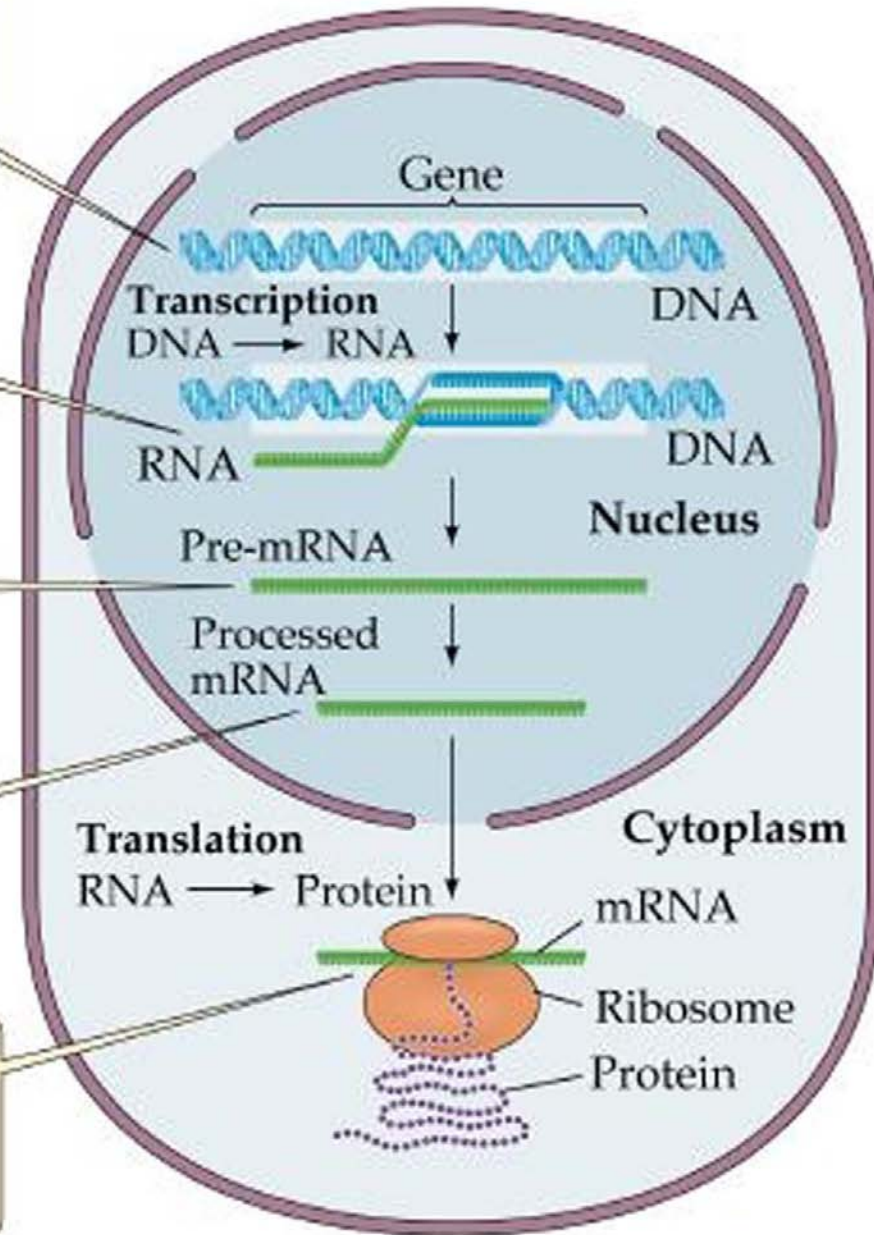
PROTEİNLERİ KODLAYAN  
DNA GEN FORMUNDA  
NÜKLEUSTA BULUNUR

DNA FORMUNDAKİ  
GENLER HAM RNA'YA  
(hn-RNA) VE SONRA  
mRNA FORMUNA  
DONÜŞTÜRÜLÜR  
(TRANSKRİPSİYON)

HAM RNA İŞLENEREK  
OLGUN mRNA'YA  
ÇEVİRİLİR.

OLGUN mRNA  
SİTOPLAZMAYA  
GÖNDERİLİR

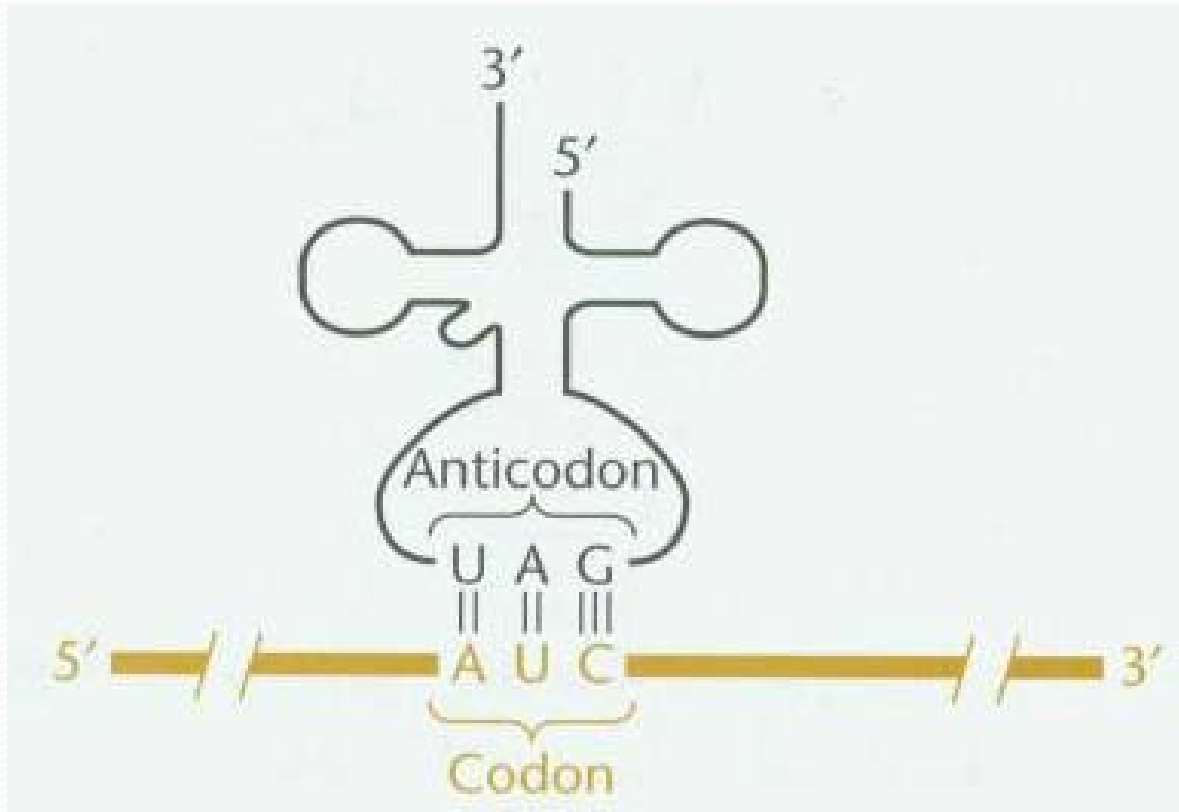
STOPLAZMADA OLGUN  
mRNA RİBOZOMLARDA  
POLİPEPTİT SENTEZİ  
GERÇEKLEŞTİRİLİR  
(TRANSLASYON)



**Kodon:** Kodon DNA/mRNA üzerinde bulunan ve bir amino asite karşılık gelen 3'lü bazların oluştuğu tripleks bazlardır.

**Antikodon:** tRNA'nın antikodon bölgesinde bulunan ve KODON'a komplementer olan 3 bazlık triplettir.

**Örneğin Antikodon:** 3'-UAG-5' ise **Kodon:** 5'-AUC-3'



# GENETİK KOD (mRNA)

5'- (BİRİNCİ BAZ)

ORTADAKİ BAZ

3'- (ÜÇÜNCÜ BAZ)

↓	<b>U</b>	<b>C</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	↓
<b>U</b>	Phe Phe Leu Leu	Ser Ser Ser Ser	Tyr Tyr Stop Stop	Cys Cys Stop Trp	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>
<b>C</b>	Leu Leu Leu Leu	Pro Pro Pro Pro	His His Gln Gln	Arg Arg Arg Arg	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>
<b>A</b>	Ile Ile Ile Met	Thr Thr Thr Thr	Asn Asn Lys Lys	Ser Ser Arg Arg	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>
<b>G</b>	Val Val Val Val	Ala Ala Ala Ala	Asp Asp Glu Glu	Gly Gly Gly Gly	<b>U</b> <b>C</b> <b>A</b> <b>G</b>



<i>single-letter code</i>	<i>abbreviation</i>	<i>full name</i>
A	Ala	Alanine
R	Arg	Arginine
N	Asn	Asparagine
D	Asp	Aspartic acid
C	Cys	Cysteine
Q	Gln	Glutamine
E	Glu	Glutamic acid
G	Gly	Glycine
H	His	Histidine
I	Ile	Isoleucine
L	Leu	Leucine
K	Lys	Lysine
M	Met	Methionine
F	Phe	Phenylalanine
P	Pro	Proline
S	Ser	Serine
T	Thr	Threonine
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosine
V	Val	Valine

# VEKTÖRLER/PLAZMİTLER

Ekspresyon ve klonlama vektörleri transfer edildiği alıcı organizmalarda, bu organizmadan bağımsız olarak replikasyon (çoğalma) özelliği gösterirler. Vektörlerin replikasyonları sadece alıcı hücre içerisinde (veya PZR) gerçekleşir. Bu nedenle replikasyon orijini içerirler.

Ekspresyon vektörleri klonlama vektörlerinden farklı olarak aktarılmak istenen genin dokular üzerinde ifade edilebilmesi için RNA polimerazların tanıyıp bağlanabilecekleri düzenleyici diziler (PROMOTÖR, transkripsiyon, translasyon için başlama ve bitiş işaretleri, poliadenilasyon işareti ve ribozoma bağlanma DNA dizileri) içermektedir.

- Ekspresyon vektörleri ayrıca sadece gen aktarımı yapılan hücre ve dokuların seçimi için SELEKSİYON geni (seleksiyon markır geni yada genleri) içerirler.
- Ekspresyon vektörleri aktarılan genin bitkide anlatım yapıp yapmadığının anlaşılmasına yardımcı olmak üzere yer alan RAPORTÖR gen yada genlerden de oluşur.
- Ayrıca her iki vektör sisteminde yabancı DNA'nın vektöre eklenebilmesi için özel restriksiyon enzim tanıma sekanslarından oluşur.
- Transfer edilecek genin yerleştirildiği DNA dizilerinin sağ ve sol taraflarında ise homoloji tabanlı rekombinasyonu sağlamak amacıyla özel DNA dizileri yerleştirilir.

- **TRANSFORMASYON/EKSPRESYON VEKTÖRLERİ:**
- Ekspresyon Vektörleri Aynı Zamanda Transformasyon Vektörü olarakta kullanılır.
- Transfer edilecek genin organellere mi yoksa nükleusa mı entegre edileceğine göre bu vektörlere özel diziler eklenerek entegrasyonun doğruluğu artırılabilir.
- Plastid (kloroplast) vektörleri, LTR ve RTR olarak gösterilen sağ ve sol plastid hedefleme bölgeleri ile organellere hedeflenirler.
- Belirlenmiş DNA sekansları seçilen bölgeye homologdur ve 1-2 kb boyutundadırlar. 50 kb DNA (20-30 genlik) girişi için uygundur.
- Plastid tekrar vektör (pPRV) serileri, trnV-rps12 bölgesine girişi hedeflerler.
- Plastid transgenleri, 5'-PL (promotor ve lider) ve 3'-T kaset (T-terminatör) de eksprese olurlar.
- PL kasedi, promotör ve translasyon kontrol dizisi içerir.
- Translasyon kontrol dizisi, mRNA 5'-translasyona uğramayan bölge (UTR) veya 5'-translasyon kontrol bölgesi (TCR) olabilir.

## **Ekspresyon Vektörlerinde Bulunan Gen Kasetlerinde:**

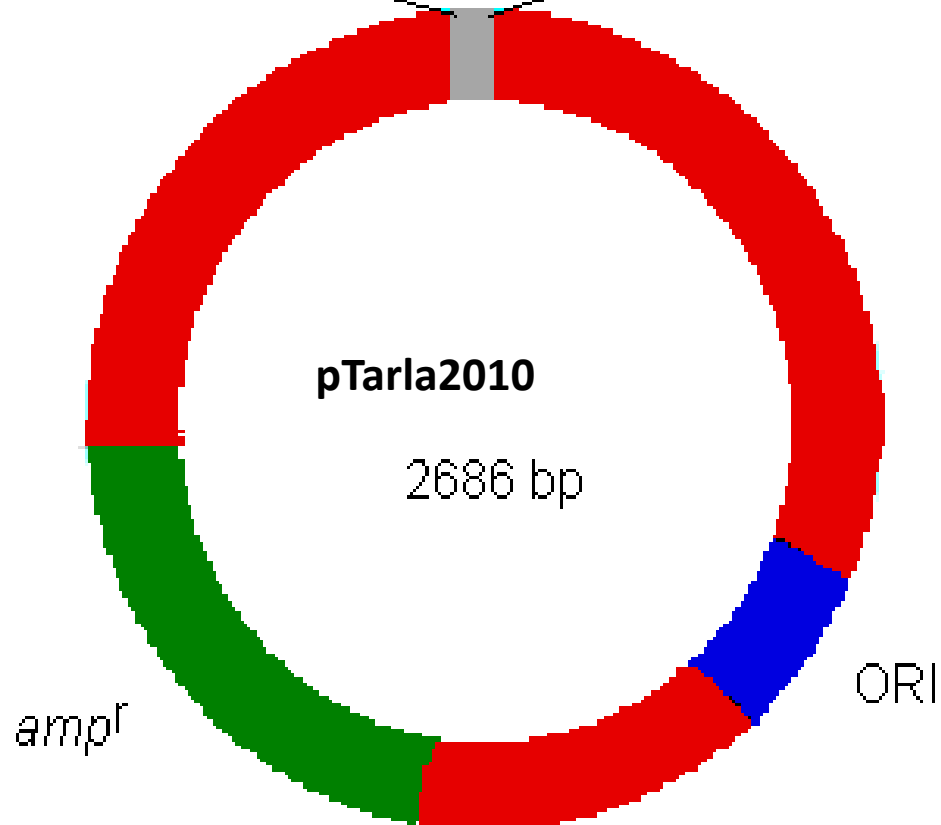
**mRNA'ların 5'-UTR'ı mRNA stabilitesi için gereklidir ve bu dizi mRNA'nin ribozomlara yerleşmesini kolaylaştırır.**

**Transformasyon kasedindeki mRNA 3'-UTR'yi dizisi ise T-3'-UTR, transkripsiyon ve translasyon sonlandırmada görev yapar ve mRNA stabilitesi için gereklidir.**

**Vektörler ayrıca az ve çok sayılı vektörler olarakta isimlendirilirler. Az sayılı vektörler hücre içerisinde az sayıda olup genellikle 1-10 arasında bulunurlarken çok sayılı vektörler 100-1000 kopya halinde bulunurlar.**

SacI                      SmaI                      XbaI                      PstI                      HindIII  
GAATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTTCGACCTGCAGGCATGCAAGCTT  
EcoRI                      KpnI                      BamHI                      SalI                      SphI

**Çoklu Klonlama  
Bölgesi**



## En Çok Kullanılan “Raportör” Genler

Transfer Edilmek İstenen Genin Yada Genlerin Alıcı Hücreye Transfer Edilip Edilmediğini Raporlayan Genlerdir.

- **Kloramfenikol asetiltransferaz (CAT)**
  - **Antibiyotik kloramfenikol dayanıklılık sağlar**
- **$\beta$ -galaksidaz**
  - **Mavi Renk oluşturur**
- **Ateşböceği lusiferaz enzimi**
  - **Floresan Protein**
- **Yeşil Floresan Protein (GFP)**
  - **Floresan Protein**

# Markır Genleri (Seleksiyon Genleri)

- Bu genlerin ürünlerinden yararlanılarak Vektör üzerindeki genlerin alıcı hücreye entegrasyonu sonucu vektörü alan hücrelerin çoğalmalarına imkan tanınırken transfer edilmeyen hücrelerin ölmeleri sağlanır.
- Antibiyotik Dayanırlılık Genleri
  - kanamisin
- Herbisit Dayanırlılık Genleri
  - Glifosat 5-enolpirüvatşikimat-3-fosfat sentaz (EPSPS)
- Metabolit Genleri
  - Fosfomannoz İzomeraz (ve ManA geni): Ortamda şeker olarak mannoz varsa hücre yaşayabilmektedir.

## • **Antibiyotik Dayanıklılık Markır Genleri:**

- *Neo* geni: Neomisin fosfotransferaz II (NPTII) enzimini sentezler ve bu enzim aminoglikoziti inaktif eder. NPTII enzimini taşıyan organizmalar ise KANAMİSİN ve NEOMİSİN antibiyotikleri içeren besi ortamında yaşayabilirler.

## • **Herbicide Dayanıklılık Markır Genleri:**

- Bucril markalı herbisit ioxynil ve bromoxynil kimyasal içeriklidir. Bu herbisit dikotiledon bitkilerde fotosentezin ışık everesi reaksiyonunu durdurmakta ve dolayısıyla bitki yaşayamamaktadır.
- *Klebsiella pneumoniae* bakterisinden izol edilen bir gen (*bxn*) tarafından sentezlenen nitrilaz (nitrilase) enzimi ioxynil ve bromoxynil'i inaktif hale dönüştürebilmektedir. Bu enzim bromoxynil'li 3,5 dibromo-4-hydroxybenzoic acid'te (DBHA) dönüştürmektedir.



# ORİJİNLERİNE GÖRE VEKTÖRLER TİPLERİ

- Plazmitler
- Bakteriyofajlar
- Kosmitler
- Bakteri Yapay Kromozomları (BYK: **BAC**)
- P1 Yapay Kromozomları (PYK: **PAC**)
- Maya Yapay Kromozomları (MYK: **YAC**)
- Memeli Yapay Kromozomları (MeYK: **MAC**)
- İnsan Yapay Kromozomları (İYK: **HAC**)
- Yeni İleri Yapay Kromozomlar

# Plazmitler:

Bakteri DNA'sı yanında ondan ayrı olarak bulunan, genellikle halka yapıda ve bağımsız çoğalabilen DNA molekülleridir.

Doğal olarak bulunan plazmitler büyük ve kullanışsız olduklarından, bunların yerine *in vitro* ortamda amaca yönelik olarak hazırlanan yapay plazmit vektörler kullanılmaktadır.

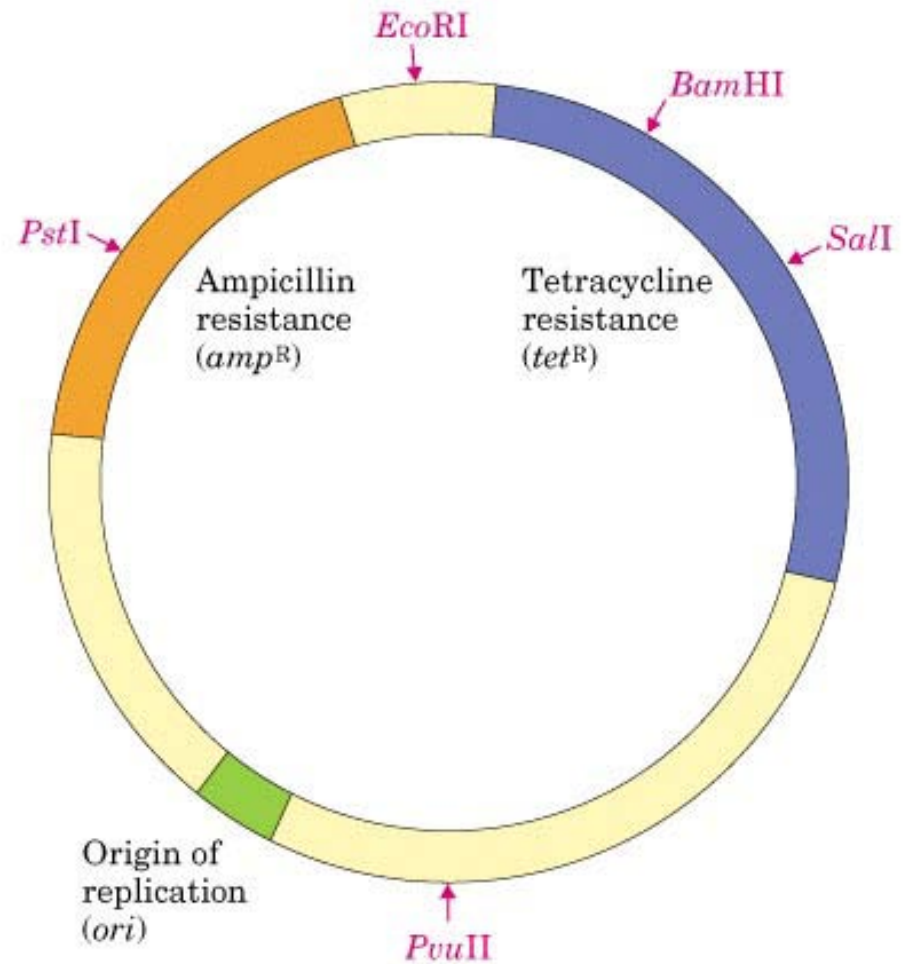
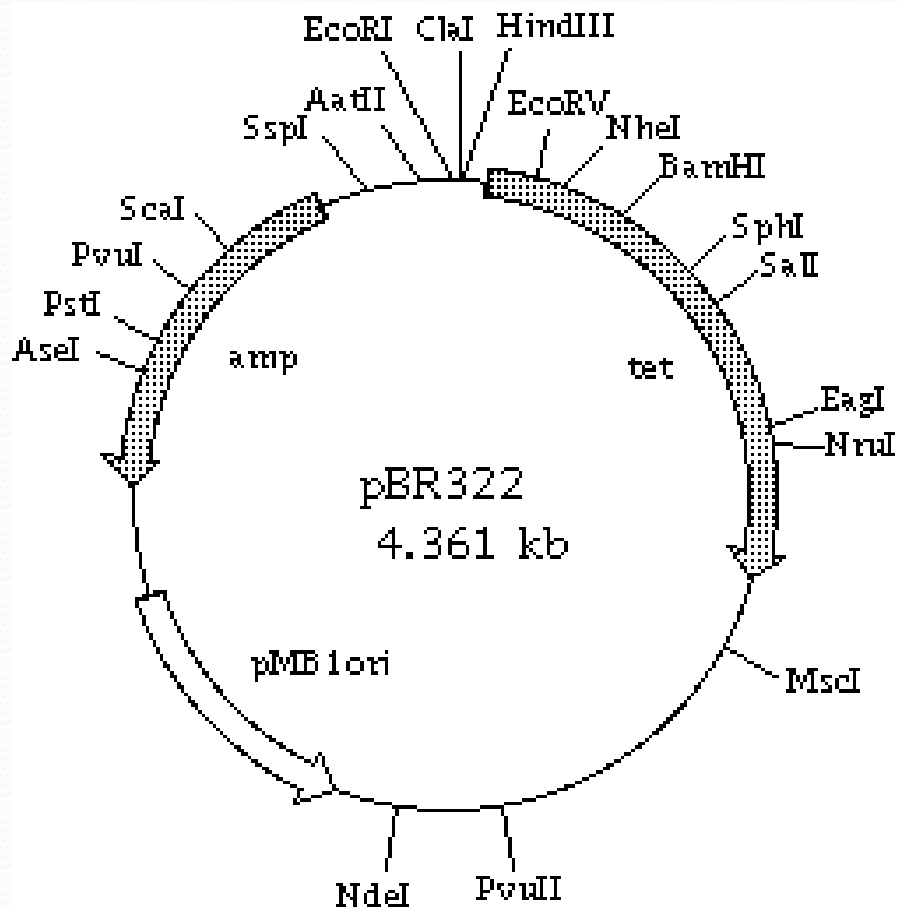
Doğal olarak var olan plazmit DNA'ların üzerlerinde amfisilin, tetrasayklin veya **kanamisin** gibi antibiyotiklere karşı direnç genleri taşırlar.

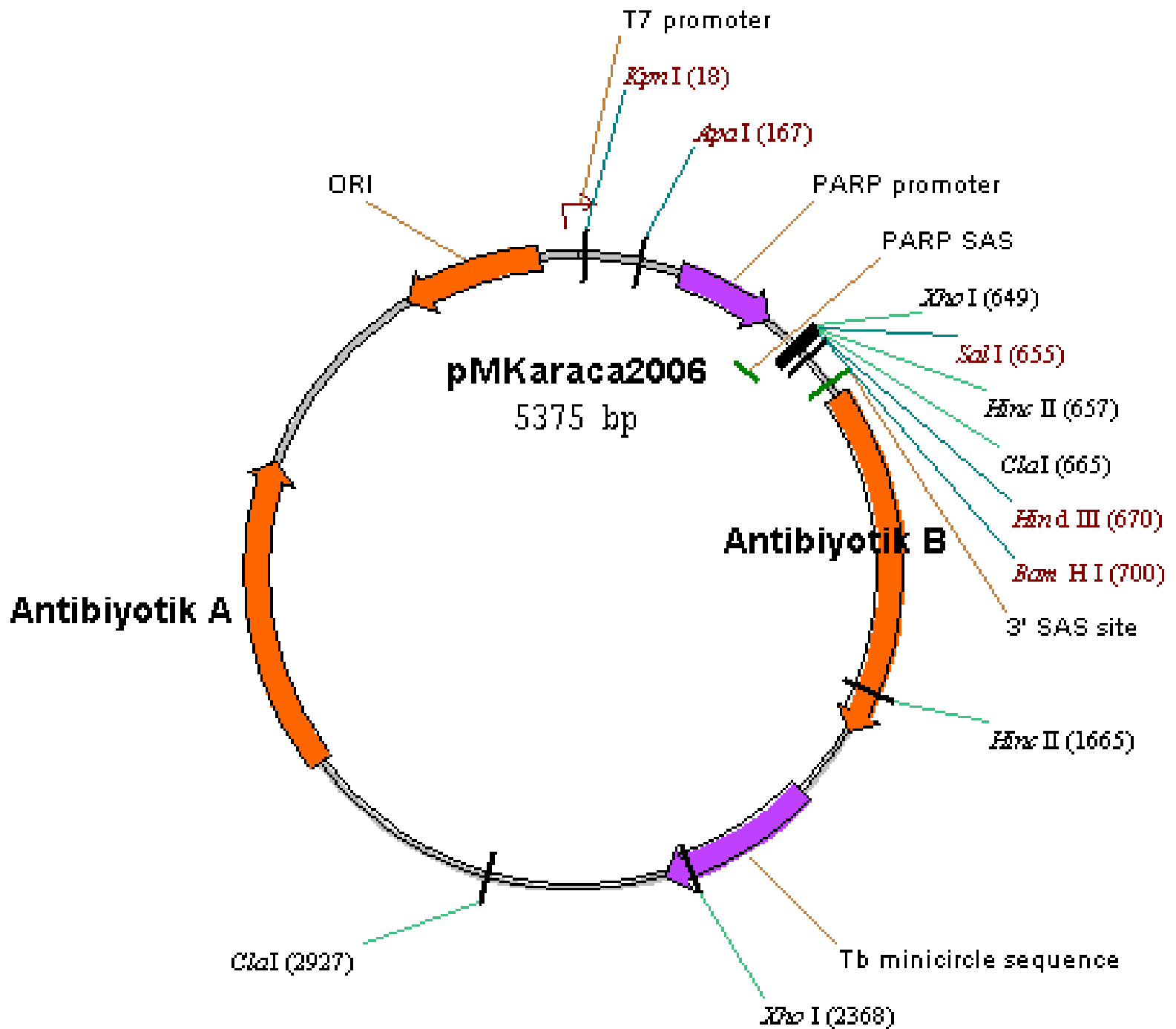
Antibiyotiklere direnç geni bakterilerin bu tür ortamlarda yaşayabilmelerine olanak sağladığı gibi vektör sistemlerinde ise seleksiyonda önemli fonksiyonu olan seleksiyon markır genlerdir.

Kullanılan ilk plazmit vektör **pBR322** olarak isimlendirilmiştir ve bu vektör 4361 bp DNA içermektedir.

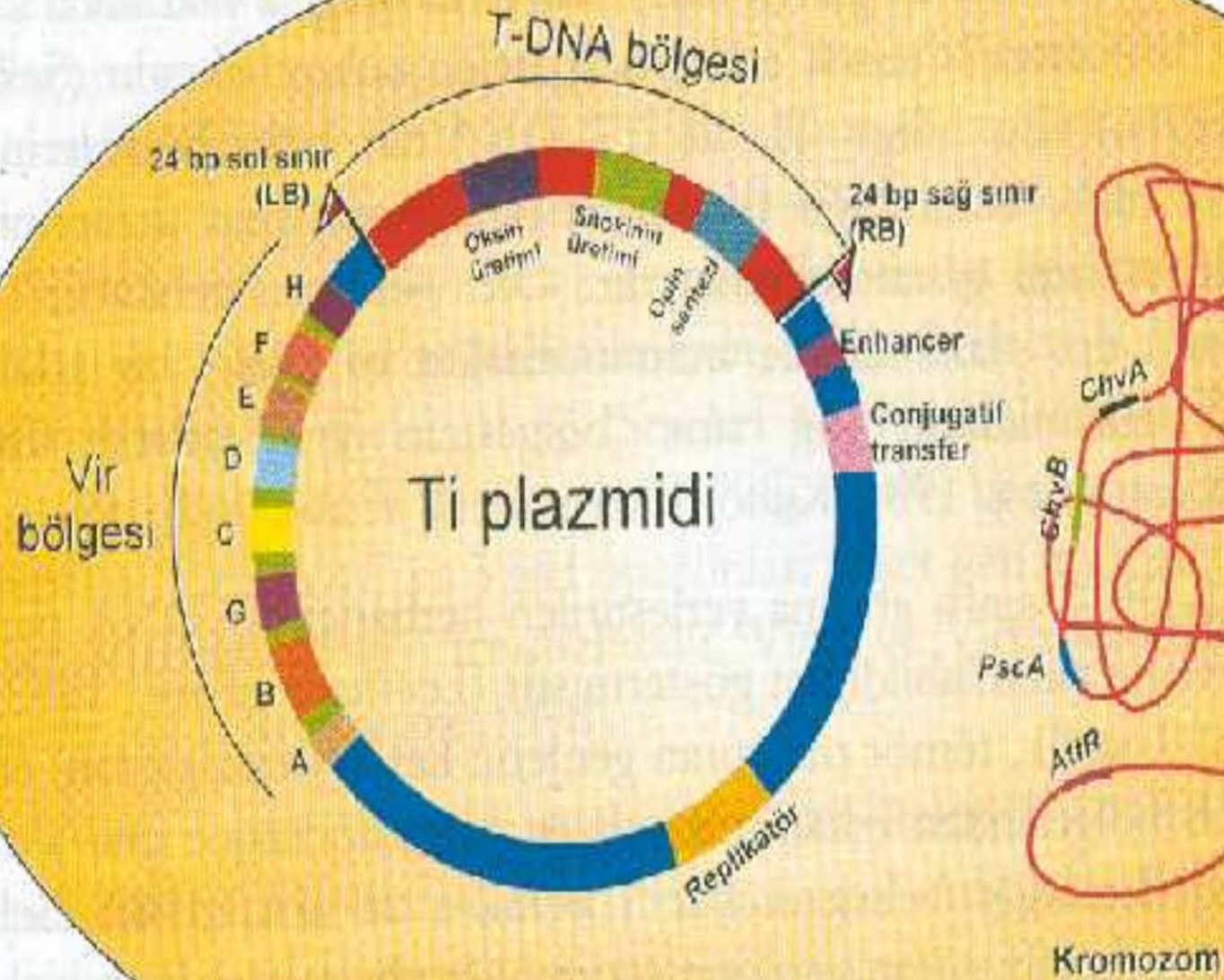
Plazmitler **10 kb** varabilen yabancı DNA (sizin tarafınızdan eklenmiş) taşıyabilmektedir.

- Doğal olarak bulunan vektörler bakteriler arasında eşeyli üreme benzeri gen transferi yapmalarının yanı sıra doğada yayılmış olan bakterilerin antibiyotiklere karşı dayanıklılığını sağlayarak yada ağır metalli ortamlarda, yada aşırı tuzluluk gibi ekstrem şartlarda yaşamalarına veya birbirleriyle bir arada bulunamayacak bakteri türlerinin ayrı ortamlarda bulunmalarına neden olmaktadır.









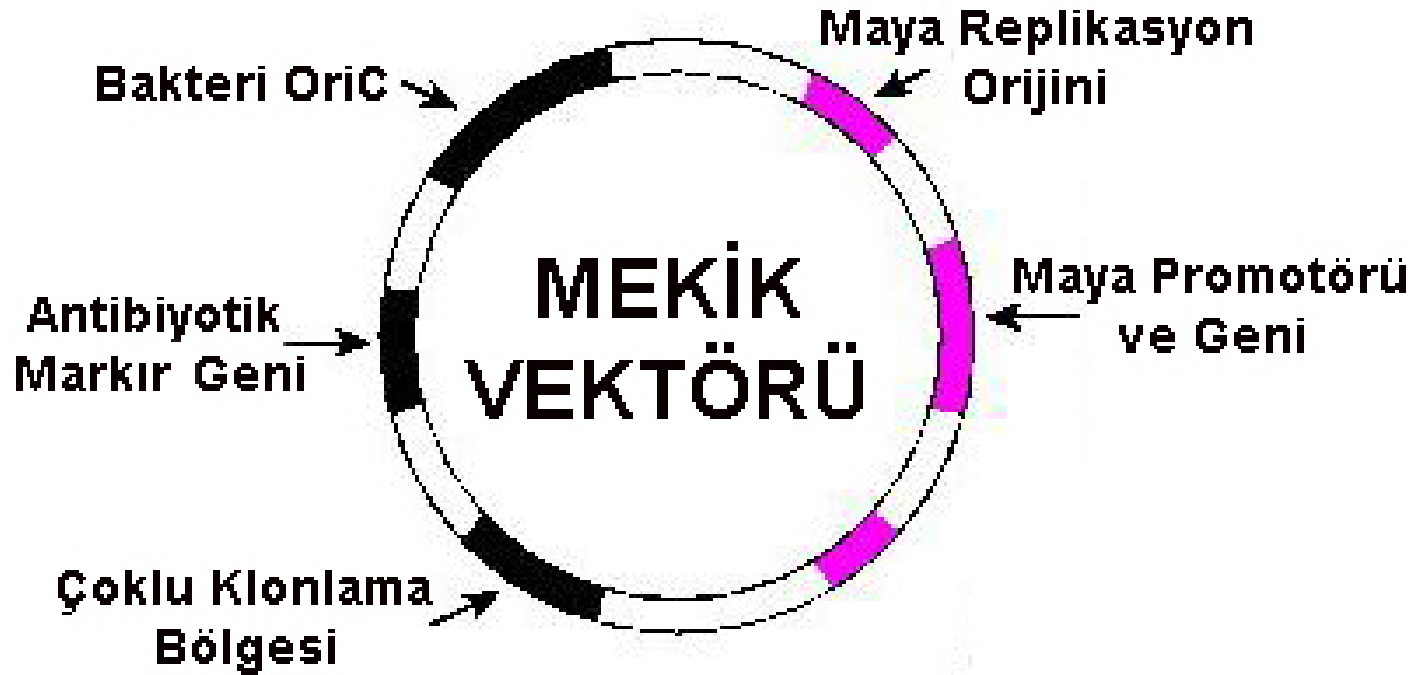
## Mekik (Shuttle) Plazmit Vektörleri:

Prokaryotik replikasyon orijini ve promotörleri taşıyan ekspresyon vektörlerine, ökaryotlara ait replikasyon orijini ve promötör de ilave edilirse, bu tipte hazırlanan vektör hem prokaryotik ve hem de ökaryotik (maya hücresi) üzerinde taşıdığı genleri ifade edebilmekte veya çoğalabilmektedir.

Bu nedenle bunlar iki fonksiyonlu plazmitler veya vektörlerdir.

Bu sistem özellikle bazı ökaryotik genlerin bakteride ifade edilememesi durumunda büyük oranda katkı sağlamaktadır.

## MEKİK (SHUTTLE) VEKTÖR: BAKTERİ VE MAYADA ÇOĞALABİLİR





# Bakteriyofajlar

Faj'lar bakteriyi enfekte eden bakteri virüsleridir.

- Virüslerin Çoğalması (Viral Multiplication)
- 1. Virüsler ne enzimleri nede proteinleri üretebilirler ve nede enerji üretebilirler.
- 2. Bir virüsün çoğalabilmesi için önce hücreyi işgal etmesi ve sonrada hücrenin metabolik mekanizmasını (nükeik asit ve protein) kullanarak kendi komponentlerini üretmesi ve tekrar viral partüküller haline dönüşmesi gerekmektedir.

## • Fajların (Bacteriophages) Çoğalması

- Genel olarak iki mekanizma yada rota vardır. Litik döngü (Lytic cycle) ve Lizogenik döngü (Lysogenic cycle).
- 1. Bazı fajlar litik döngü durumunda faj (phage) konuk hücrenin işgalinin ardından öldürür. Bu durumda faj genomu konukçu genomuna entegre edilmez.
- 2. Bazı fajlar ise konuk hücrenin genomik DNA'sına entegre olarak "profaj" olarak yerleşir. Bu durum ise **lisogenik döngü olarak** isimlendirilir.

# • Bakteriyofajların Bakteri Hücrelerine Enfeksiyon Aşamaları:

## • Litik Döngü

• **1-Bağlanma Fazı:** Fajın kuyruk kısmında bulunan kuyruk fiberi bakteri üzerinde bulunan özel reseptör kısmına bağlanır.

• **2-Penetrasyon Fazı:** Faj enizmleri (lizozome) bakteri hücre duvarında açıklık yaratır. Faj kuyruk kılıfı kasılma yaparak kuyruk kısmının hücre duvarındaki açılmış kısımdan hücre içerisine girmesini sağlar. Faj DNA'sı hücre içerisine bırakılır. **Kapsit hücre içerisine girmez.**

• **3-Biyosentez Fazı:** Bu fazda hücre içerisine bırakılmış olan faj DNA'sı transkripsiyona uğratılarak mRNA'lar sentezlenir. Bu mRNA ürünleri faj DNA'sının replikasyonu için gerekli olan faktörleri sentezler. DNA replikasyonu yardımıyla çok sayıda faj genomu ve gerekli olan kapsit proteinleri sentezletilir.

#### • 4-Olgunlaşma Fazı:

- Oluşturulmuş olan kapsitler ve faj genomu birleşerek olgun virüs partikülleri oluşturulur.

#### • 5-Çıkış Fazı:

- Bu dönemde bakteri hücre duvarı enzimlerle parçalanarak oluşmuş olan faj partiküllerinin hücrenin dışına çıkması sağlanır.
- Bağlamadan çıkış fazına kadar genellikle 20 ile 40 dakikalık bir zaman geçer ve bu süre **patlama süresi**, patlama süresi sonucu 50 ile 200 adet faj partikülleri oluşturulabilir ve buda **patlama büyüklüğü** olarak isimlendirilir.

## • Lizogenik Döngü

- Bağlanma ve penetrasyon fazından sonra faj DNA'sı bakteri genomuna entegre olur ve faj profaj (geçici faj) olarak bakteri genomuna yerleşir.
- **Lizogenik döngüde** regülasyon profaj genleri tarafından sağlanır. Bu işlemde ise profaj bazı baskılayıcı faktörler yardımıyla bakteri genomunda atıl kalabilmektedir. Bazı durumlarda profaj hemen litik döngüye geçebilmektedir.
- Profaj taşıyan bakteriler genellikle aynı türde başka fajlar tarafından işgal edilmezler.
- Profaj bakteri bölünmesiyle yeni oluşturulan hücrelere geçebilmektedir. Bazı durumlarda ise profajlı bakteri başka bakterilere gen transferi yapabilmektedir, bu olay "KONJAGUSYANDAN" farklı olup "TRANSDÜKSİYON" olarak bilinmektedir.

Lambda fajının orta bölgesi, bakteri içinde litik bir üreme için gerekli değildir. Bu bölge, başka bir gen ile yer değiştirebilir. Böyle bir değişme de fajda zararlı bir etki yaratmaz.

**Bakteriofajlar plazmitler gibi antibiyotiğe karşı direnç geni taşımazlar.**

Lambda bakteriyofajı 50 kb uzunluğundadır ve **20 kb** yabancı DNA bu vektörlere (faja) eklenebilmektedir.

Fajın orta bölgesi restriksiyon endonükleaz enzimi ile iki yerinden kesilerek orta segment yada parçası çıkarılır, buraya yabancı gen taşıyan segment (aynı RE ile kesilmiş) fajın orta kısmına yerleştirilir. Sonra, paketleme enzimi yardımı ile faj başlığı içine paketlenir ve buradan da başka bir *E. coli* 'ye transfer edilir. Böylece, yabancı bir gen, faj vektör yardımı ile bakteriye aktarılmış olur.

# Kozmitler

- Kozmit vektörler, bir bakteriye ait replikasyon orijinine sahip bir plazmitle, buna birleştirilmiş olan lambda fajı yapışkan ucundan (cos, cohesive ends) oluşturulmuş olan bir hibrit vektör türüdür. Bunlar plazmit ve bakteriyofaj vektörlerinin avantajlarını birleştirir.
- Bu tür vektör plazmitlerin daha uzun DNA parçası taşımaya neden olurlar. Kozmit vektör 45-50 kb yabancı DNA taşıyabilir.
- Plazmitler gibi replike olabilirler ve cos bölgeleri içerdiklerinden faj parçacıkları içerisine de paketlenebilirler.



- Yüksek transformasyon verimliliğine sahiptirler.
- Kozmit DNA'lar replikasyon için gerekli viral genleri taşımadığından konukçu hücreye girdiklerinde faj etkisi yaratmazlar.
- Viral genler olmadığı için daha büyük DNA parçalarının (45 kb'ye kadar) yerleştirilmesine olanak sağlarlar.



## Çift Kos Bölgesi Kozmit Vektörler:

İki cos bölgesine ve iki markır genine (ampR, kanR) sahip vektörlerdir. Kozmitler iki RE ile aynı anda kesildiğinde iki lineer parça elde edilir ve her birinde bir cos bölgesi ve bir marker bulunur. Yabancı gen DNA'sı, iki cos bölgesi arasına entegre edilir.

(Örn: pLFR-5 kozmidi, iki COS bölgesi içerir).

# Bakteri Yapay Kromozomu (BAC)

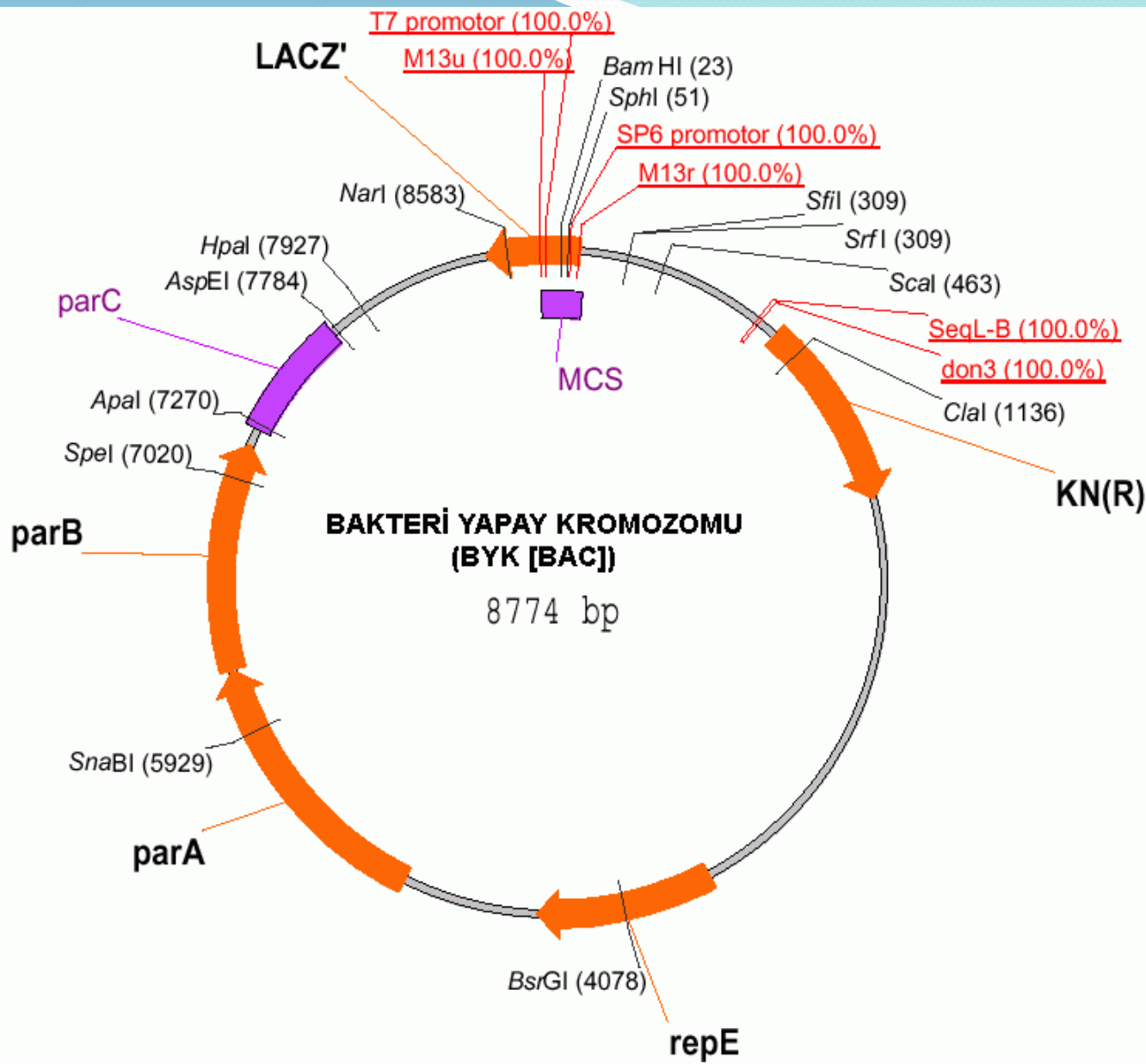
Farklı türlerden alınan DNA parçalarının birleştirilmesi ile elde edilmiştir. Klonlandığı zaman hücre içinde birçok kopyası olur.

BAC vektörleri doğal olarak var olan büyük bakteri plazmidi F-faktör üzerine kurulurlar.

BAC vektörleri genomların çoğaltılmasında, depolanmasında ve dizilerinin belirlenmelerinde kullanılırlar.

BAC vektörü 1 Mbaz kadar yabancı DNA'yı içine alabilir.

En büyük dezavantajı bazı ökaryotik genlerin transkripsiyonu ve translasyonları BAC ekspresyon vektörlerinde gerçekleşmemektedir.

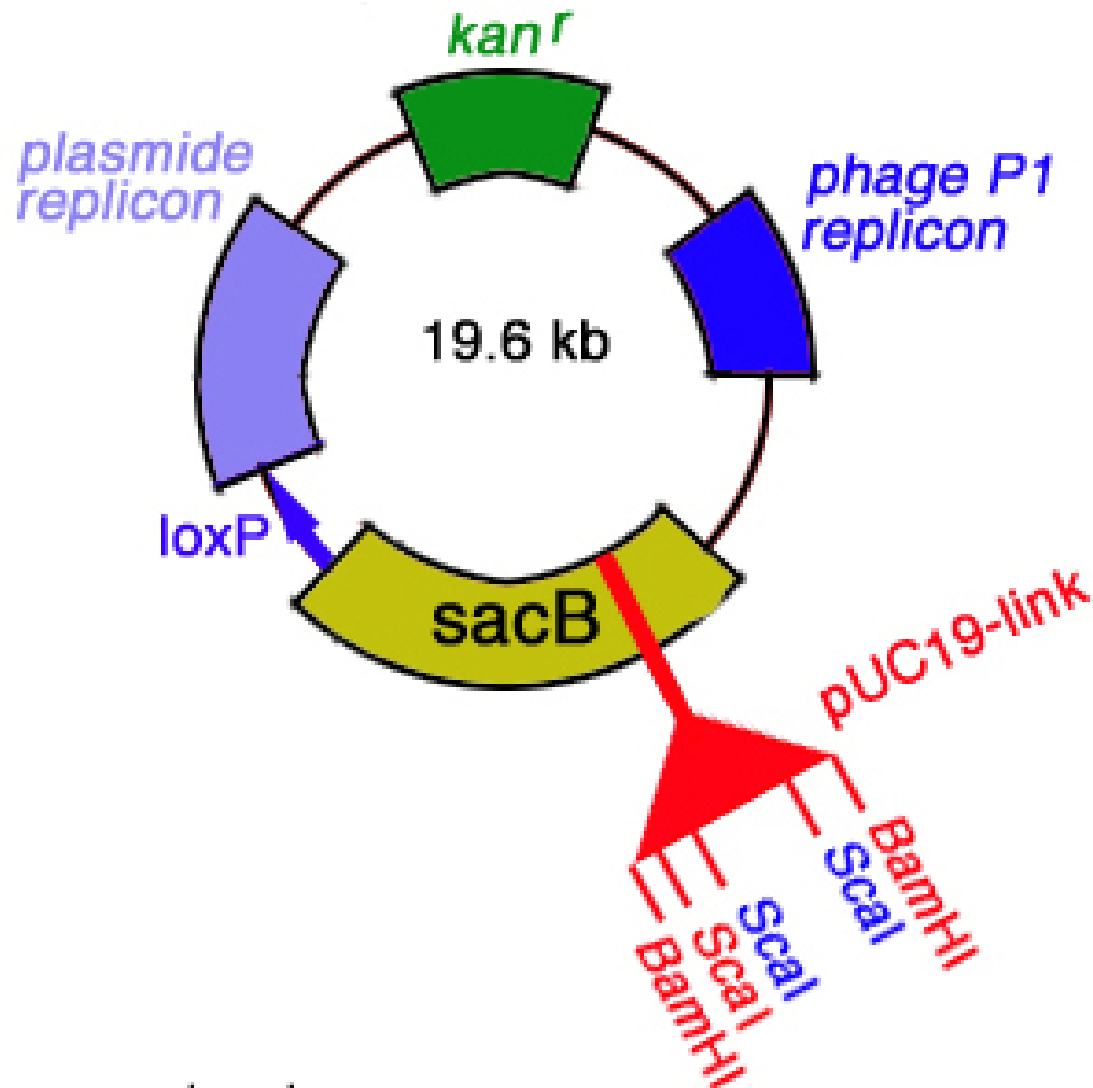


- Kanamisin R, ÇS: 8774 bç, Genomik DNA kütüphanesi, E. Coli OriC, SP6 ve T7 Promotörleri

# P1 kökenli yapay kromozom (PAC)

- BAC gibi büyük uzunluktaki genomik DNA'nın klonlanmasında kullanılmaktadır. Bazı PAC'lar mekik özelliğine sahiptir. Bu mekik vektöre hem insanda hemde bakteride çoğalabilmektedir.
- PAC 100-300 kb'lik yabancı DNA taşıyabilir.
- P1 bir bakteriyofaj olup E. Coli transdüksiyonu ile genetik materyal taşımaktadır. P1 genomu lineer ve çifte sarmallı DNA'ya sahiptir.

# P1 kökenli yapay kromozom (PAC)

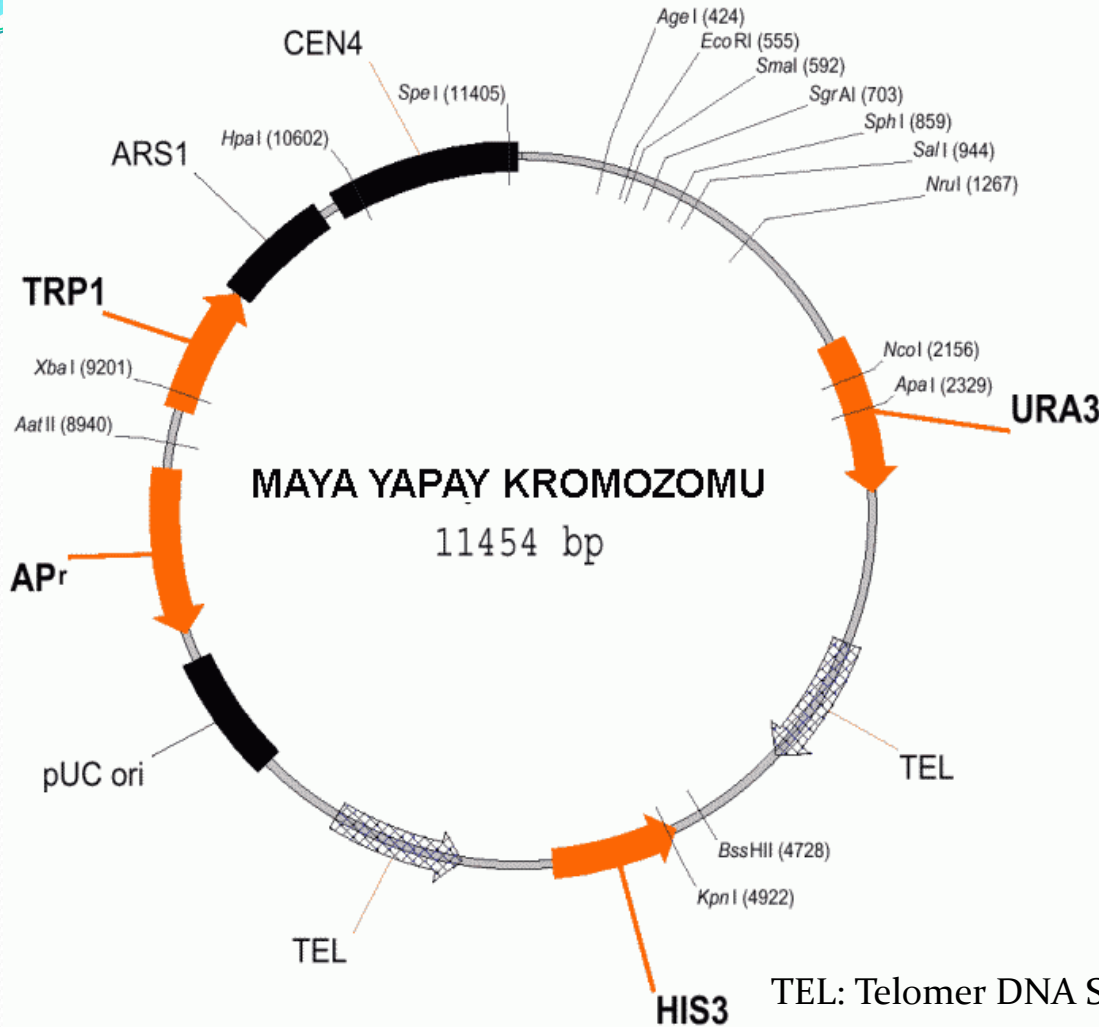


# Maya yapay kromozomu (YAC, MYC)

- Uzun DNA (200-500 kb veya 1-2 Mb) fragmentlerini kabul edebilir.
- Bir kromozomun önemli ögeleri olan **TELOMERLERi**, **SENTROMERi** ve **REPLİKASYON BAŞLANGIÇ** noktasını içerirler.

Örneğin pYAC<sub>3</sub>: Plazmit Maya Yapay Kromozomu 3: 11.4 KB ve halka şeklindedir.

Üzerinde CEN<sub>4</sub>, TELB, TELA bulunur.

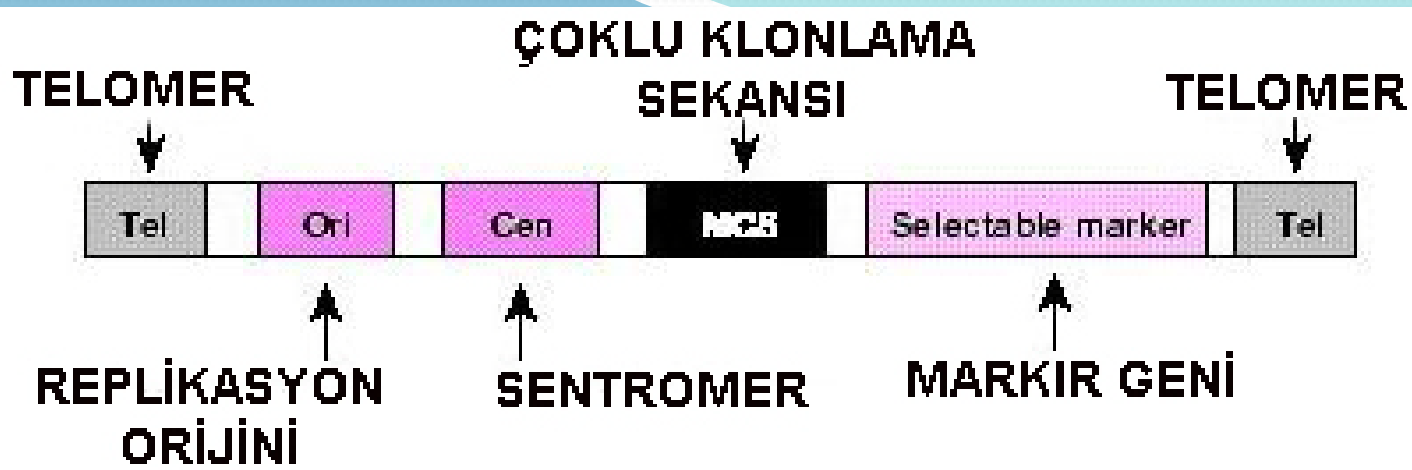


TEL: Telomer DNA Sekansı

CEN4: 4 nolu Maya Kromozomunun Sentromer Sekansı

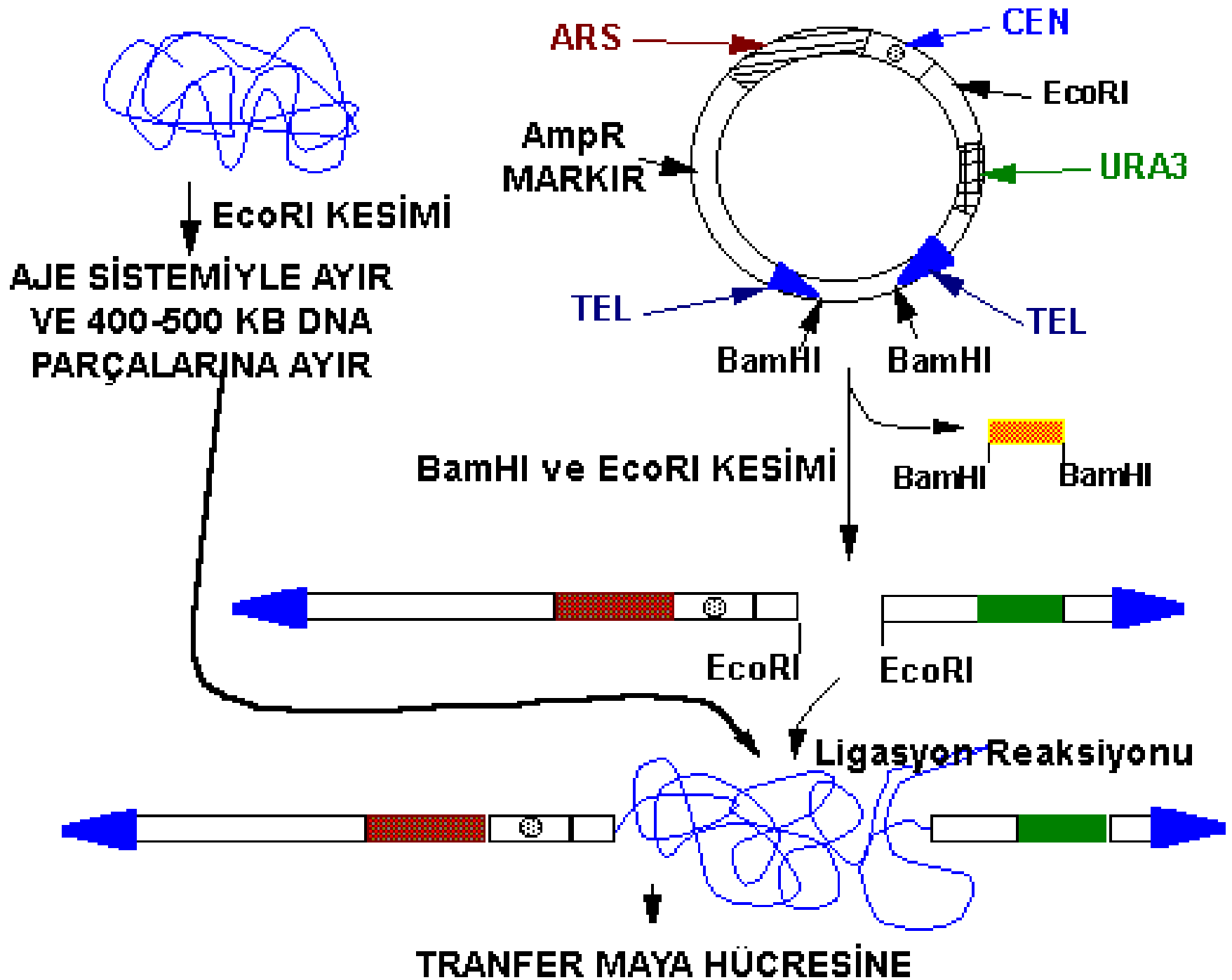
ARS1: Otonom Replikasyon Sekansı

Seleksiyon Bölgesi: Yeni DNA Sekanslarının Eklenebildiği Sekans Dizileri



- YAC'a yabancı bir DNA'nın klonlanması 4 ana adımda gerçekleşir.
- 1- Genomik DNA EcoRI ile kesilir ve çok büyük bir DNA parçası elde edilir.
- 2- YAC vektörü EcoRI ve BamHI ile kesilir.
- 3- Bu iki element EcoRI bölgesinde rekombine olur ve DNA ligaz tarafından kovalent bir şekilde bağlanır.
- 4- Rekombinant YAC vektörü, genomik DNA içeren maya yapay kromozomu transferi ile üretilmiş olur.
- Bu vektör maya hücrelerini enfekte etmek için kullanılabilir ve sınırsız sayıda kopya üretilebilir.





- **Maya yapay kromozomları (YACs)** genellikle yabancı DNA'ların (Örneğin insan DNA'sı) çok büyük bir parçasını klonlamak için kullanılan vektörlerdir. Yapay kromozomlar ilk defa tomurcuklanan maya olan *Saccharomyces cerevisiae*'de uygulanmıştır. Halkasal plazmit maya sentromerinden, replikasyon orijinininden, seçici bir işaret geninden ve bir palindromik telomerik yapıdan oluşur.
- YAC'lar karakteristik olarak 250.000 ile 1 milyon baz çifti uzunluğundadır.
- YAC'lar ilk olarak Burke tarafından 1987'de yaratılmıştır. O günden sonra YAC'lar büyük ölçüde fiziki haritalamada, contig yapımında ve harita bazlı gen klonlamasında kullanılmıştır.

İşlevsel YAC:

**Telomer**: Her kromozomun sonunda bulunur. Doğrusal DNA'yı nükleazlar tarafından kesilmekten korurlar.

**Sentromer**: Mitotik iğ ipliklerinin bağlanma bölgesidir.

**Replikasyon Orijini**: DNA replikasyon makinelerinin DNA üzerine tutunmasını sağlayan özel DNA dizileridir.

Yapay kromozomlara birkaç özel diziler de eklenebilir. **Seleksiyon marker genleri**: Yapay kromozomu alan maya hücrelerinin kolay izolasyonuna imkan verir. **ÇKB**: İki restriksiyon enzimi içerir (EcoRI ve BamHI)

# Memeli Yapay Kromozomu (MeYK, MAC)

- Memeli yapay kromozomları, kromozomların ana fonksiyonel bölgelerini (**sentromer, telomer, replikasyon orijini**) taşıyan ve hücreden bağımsız olarak çoğalabilen moleküllerdir.
- MAC yüzlerce kb büyüklüğünde genomik DNA taşıyabilir.
- MAC oluşturması YAC'a göre çok daha zordur. Çünkü memeli telomeri maya telomerinden 10-100 kat; memeli sentromeri ise maya sentromerinden yaklaşık 1000 kat daha büyüktür. Memeli sentromer ve telomer dizilerinin çok fazla sayıda tekrarlanması da memeli yapay kromozomu oluşturulmasını zorlaştırır.
- MAC'lar gen terapisi için ve transgenik hayvanların üretiminde faydalı olabilecek genlerin hücre içine transferinde kullanılmaktadır.

# İnsan Yapay Kromozomu (İYK, HAC)

- HAC'lar, insan DNA dizileri, sentromer dizisi, telomer dizisi ve DNA replikasyon bölgesi olması ile gen tedavisi için avantajları olan bir vektördür.
- Daha büyük insan DNA'sini taşıması; stabiliteyi sağlayacak sentromer dizisinin olması; kromozom yapısının stabilitesini ve parçalanarak bozulmasını önleyen telomer dizilerinin olması; DNA replikasyon noktası ile bir hücre döngüsünden diğerine normal S fazında replikasyonu düzenleyebilmesi avantajlarıdır.
- 6-10 megabaz uzunluğundadır. Transferi, lipozomlar veya reseptörler aracılığı ile yapılabilmektedir.

## İNSAN YAPAY KROMOZOMU (İYK=HAC)



# Bitki Viral Vektörleri

Geminivirüs: Dokuz cinsi ve 300'ün üzerinde türü bulunan bitki virüsleridir. Yaprak kıvrıklığı, bodurluk, ve çizgi şeklinde oluşumlara ve verim kaybına neden olurlar. Tek veya çift sarmallı halka DNA genomludurlar.

TMV (Tütün Mozaik Virüsü)

CaMV (Karnıbahar Mozaik Virüsü)

Viral vektörlerin ekspresyonu bitkilerdeki yabancı gen sekanslarını ve protein ürünlerini ortaya çıkarır.

Bu sayede bitkilerdeki rekombinant proteinler bitki ve hayvan hastalıklarının kontrolünde yararlı olabilir



Geminivirüsler bitkilerdeki yabancı gen amplifikasyonları için elverişli replikasyon vektörü gibi kullanılırlar.

Doku kültürü teknikleri kullanılarak, monokotil ve dikotil türlerini içine alan geniş bir dizi konak içinde gen ekspresyonu düzeninin analizi için uydurulmuşlardır.

# CaMV (Karnıbahar Mozaik Virüsü)

CaMV küçük izometrik bitki virüsleri grubundan dairesel çift iplikli genomlu bir virüstür.

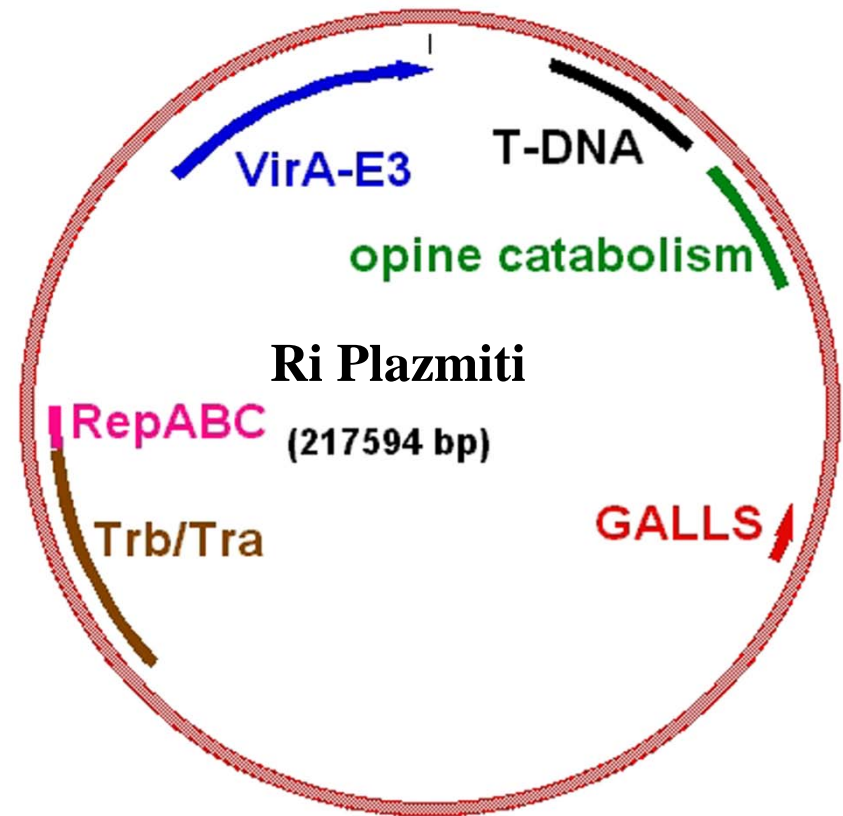
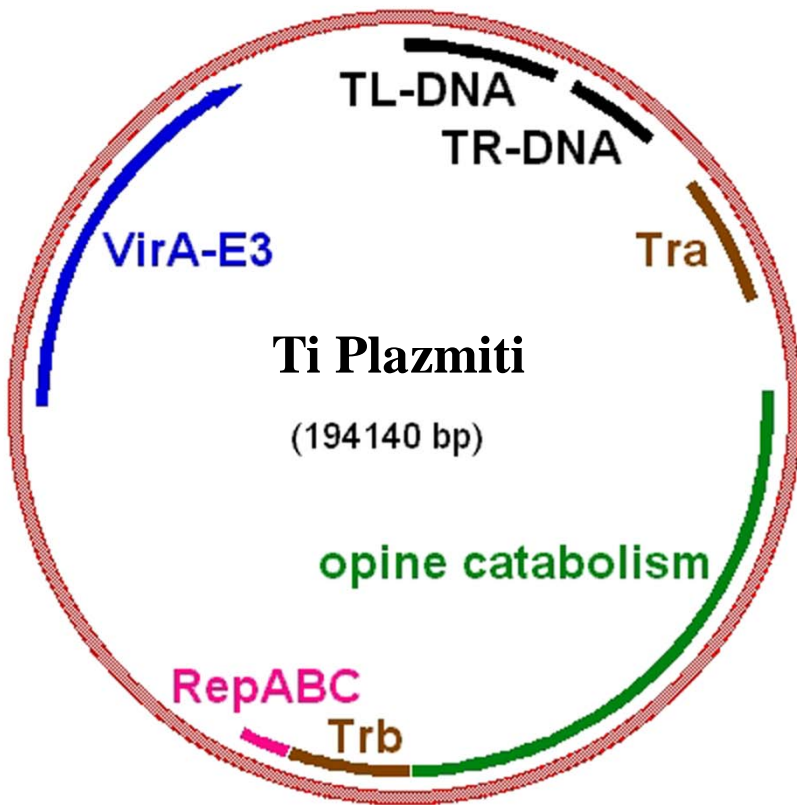
Bitkiler için potansiyel genetik vektör olarak kullanımlarından dolayı önemli bir yere sahiptirler.

CaMV taneciklerinden gelen DNA, hassas yaprakların yüzeyine sürtüldüğü zaman bitkileri enfekte edebilir ve virüs üretimine neden olabilir.

CaMV bitkileri enfekte etmede başarıyla kullanılmışlardır.

- CaMV kullanılarak bitkide yabancı DNA'nın üremesi sağlanır.

# Ri & Ti Plazmitleri



# İleri Vektör Sistemleri

- İkili “Binary” Vektörler: Vir bölgesinin trans-hareket özelliğinden yararlanarak bu vektör sistemleri geliştirilmiştir. *Agrobacterium* içerisinde birbirinden bağımsız olarak replike olan iki plazmitden oluşmaktadır.
- “Binary” Vektörlerin Özellikleri: T-DNA içerisinde bulunan ve bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolaylıkla klonlanabileceği bir klonlama bölgesi hem *E. coli* hem de *Agrobacterium*'da fonksiyonel olan replikasyon orijini *E.coli* ve *Agrobacterium*'da seçici bakteriyel işaret geni Bitkide işlev yapan seçici işaret geni bulundurlar.

## • “Ko-Entegratif” Vektörler:

- Bu vektör sisteminde sınır bölgeleri kalacak Ti plazmidinin T-DNA bölgesinin büyük bölümü çıkartılarak yerine, küçük bir *E. coli* klonlama plazmidine (alıcı) homolog yapıda bir DNA parçası yerleştirilmektedir.
- Bitkilere aktarılacak olan gen, işaret geni ile birlikte önce bu aracı plazmidlere *E. coli* içerisinde klonlanırlar.
- Aracı plazmidler alıcı vektörün bulunduğu *A. tumefaciens*'e aktarıldıklarında, tek homolog rekombinasyon ile Ti plazmidinin T-DNA bölgesine entegre olurlar.
- Ko-entegratif vektörlerin özellikleri:
- Bitkilere aktarılmak istenen genlerin kolayca klonlanabileceği klonlama bölgesi,
- *E. coli* ve *Agrobacterium*'da aktif olan seçici bakteriyel işaret geni,
- Bitkide işlev yapabilen seçici işaret geni,
- *E. coli* içerisinde fonksiyonel olan, ancak *Agrobacterium*'da etkili olmayan bir replikasyon orijini bulundurlar.

# GEN AKTARIM METOTLARI

- *Agrobacterium tumefaciens*
- *Agrobacterium rhizogenes*
- Virüsler
- Makroenjeksiyon
- Biyolistik (Partikül Bombardımanı)
- Gen Tabancası
- Mikroenjeksiyon
- Kimyasal Porasyon
- Elektroporasyon
- Polen transformasyonu
- Zigota veya embriyoya direkt veya dolaylı gen transferi
- Fiberler aracılığıyla DNA aktarımı
- Sonikasyon
- Desikasyon
- Enzimler, ZFN, FEN, CRISPR vb...

- Uyumlu türler arasında klasik yöntemlerle yapılan melezlemelerle yeterli varyasyon sağlanabilmektedir. Ancak, yabancı türlerle yapılan melezlemelerde, yeterli varyasyon için geniş bir populusyona gereksinim duyulmaktadır. Böyle bir populusyondan ise, kısırlık ve bozulan karakterlerin düzeltilmesi için, uzun yıllar süren gerimelezlemeler sonunda yeni bir çeşit geliştirilebilmektedir.
- Aralarında melezleme yapılabilen türlerin azlığı, melezlemelerde istenen karakterlerle birlikte istenmeyenlerin de döllere geçişinin engellenememesi, istenmeyen karakterlerin gerimelezleme yoluyla elimine edilmesinin çok uzun zaman alması gibi bazı sorunlar klasik bitki ıslahının önemli olumsuzluklarını oluşturmaktadır.



# TRANSGENİK BİTKİLERDE

- VERİMLİLİĞİN DOLAYLI YOLDAN ARTIRILMASI
  - ACETOLACTATE SYNTHASE GENİNİN AKTARILMASIYLA HERBİSİT SULFONYLLUREA' DAYANIKLILIK
  - 5-ENOLPYRUVYL SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE GENİNİN AKTARIMI İLE GLYPHOSATE DAYANIKLILIK
    - PESTİSİT KULLANIMINDA AZALMA
    - *Bacillus thuringiensis*, özellikle Lepidoptera familyasından böceklerin sindirim sistemlerine zarar vererek ölümlerine neden olan bir protein üretmektedir. Bu genin *B. thuringiensis*'ten izole edilerek domates, tütün, pamuk ve mısır bitkilerine aktarılması sonucunda böceklere karşı dayanıklılık sağlanmıştır. Bt geninin aktarılmasıyla bitkilere kazandırılan zararlılara dayanıklılık özelliğinin, zararlıları kontrol altına almak için kullanılan kimyasal madde gereksinimini azaltacağı varsayımına dayanmaktadır.

# TOPRAK VE SUYUN KORUNMASI

- Transgenik çeşitlerin tarımı ile yabancı ot ve zararlı savaşında geleneksel yöntemlere bağlılık azaltılabilmekte, daha az toprak işleme nedeniyle, toprak yapısı ve nemi korunabilmektedir. Tarımsal ilaçlamayı azaltan transgenik çeşitlerin kullanılmasıyla toprak ve yeraltı sularının kimyasal maddelerle kirlenmesinin önlenmesi hedeflenmektedir.

# KİRLİ TOPRAKLARIN TEMİZLENMESİ

- Bitki ya da mikroorganizmalarda yapılacak değişikliklerle toksik ağır metallerin kirlettiği topraklar, tortular ve yüzey suları temizlenebilmekte ya da daha az toksik hale dönüştürülebilmektedir. Transgenik bitkilerin de bu amaçla kullanılması planlanmakta olup, henüz uygulama aşamasına gelinememiştir.

# ÜRÜN KALİTESİNİ ARTIRMA

Ürün kalitesini artırma çalışmalarında ise, son yıllarda önemli başarılar elde edilmiş olup, yüksek proteinli soya; A vitamini artırılmış çeltik (altın çeltik); nişasta ve aminoasit içeriği artırılmış patates; oleik asit oranı yüksek, linolenik asit oranı düşük ayçiçeği, soya ve yarfıstığı çeşitleri ile sabun ve deterjan yapımı için daha ucuz hammadde sağlayan yüksek laurate asitli kanola çeşidi tarıma kazandırılmıştır.

Sebze ve meyvelerde raf ömrünün uzatılması özellikle domateste başarılı olmuş olup, benzer çalışmalar halen çeşitli meyvelerde sürdürülmektedir. Genetik mühendisliği yoluyla, yüksek besin değerine sahip yem bitkilerinin ve sık rastlanan bazı hastalıklara karşı insan ve hayvanlarda aşı etkisi gösterebilecek bitkilerin geliştirilmesi üzerine de çalışmalar sürdürülmektedir.

Günümüze kadar yaklaşık 15 türde 100'den fazla transgenik çeşit elde edilerek ticari olarak üretilmeye başlanmıştır.

# TRANSGENİK ÇEŞİTLER

## Şeker pancarı (*Beta vulgaris*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> Glyphosate herbisitine tolerans	EPSPS <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>A. tumefaciens</i> PPT herbisitine tolerans	PAT <i>Streptomyces viridochromogenes</i>

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT

# Kanola (*Brassica napus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> Laurate, yağ asidi ve mysistic asit üretimi	Thioesterase <i>Umbellularia californica</i>
<i>A. tumefaciens</i> PPT herbisitine tolerans	PAT <i>Streptomyces viridochromogenes</i>
<i>A. tumefaciens</i> - PPT herbisitine tolerans, erkek kısırlık, fertilitenin sağlanması	barnase, barstar <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PAT - <i>Streptomyces hygroscopicus</i>
<i>A. tumefaciens</i> - Oxynil herbisit toleransı	Nitrilase - <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A. tumefaciens</i> Glyphosate herbisitine tolerans	EPSPS, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , Glyphosate oxidase, <i>Ochrobactrum anthropi</i>

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT

# Papaya (*Carica papaya*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
Partikül bombardımanı Virüs enfeksiyonuna dayanım	CP Bitki virüsü

CP=coat protein (**papaya** ringspot virus PRSV)

# Hindiba (*Chichorium intybus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> Erkek kısırlık, PPT herbisitine tolerans	barnase - <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PAT - <i>Streptomyces hygrosopicus</i>

- PAT:phosphinothricin-N-acetyl transferase (PAT)
- PPT: PHOSPHİNOTHRİCİN HERBİSİT



# Kabak (*Cucurbita pepo*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> Virüs enfeksiyonuna dayanım	CP Bitki virüsü

CP=coat protein (papaya ringspot virus PRSV)

# Karanfil (*Dianthus caryophyllus*)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> - Uzun raf ömrü, Sulfonylurea herbisit toleransı	ACC, ALS - Tütün
<i>A. tumefaciens</i> - Farklı çiçek rengi, Sulfonylurea herbisit toleransı	Antosiyanin geni, ALS – Tütün

- ACC: Aminocyclopropane Cyclase Synthase
- ALS: Acetolactate Synthase

# Soya (*Glycine max* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
Partikül bombardımanı - PPT herbisitine tolerans	PAT - <i>Streptomyces viridochromogenes</i> ve diğer bir çeşite EPSPS - <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Partikül bombardımanı - Yüksek yağ asidi ve oleik asit	GmFad2-1 - Soya

# Keten (*Linum usitatissimum* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> - Sulfonylurea herbisit toleransı	ALS - <i>A. thaliana</i>

- PAT: phosphinothricin N acetyltransferase
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYLSHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- GmFad2-1: delta-12 desaturase
- ALS: acetolactate synthase (ALS)

# Pamuk (*Gossypium hirsutum* L.)

Gen Aktarma Yöntemi Kazandırılan Özellik	Aktarılan Genin Adı Kaynağı
<i>A. tumefaciens</i> - Sulfonylurea herbisit toleransı	ALS
<i>A. tumefaciens</i> - Zararlı dayanıklılığı, Oxynil herbisit toleransı	<i>cry1Ac</i> - <i>Bacillus thuringiensis</i> Nitrilase - <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A. tumefaciens</i> bromoxynil dayanıklılık herbisit	Nitrilase enzyme, (BXN), <i>Klebsiella pneumoniae</i>
<i>A. tumefaciens</i> - Glyphosate herbisitine tolerans	EPSPS - <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

- BXN: bromoxynil-degrading nitrilase
- EPSPS: 5-ENOLPYRUVYL-SHIKIMATE-3-PHOSPHATE SYNTHASE
- GmFad2-1: delta-12 desaturase
- ALS: Acetolactate Synthase