



Bitki Biyoteknolojisi

Prof. Dr. N. Oya SAN
KESKİN

Başlıklar

- Tarımın geleceği: Bitki transgeniği
- Bitki transgenetiğinde kullanılan yöntemler
- Pratikte uygulamalar
- Sağlık ve çevre açısından endişeler

Tarımın geleceği: Bitki transgeniği

- Dünya nüfusu son 40 yılda ikiye katlandı fakat ekilebilir arazi sadece %10 arttı
- Geleneksel yöntemlerle bitki ıslahı çok fazla insanın beslenebilmesini sağladı
- Son yıllarda, doğrudan gen transferi sayesinde daha verimli ve yeni bitkilerin geliştirilmesi süreci hızlanmıştır.

Tarımın geleceği:

Bitki transgeniği

- **Bitki transgenetiği**– genlerin doğrudan bitkilere aktarımı
 - Bitki aşısı, kendi pestisitlerini üreten bitkiler ve herbisitlere dirençli bitkiler geliştirilmesi.
- 2008 yılında 25 ülkeden 13.3 milyon çiftçi transgenik bitkiler ekmiş durumdaydı.
 - Bunların %90'ı gelişmekte olan ülkelerdeydi
- 2009'da dünya çapında belli başlı önemli bitkiler transgenikti
 - Soya fasulyesinin %70'i, mısırın %40'ı, pamuğun %10'u
- Önemli bir tartışma konusu

6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Geleneksel ıslah ve hibritleme**
- **Klonlama**
 - Protoplast birleştirme
 - Yaprak parçası tekniği
 - Gen tabancaları
 - Kloroplast mühendisliği
 - Antisens teknolojisi

6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Geleneksel ıslah ve hibritleme**
 - İki bitki tipi arasında çaprazlama ve sonrasında hibrit nesil ile ata nesli arasında tekrarlı geri çaprazlama.
 - Yıllarca sürebilir
 - Poliploid bitkiler (Çoklu kromozom setine sahip bitkiler)
 - İstenilen karakterleri özellikle artırır büyüklüğü
 - Bir tek gen yerine tüm kromozom aktarılabilir

6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Klonlama** – tek bir hücreden bitkiyi üretmek
 - **Protoplast birleştirme** farklı türlerin protoplastlarını birleştirmektir
 - Protoplast hücre, hücre duvarı enzim ile parçalanmış bitki hücresidir
 - İki protoplast hücrenin birleştirilmesi, hibrit bir bitki oluşturur

Yaprak kesilir



Parçalanır

Hücre duvarı

Koful

Bitki hücreleri

Sitoplazma

Çekirdek

Hücre zarı

Plant cells

Selüloz, şeker ve tuz içeren çözeltiye koyulur

Yıkanır
Artıklardan kurtulmak için sentrifüjlenir

Protoplastlar yüzer

Protoplastlar

Hücre duvarı artıkları çöker

Protoplast hücresi

Filtre kağıtları

Besin içeren agar

Agara yerleştirilmiş besleyici hemşire hücreler

2-3 hafta sonra koloniler aktarılır

Gövde gelişir

Sitokinin yüksek
auksin düşük agar

2-4 hafta sonra kök oluşumunu tetikleyen ağara aktarılır

Kültür kabı

Sitokinin yok
Auksin düşük besiyeri

3 hafta sonra toprağa aktarılır

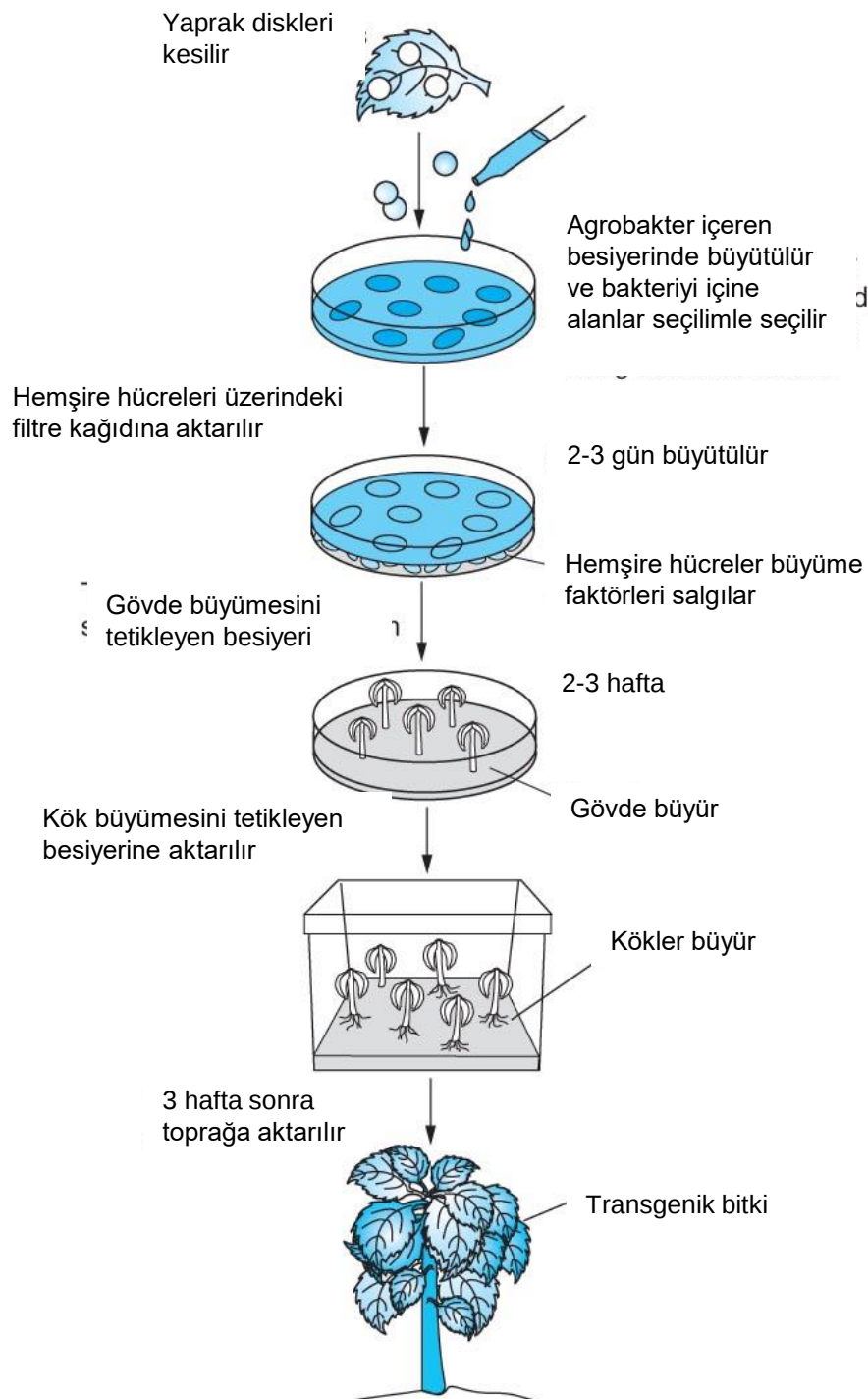
Hibrit bitki

6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Klonlama**

- **Yaprak parçaları tekniği**

- Yapraktan küçük diskler kesilir
 - Genetiği değiştirilmiş *Agrobakter* (*Agrobacterium tumefaciens*) içeren besiyerinde kültüre alınır
 - Bitkileri enfekte eden bir toprak bakterisi
 - Bakteri TI plazmid adı verilen ve gen aktarımı yapılabilen bir plazmid içerir.
 - TI plazmid DNA'sı bitki hücrelerinin DNA'sıyla birleşir.
 - Yaprak diskleri, kök ve gövde gelişimini tetikleyen hormonlar ile büyütülür.



6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Klonlama**

- **Gen tabancaları**

- Üzeri DNA kaplı metal boncukları embryonik bitki hücrelerine fırlatmak için kullanılır.
 - Hedef çekirdek veya kloroplasttır
 - Transforme olmuşları seçmek için belirtici genler kullanılır
 - Antiniyotik direnci gibi
 - Agrobaktere dirençli bitkilerde tercih edilir.

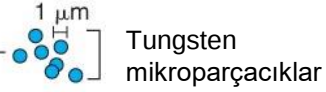
(a)



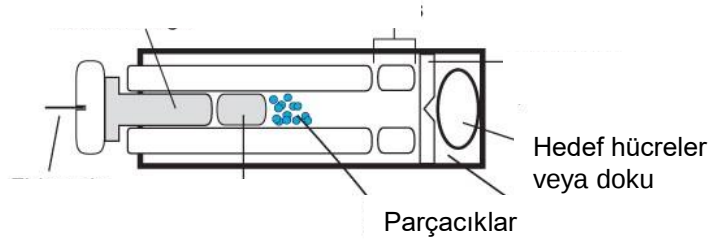
Bitkide üretim için promotor



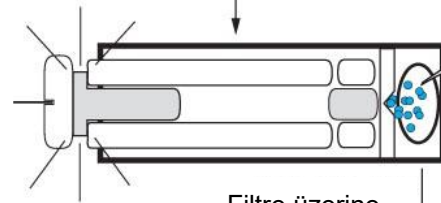
DNA parçacıkların üzerine çöktürülür



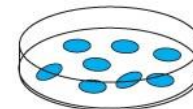
Parçacık tabancasına yükle



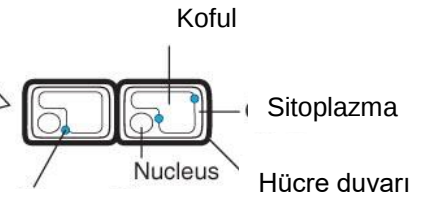
Bitki hücelerine parçacıklar ateşlenir



Filtre üzerine ekilir ve seçilir



Mikro parçacıklar hücelere girer



6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Klonlama**

- **Kloroplast mühendisliği**

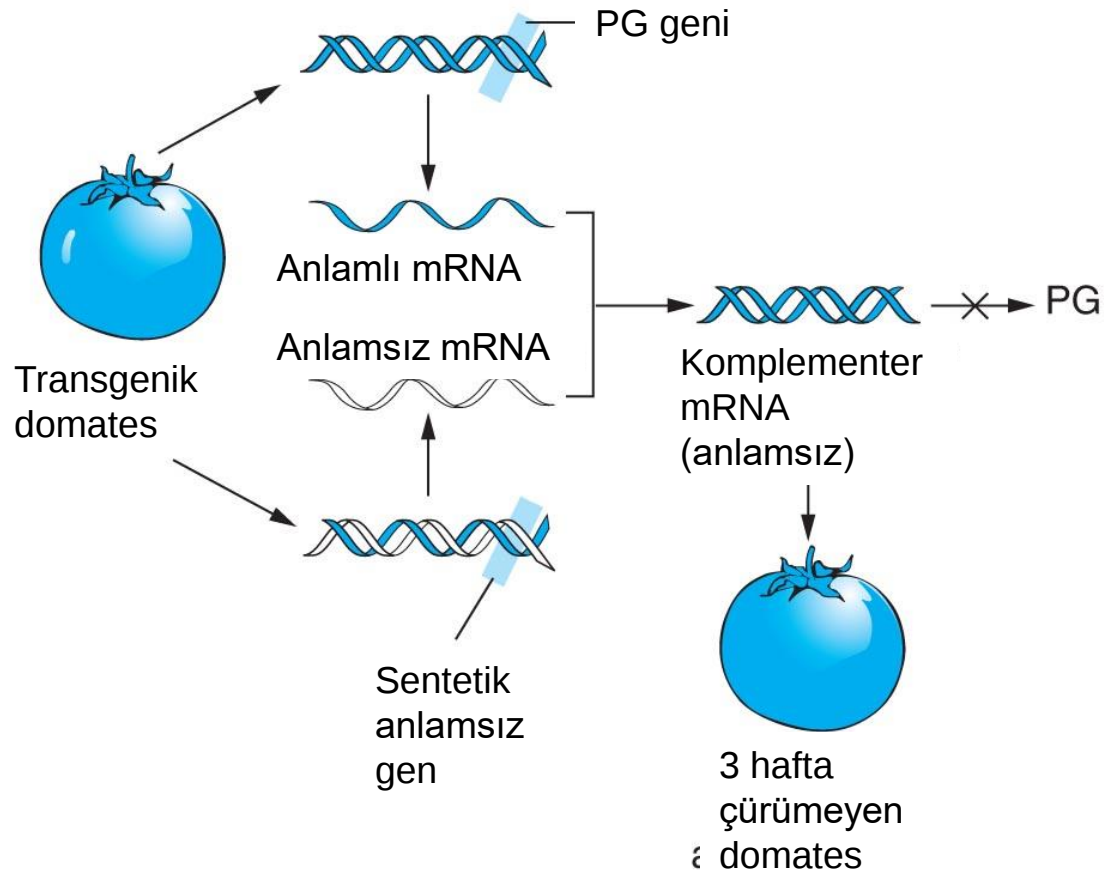
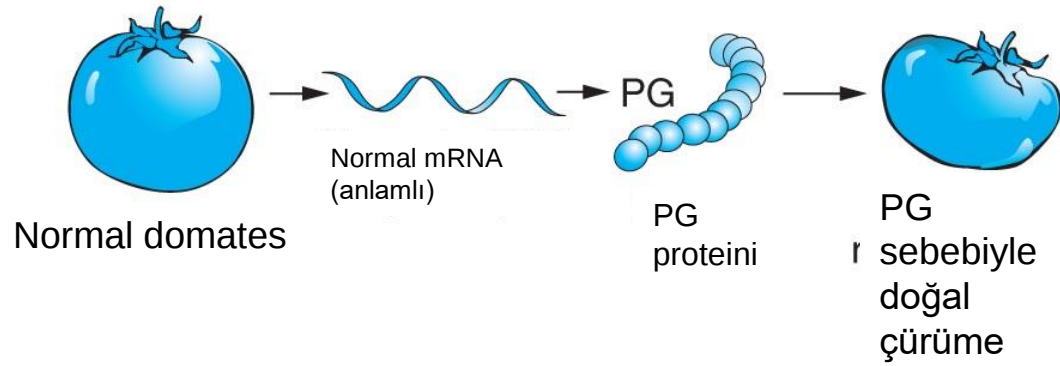
- Kloroplasttaki DNA birkaç geni aynı anda içine katabilir
 - Aktarılan genlerin büyük bölümü aktif olmaya devam eder
 - Kloroplast DNA'sı polende serbest kalan DNA'dan tamamen farklıdır – Uzaktaki bitkilere polen taşınmasıyla transforme genin aktarımı söz konusu değildir!!!

6.2 Bitki transgenetiğinde yöntemler

- **Klonlama**

- **Antisens teknolojisi**

- Bir genin komplementer kopyası hücreye aktarılır
 - Bu kopya antisens (anlamsız) molekül adı verilen bir mRNA kodlar
 - Antisens molekül normal mRNA'ya (sens/anlamalı molekül) bağlanır ve böylece onu inaktif hale getirir
 - *Flavr Savr* domates



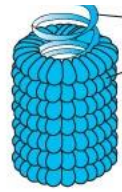
6.3 Pratik uygulamalar

- Bitki aşıları
- Genetik pestisitler
- Herbisit direnci
- Artırılmış besin
- gelecek: İlaçlardan yakıta....

6.3 Pratik uygulamalar

- Bitki aşıları
 - Aşı geni, bitkinin DNA'sına yerleştirilir
 - Örnek: Tütün mozaik virüsünün bir geni tütün bitkisine aktarılır
 - Virüs geninin kodladığı protein, bitkinin bağışıklık sistemini uyarır
 - Bitki artık virüse karşı bağışıklık kazanmıştır

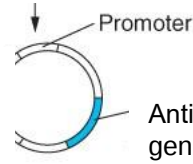
Tütün mozaik virüsü



RNA molekülü

1. Virüsün kılıf RNA'sı DNA'ya dönüştürülür ve T1 plazmidine klonlanır

Virüsün kılıfı
geni



2. Agrobaktere transformasyon



Bitki hücresi



T1 DNA plasmid carrying
new gene within
plant chromosome

Transformed
plant cells grown
in culture

Plant regenerated

3. Virüsü yapraklara ekle

Transgenik bitki



Leaf lives



Kontrol bitki



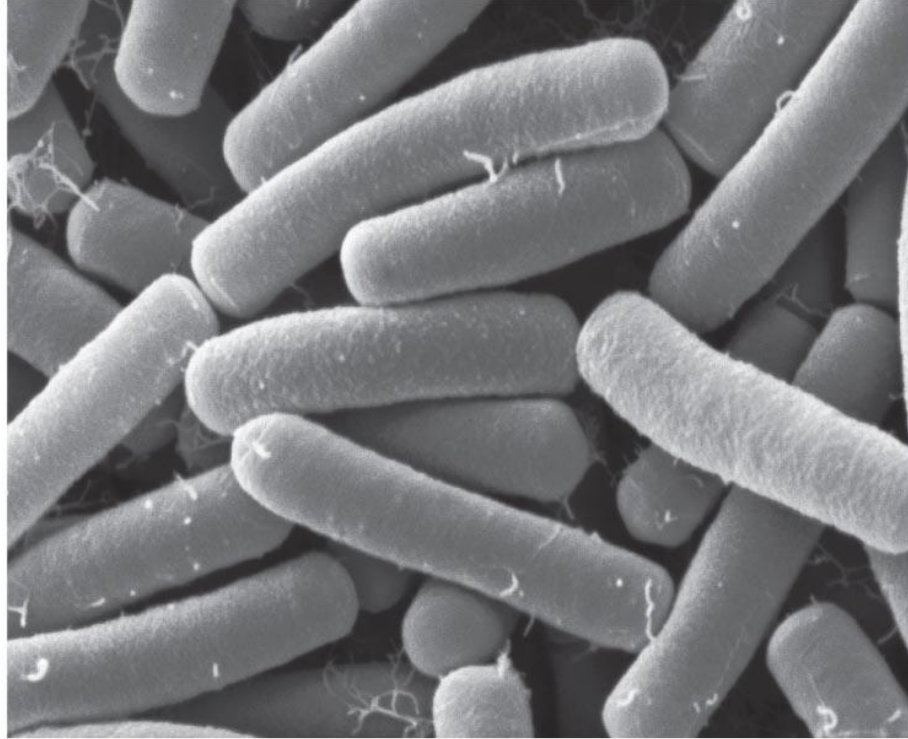
Control leaf
destroyed



6.3 Pratik uygulamalar

- Genetik pestisitler
 - *Bacillus thuringiensis* (Bt) zararlı böcekleri ve larvalarını öldüren bir bakteridir
 - 50 yıldan fazla bir süredir doğal pestisit olarak kullanılmaktaydı
 - Bt genlerin bir bitkinin DNA'sına aktarılabilir
 - Belirli böceklerle karşı kendiliğinden savunma sağlar
 - Kral kelebeklerle ilgili tartışmalar

(a)



(b)



TEM, $\times 40,000$

6.3 Pratik uygulamalar

- Güvenli saklama
 - Her yıl tarım ürünlerinin saklanması sırasında böcek istilaları sebebiyle milyonlarca dolar kaybedilmektedir
 - Avidin proteini üreten transgenik mısır bu istilalara karşı dirençlidir

6.3 Pratik uygulamalar

- Herbisit direnci
 - Otları öldüren geleneksel ilaçlar, bitkilere de zarar vermektedir.
 - Genel herbisitlere karşı bitkileri dirençli hale getirmek için genetik müdahaleler yapılabilir
 - Otların daha hafif ve çevre dostu herbisitlerle yok edilmesini sağlayabilir

6.3 Pratik uygulamalar

- Herbisit direnci
 - Örnek: glifosat direnci: normalde önemli bir biyokimyasal yolda yer alan bir enzimi engeller.
 - Transgenik bitkiler glifosattan etkilenmeyen alternatif bir enzim üretir
 - Günümüzde üretilen çoğu soya fasülyesi herbisit direnç geni içerir
 - Maalesef glifosata dirençli otlar da evrimleşti

6.3 Pratik uygulamalar

- Artırılmış besin içeriği
 - Altın pirinç, vücutta A vitaminine dönüştürülen beta karoten içerecek biçimde transgenik yapılmıştır.
 - Çevreci örgütlerin endişeler ile ilgili konuşmaları sebebiyle 2011 itibaryle çiftçiler bu pirinci ekmemektedir

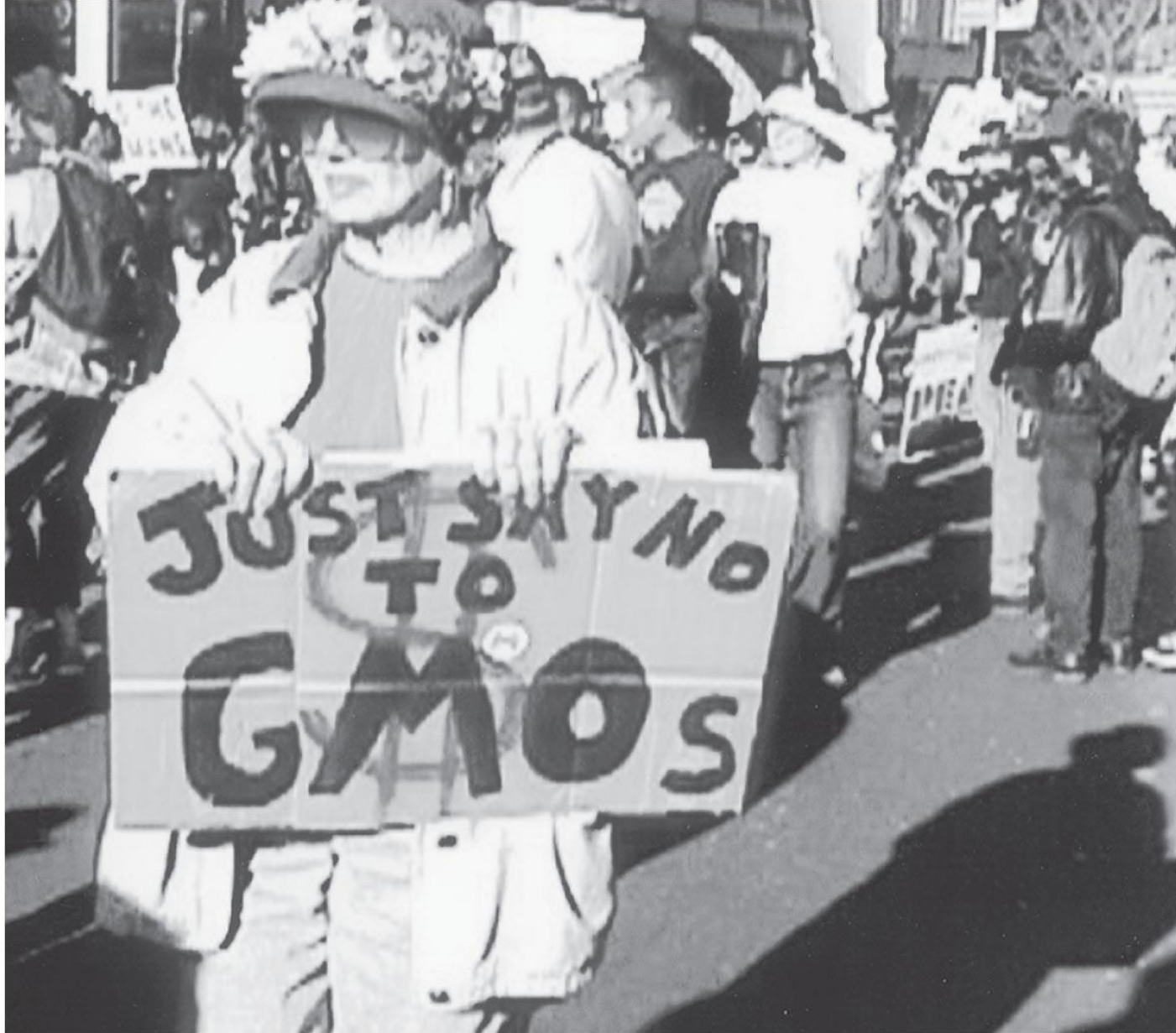
6.3 Pratik uygulamalar

- Farmakolojide bitki biyoteknolojisi
 - Bitkiler ideal protein fabrikaları olabilirler
 - İlaç üretimi için kullanılabilirler
 - Soğuk zincir gerektirmeyen, ucuz ve yenilebilir aşılar
 - «Moleküler tarım" insan sağlığı için iyi olan fitokimyasalların üretimi
 - Fitokimyasallar, antikorlar, kan ürünleri, sitokinler, büyüme faktörleri, hormonlar, enzimler

6.3 Pratik uygulamalar

- Bitki biyoteknolojisi geleceği: yakıtlar
 - Biyoyakıt: biyolojik ürünlerden elde edilen yakıttır.
 - Fosil yakıtlara alternatif yakıtlara ihtiyaç artmaktadır
 - Fakat henüz çok verimli üretim yapılamamaktadır.
- Gelecekte, bitki artıklarını etanole dönüştürmek üzere, şekerle dönüştürmek isteniyor
- Algler petrole yeni alternatif olabilir

6.4 Sağlık ve Çevre endişeleri



6.4 Sağlık ve çevre endişeleri

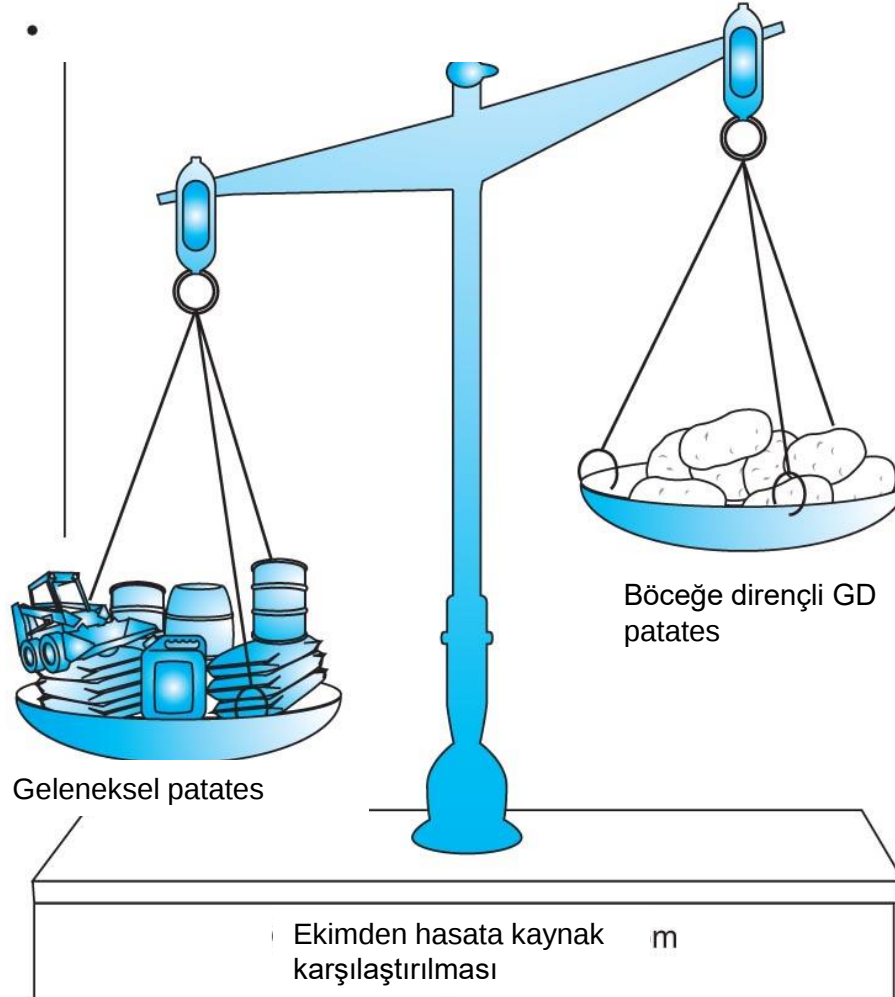
- İnsan sağlığı
 - Normalde bitkide olmayan yabancı genlerin etkisi
 - Alerjik tepkiler
 - Seçilim için kullanılan antibiyotik direnç genleri, insanlardaki bakterilere geçebilir mi?
 - Kansere sebep olur?
 - Bugüne kadar bilim bu görüşleri destekleyecek kanıt bulamamıştır

6.4 Sağlık ve çevre endişeleri

- Güvenlik endişeleri bir endüstriyi sarsacak kadar güçlü olabilir
 - 2000 yılında patatesi işleyen fabrikalar GD patatesleri almayı bıraktılar.
 - Tehlikelerine dair bir işaret bulunamadı

6.4 Sağlık ve çevre endişeleri

- 2,500 lbs of atık
- 150000 galon taşıma için yakıt
- 180000 depolama malzemesi
- 4000000 lbs hammadde
-
-
-



6.4 Sağlık ve çevre endişeleri

- Çevre
 - Böcek veya ota direnç genleri otlara yayılabilir
 - Az sayıda uzman bunun olacağını düşünmekte; daha fazla çalışma gerekiyor
- Düzenlemeler
 - satıştaki gıdalar kontrol ediliyor
 - yetiştirme yöntemlerin denetleniyor

William J. Thieman and Michael A. Palladino
THIRD EDITION

Hayvan Biyoteknolojisi

Konu başlıkları

- Hayvan biyoteknolojisine giriş
- Araştırmada hayvanlar
- Klonlama
- Transgenik hayvanlar

Hayvan biyoteknolojisine giriş

- Genetiği değiştirilmiş hayvanların kullanım alanları
 - Yeni tedaviler geliştirmek
 - Gıda ihtiyacını karşılamak
 - İnsanlar dahil tüm hayvanların biyolojisini anlamak
- Bilimsel ve etik problemleri beraberinde getirmektedir.

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Hayvan modelleri
 - Hayvanlar ve insanlar arasında pek çok genetik ve fizyolojik benzerlik vardır.
 - Geçtiğimiz yüzyılda gerçekleşen tıbbi gelişmelerin çoğunluğuna hayvanlarla yapılan araştırmalar ön ayak olmuştur.
 - Çiçek aşısı
 - Diyaliz
 - Katarakt ameliyatı
 - Hayvan sağlığında da önemli gelişmeler yaşandı
 - Biyoteknoloji sayesinde 111 adet veteriner malzemesi ve aşısı üretilmiştir.

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Hayvanlar yerine sadece hücreler kullanılamaz mı?

7.1 Araştırmada hayvanlar

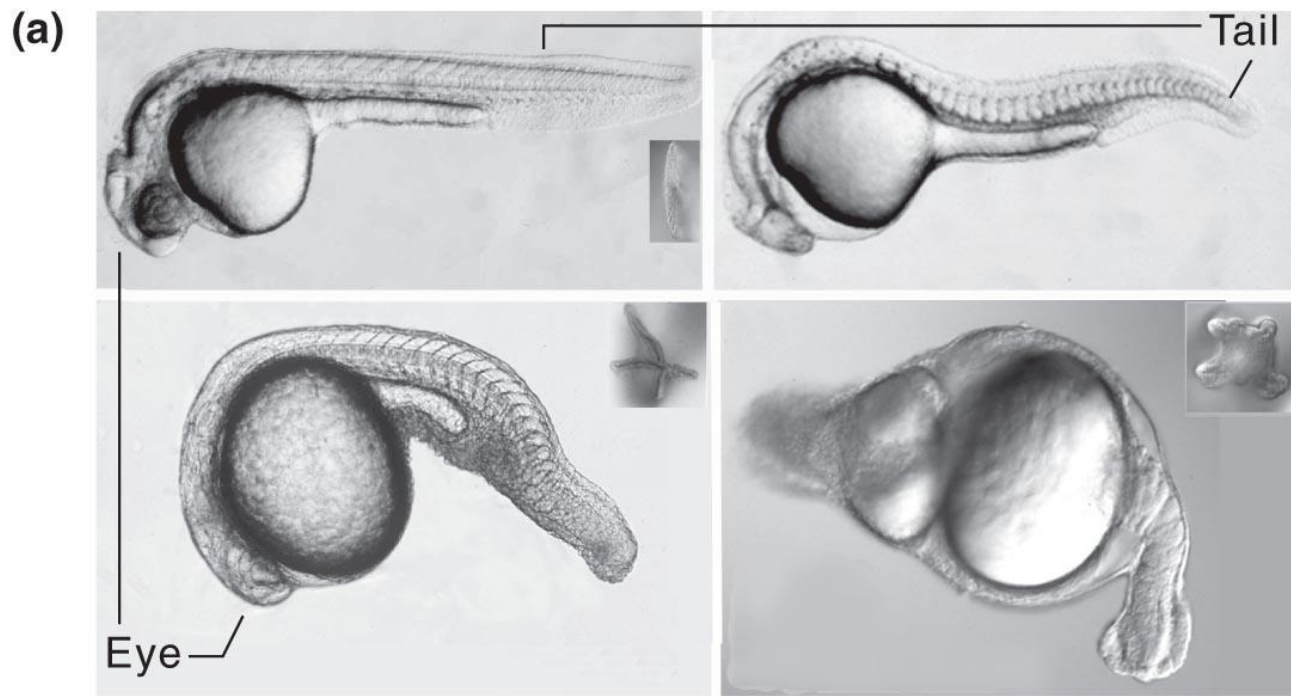
- Genellikle kullanılan hayvanlar
 - Safkan fare ve sıçanlar
- Kullanılan diğer türler
 - Zebrabalığı, meyve sineği, yuvarlak solucanlar
- Köpekler, maymunlar, şempanzeler, kediler deney hayvanlarınınin %1'den azını oluşturmaktadır.

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Zebra balıkları 3cm uzunluğundadır, bu sayede küçük alanlarda çok miktarda büyütülebilirler
- Nesiller arasında 3 ay vardır
- Bir dişi ortalama 200 yavru yapar

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Zebra balıkları gelişim ve genetik çalışmaları için idealdir.
 - Hızlı büyüme
 - Embriyo yumurtanın içinde görülebilir
 - Yumurtaya gen aktarımı kolaydır – Bir verici anneye ihtiyaç yoktur



7.1 Araştırmada hayvanlar

- Erken ilaç toksisite deneyleri için sıçanlar, farelere göre daha uygundur
 - İlaça yanıtları insanlara daha çok benzer
 - Büyük vücutları, cerrahi ve fizyolojik deneylere daha uygundur
 - Üzerlerinde daha fazla toksik deney yapıldığından daha iyi anlaşılmıştır

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Kedi, köpek ve primatlar kendilerine has biyolojileri önemli olduğunda belirli durumlarda kullanılır
 - Köpeklerin akciğer ve kardiyovasküler sistemleri insanlarla benzerdir.
 - Maymun ve şempanzeler HIV'e duyarlılık açısından insana benzeyen tek türdür.
- Son 20 yılda deneylerde kullanılan bu hayvanların sayıları azalmaktadır

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Amerikan Gıda ve İlaç Kurumunun (FDA) zorunlu tuttuğu mevzuata göre yeni ilaç, tıbbi uygulama ve kozmetik ürünler güvenlik testlerinden geçmelidir.

7.1 Araştırmada hayvanlar

TABLE 7.1 İLAÇ ONAYI İÇİN GEÇİLMESİ GEREKEN TEST FAZLARI

FDA faz testleri, insanlarda denenmeden önce hayvan deneylerini gerektiren klinik öncesi testleri içerir. Eğer ilaç adayının toksik olmadığı ve faydası olduğu kanıtlanırsa Araştırmada Yeni İlaç statüsü kazanır. Eğer 3 fazlı insan testlerini geçerse Yeni İlaç Başvurusu statüsüne geçer. Bu durumdaki bir ilaç 2.5 yıl daha test edilir. TOPLAM 12 yıl.

	Klinik öncesi test	Faz I	Faz II	Faz III	FDA	Faz IV
Yıl	3.5	1	2	3	2.5	Toplam 12
Test yapılan	Laboratuvar hayvanları	20-80 sağlıklı gönüllü	100-300 hasta gönüllü	1000-3000 hasta gönüllü		
Amaç	Güvenlik ve biyolojik aktivite	Güvenlik ve doz	Etki ve yan etki	Etki doğrulama, uzun süreli kullanım yan etkileri	Değerlendirme, onay	Onaydan sonra değerlendirme
Başarı oranı	5000 bileşik değerlendirilir	5'i faz testlerine girer			1'i onay alır	

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Hücre kültüründeki ilk denemeler yüksek toksisiteye işaret ederse, zaten hayvan deneylerine hiç geçilmez.
- Lab-hayvanlarıyla ön çalışmalarda, herhangi bir toksik durumun gözden kaçmaması için birbirine benzeyen türler seçilir.
- Emilim hızı, kimyasal metabolizması ve vücuttan atılım için gereken süre hayvan modellerinde belirlenebilmektedir
- Önemli problemler tespit edilirse, ilaç klinik çalışmalara giremez.

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Hayvan modellerine alternatifler
 - Hücre kültürü ve bilgisayar modelleri
- Hücre kültürü
 - Maddelerin toksisitesini görme amaçlı öncül deneyler
 - Biyoloji açısından temel sorulara cevap verir
 - Yaşayan bir organizmadaki etkileri hakkında bilgi veremez

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Bilgisayar Modelleri
 - Belirli moleküler ve kimyasal yapılar ve bunların etkileşimlerinin simülasyonlarını içerir.
 - Programlama ve fizyoloji bilgisiyle sınırlıdır.

7.1 Araştırmada hayvanlar

- Hayvan Araştırmalarında düzenlemeler
 - **Federal Hayvan Refahı Hareketi:** Deney hayvanlarının barınması, beslenmesi, temizliği ve tıbbi bakımlarına belirli standartlar getirir
 - **Üniversite Değerlendirme Kurulları:** Her araştırmacılar deneylerinde hayvan kullanımının gerekli olduğunu kanıtlamalıdır, en uygun hayvanı seçmelidir ve mümkün olan en az sayıda hayvanı kullanmalıdır

7.1 Araştırmada hayvanlar

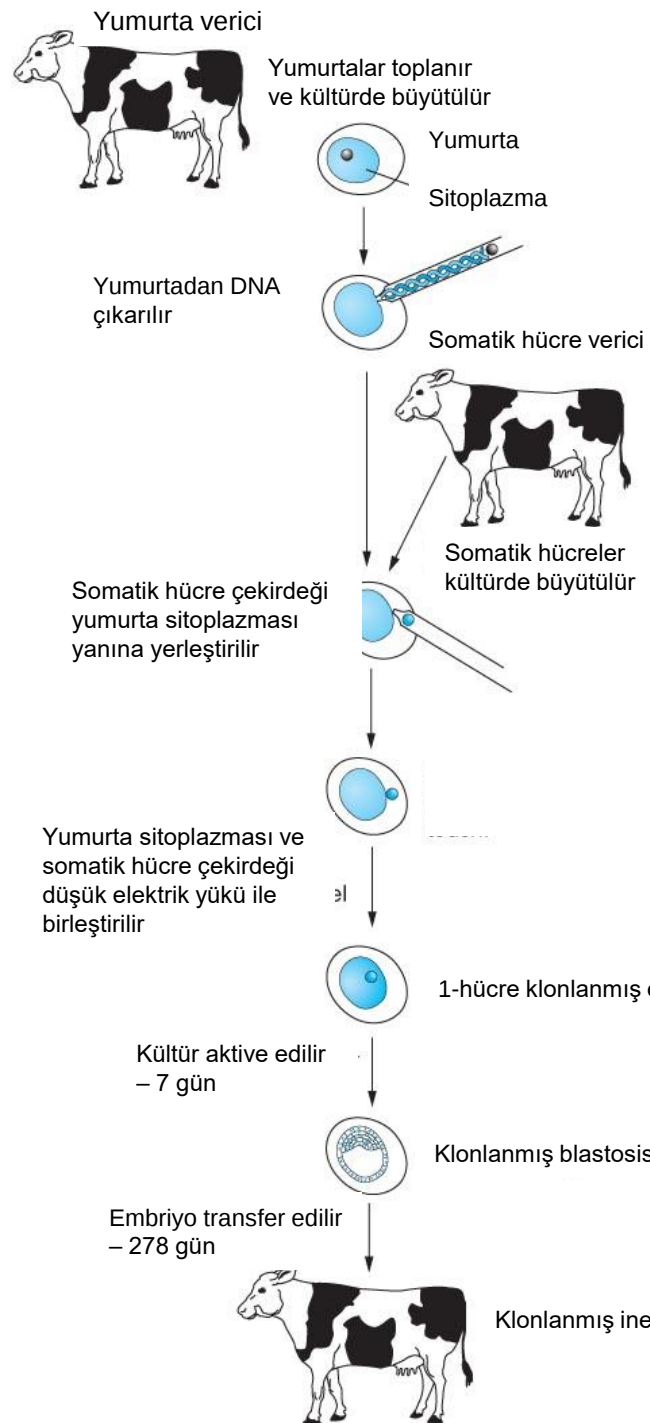
- Hayvan deneylerinde düzenlemeler
 - Herhangi bir kurumdan destek alabilmek için araştırmacılar Deney hayvanları kullanım ve bakımı yönergesindeki standartlara uymak zorundadır

7.2 Klonlama

- 1997’de bir yetişkin hayvanın hücre çekirdeğinden ilk defa olarak bir hayvan klonlandı
 - Koyun Dolly
- İnsan klonlamasına yönelik endişeleri ortaya çıkardı
- Dolly büyük bir buluştu, çünkü erişkin bir hücreden yaratılmıştı
 - Özellikleri bilinen bir yetişkinin tam kopyası

7.2 Klonlama

- **Bir yetiştikinden klon üretmek**
 - Yetişkin canlının somatik bir hücrelerinden alınan DNA, başka bir hayvandan alınan yumurtaya aktarılır
 - Yumurtanın DNA'sı daha önce alınmıştır
 - Verici hücrenin DNA'sı yumurta hücresine aktarılır
 - Embriyo taşıyıcı anneye yerleştirilir.
 - Koyun, domuz, keçi, sığır, klonlanmıştır



7.2 Klonlama

- Klonlamada sınırlar
 - Verici hücre yaşayan bir organizmadan gelmelidir.
 - Klonlar tam olarak aynı değildir.
 - Çevre ve deneyimler tarafından farklı şekillendirilir.
 - Başarı oranı düşüktür
 - Dolly 277 denemenin sonucudur
 - Karbon Kopya adı verilen kedi 87 denemenin ürünüydü
 - Klonlar zamanından önce yaşlanırlar
 - Kısa telomerler



7.2 Klonlama

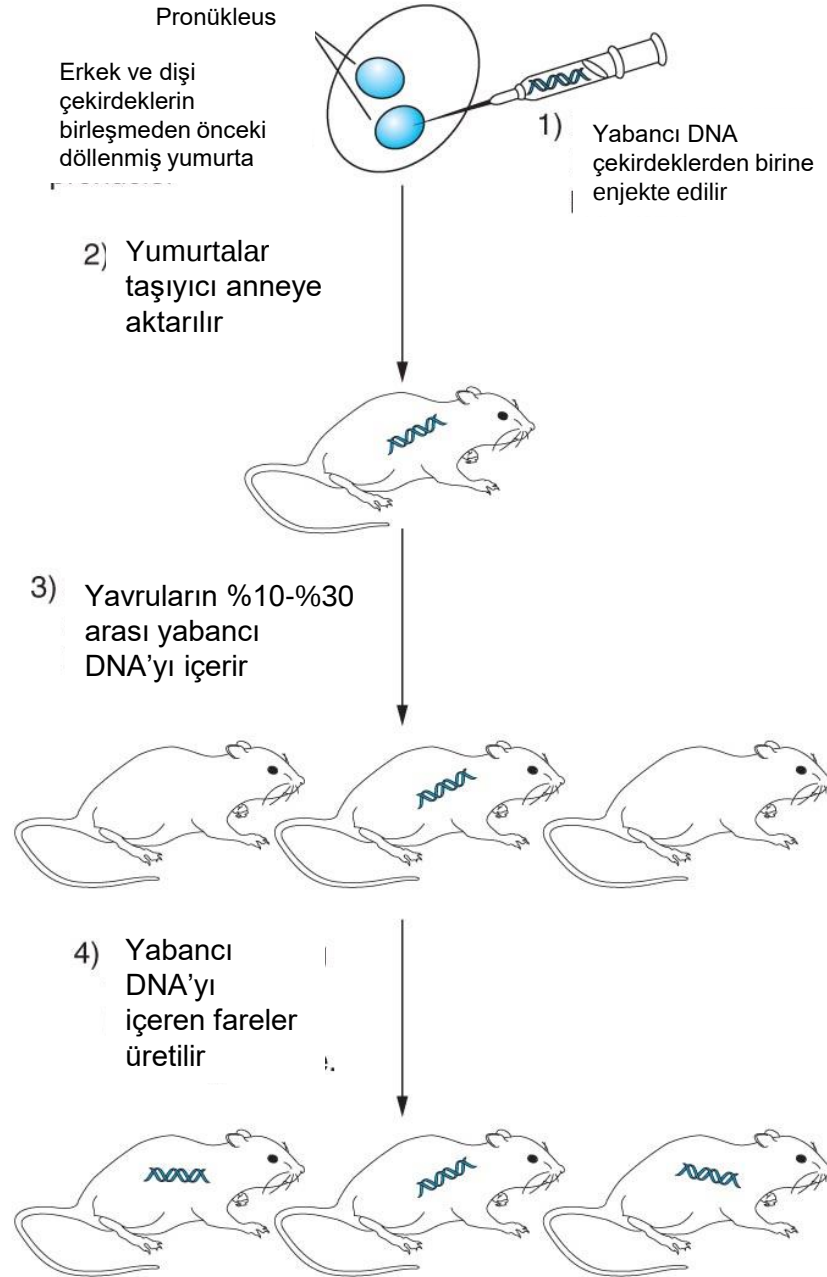
- Klonlamanın geleceği
 - Halen genç bir bilimdir ve deneysel çalışmaların artması gerekmektedir.
 - İnsan organ yetmezliklerinde uygulanması için pratik bir yöntem değildir.
 - Etik sorular
 - Klonun organ bağıışı yapabilecek olgunluğa erişmesi yıllar alır.

7.2 Klonlama

- Klonlamanın geleceği
 - Klonlanmış hayvanlar araştırmalarda avantajlıdır çünkü aynı genetik yapı sayesinde uygulamaların sonuçları daha güvenilir olur.
 - Gelişim, yaşlanma ve hastalıkların hücresel ve moleküler temellerini anlama açısından çok değerli olabilir
 - Nesli tükenen hayvanların üretimi için kullanılabilir.

Transgenik hayvanlar

- Hayvanlara yabancı genetik madde aktarımı
 - **Pronükleer mikroenjeksiyon**
 - Zigotun gelişiminin mümkün olan en erken zamanında transgen aktarılması
 - DNA yumurta veya spermin çekirdeğine doğrudan enjekte edilir



Transgenik hayvanlar

- Çiftlik hayvanlarının üretimini artırmak için gen aktarımı kullanılabilir
 - Daha hızlı büyüme için gen = daha hızlı pazara verilir ve daha düşük maliyetli

Transgenik hayvanlar

- Daha sağlıklı gıdalar için kullanılabilir
 - Kolesterol üretiminde görev alan genlerle biraz oynanırsa, daha düşük kolesterol içeren yumurta üretimi sağlanabilir.
 - Herman, adındaki boğa insan laktoferin genini taşıyordu ve bu da yavrularının sütündeki demir miktarını artırıyordu.

Transgenik hayvanlar

- Hayvanları hastalıklara karşı dirençli yapacak genler aktarılabilir
- Mastite (süt bezlerinin iltihabı) dirençli inekler üretildi
 - S. Aureus bakterisini öldüren lizostafin üreten bir gene sahipler
 - İlk veriler başarılı görünüyor

Transgenik hayvanlar

- Kanada'da **EnviroPig** üretildi
- Tükürüğünde fitaz enzimi üreten domuz
 - Fitaz domuzların yiyeceğindeki fosfatları parçalar, böylece domuzlar daha az fosforlu dışkı üretirler
 - Fosfor domuz çiftliklerinin başlıca kirlilik kaynağıdır

Transgenik hayvanlar

- Gıda güvenliğinde gelişmeler
 - Çiftlik hayvanlarına hastalık direç genleri aktarımı, her yıl besin zehirlenmesinden kaynaklanan binlerce ölümü azaltabilir.
 - Ayrıca antibiyotik kullanımını da azaltacaktır

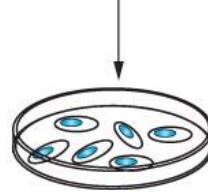
Transgenik hayvanlar

- Biyoreaktör olarak transgenik hayvanlar
 - Hayvan vücutları protein üreten biyoreaktörler olarak kullanılabilir
 - İstenilen proteinin geni hedef hücreye aktarılır
 - Klonlama teknikleriyle, bu hücre yetiştiren bir hayvan olmak üzere büyütülür
 - İstenilen proteince zengin süt veya yumurta üretir

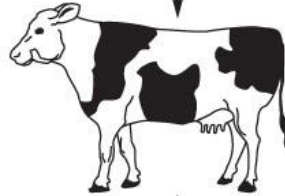
İnsan
DNA'sı



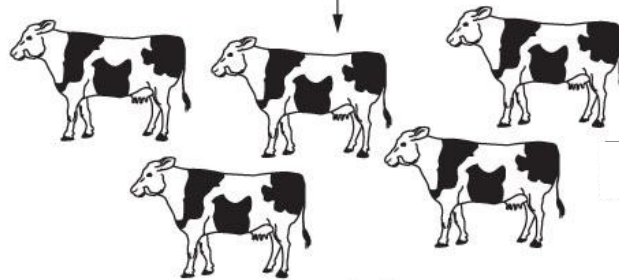
İnsan bağışıklık genlerini
içeren yapay kromozom inek
somatik hücrelerine aktarılır



İneğin kendi bağışıklık genleri susturulur



İnsan bağışıklık
genleri içeren canlı



Üretim

Antijenle uyarılma

Serum toplama ve saflaştırma

İnsan antikorları

7.3 Transgenik hayvanlar

- **Biyoreaktör olarak transgenik hayvanlar**
 - Biyoçelik, kurşun geçirmez yelekleri ve cerrahi iplikleri güçlendirmek için kullanılabilir
 - Dünyadaki en güçlü malzemelerden biri olan örümcek ağı proteini geni, keçilede aktarıldı ve sütlerinde üretilmesi sağlandı
 - Bir insan geni olan, *Atryn*, kalıtsal pıhtılaşma eksikliği olan hastalar için gereklidir
 - Süt bezlerinde Atryn geni taşıyan transgenik keçiler, geleneksel yöntemlerden çok daha hızlı, ucuz ve güvenilir şekilde bu proteini üretiyor.

Transgenik hayvanlar

- **Susturma (Nakavt): Transgeniğin özel bir çeşidi**
 - Belirli bir geni susturulmuş fareler
 - Dışardan embryonik kök hücrelere verilen değiştirilmiş DNA, hücredeki komplementer DNA ile parça değişimi yapar
 - Homolog rekombinasyon
 - Bu hücreler normal embriyo içine aktarılır ve embriyo da anneye yerleştirilir

Transgenik hayvanlar

- Nakavt hayvanların araştırılması insan hastalıklarının anlaşılmasını sağlar
 - diyabet, kistik fibroz
- 1988 de Harvard Üniversitesi tarafından patenti alınan meme kanseri faresi, yeni ilaçlar ve tedaviler denemek için tüm dünyada kullanılmaktadır.