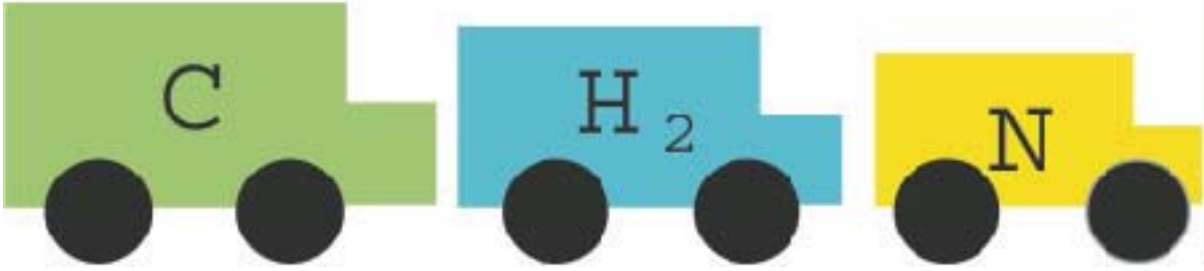


# YAPAY



İnsanoğlunun yüzyıllardır cevap aradığı “Yaşam nedir?” sorusu bir süre daha kafamızı meşgul edecek gibi görünüyor. Ancak cevaba hiç bu kadar yakın olmamıştık. Bilim adamları artık bu soruya doğrudan bir yanıt bulmaya çalışıyor. Nasıl mı? Bir tane daha yaparak!

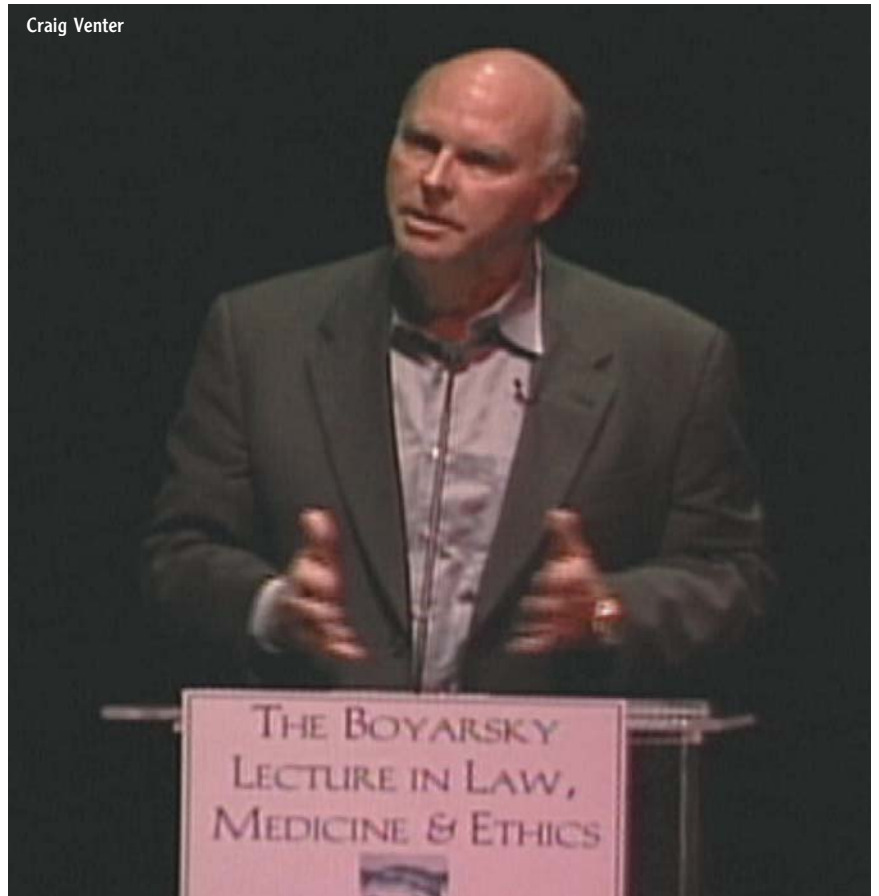
Ünlü bilim adamı Craig Venter, 2003 yılı Kasım ayında yaklaşık beş bin baz uzunluğunda bir virüs genomunu yapı taşlarından iki hafta gibi rekor bir sürede sentezlemeyi başardı. Bakteri hücrelerine aşılana virüs DNA’sının tamamen işlevsel olduğu, tıpkı doğal gibi virüs proteinleriyle kaplı yeni genomların başka virüsler içine girerek kendilerini kopyalayabildiği gözlemlendi. Projeyi destekleyen ABD Enerji Bakanlığı yetkilisiyle birlikte başarısını ilan eden Venter yeni hedefinin yaklaşık üç yüz bin baz uzunluğunda bir bakteri genomu sentezlemek olduğunu açıkladı. Yaşam için gerekli asgari genetik bilgiyi taşıyacak olan bu kromozomun, DNA’sı çıkarılmış bir bakteriye nakliyle, ilk yapay yaşam yaratılmış olacak. Hem Venter hem de ABD Enerji Bakanlığı, henüz doğmamış bu yapay bakteriyle ilgili büyük umutlar taşıyorlar.

Venter’in geliştirdiği yeni yöntem, 5-6 bin baz uzunluğundaki DNA parçalarının, sentetik oligonükleotitlerden kalıp kullanılmadan sentezlenmesi için gerekli zamanı önemli ölçüde kısaltıyor. Bakteri virüsü  $\phi$ X174’ün 5386 baz uzunluğundaki genomunun kimyasal olarak sentezlenmesi yalnızca 14 gün sürdü. Bir önceki yıl yapı

taşlarından sentezlenen ilk virüs olan çocuk felci virüsünün 7440 baz uzunluğundaki genomunun tamamlanmasının üç yıl sürdüğü düşünüldüğünde, Venter’in başarısının büyüklüğü kolayca anlaşılıyor. Yeni virüs parçacıkları oluşturma yeteneğine sahip genom, doğal virüsler kadar olmasa da işlevsel.  $\phi$ X174’ün genomu oldukça sıkı bir genetik örgütlenme gösteriyor: İki farklı okuma çerçevesi üzerin-

den okunan genler bazı bölgelerde üst üste çakışıyor. Bu durum işlevsel bir genom elde etmek için oldukça hatasız bir baz diziliminin sağlanmasını zorunlu kılıyor. Venter’in tekniğinde, ortalama her beş yüz bazda bir baz yanlış yerleşiyor. Bu hata oranına rağmen sentezlenen DNA zincirlerinden tamamen hatasız olanlar da belirlenmiş. Daha kusursuz DNA zincirleri elde etmek için yanlış yerleşmeleri dü-

Craig Venter



# YAŞAM



zeltmek günümüz teknikleri içinde olanaklı.

Venter'in DNA sentezi için geliştirdiği yeni yöntem son otuz yılda hızla gelişen DNA dizi analizi tekniklerinin çok gerisinde kalan DNA sentez tekniğinin aradaki açığı kapatmasını sağlayabilir. Eğer DNA sentez ve dizi analizi tekniklerini aynı verimlilikte kullanılabilişsek genomik çalışmalarında ve pratik uygulamalarında sınırsız olasılıklar doğacak. DNA'nın doğal kaynaklardan klonlanmasındansa kimyasal yollarla sentezlenmesi için pek çok neden var. Baz dizilimi belirlenmiş DNA'larda analizin doğruluğunun kontrol edilmesi bunların başında geliyor. Ancak araştırmada kullanılacak doğal DNA'nın elde olmadığı durumlarda araştırmacıların dizisini bildikleri bir DNA molekülünü sentezleyebilmeleri bilim adamlarına pek çok yeni olanak sunacak. Doğada var olmayan, tasarlanmış, yapay bir proteine ait DNA zincirini sentezlemek, varolan bir gen bölgesi yeniden tasarlanmak ya da bir fosil örneğine ait parçalanmış bir DNA'nın yeniden birleştirilmesi yeni teknikle mümkün olacak. Bilim adamları başka bir konağın kullanımına sunmak üzere DNA kodunda küçük değişiklikler yapacak ya da gen bölgesine çok yakın düzenleyici sinyalleri değiştirerek konaktaki gen ifadesinin miktarı ve biçimi değiştirebilecekler. Dahası teorik olarak belirlenmiş atasal bir DNA zincirini üreterek evrimsel geçmişimizi bugüne getirebilecekler. DNA sentezi, her biri biyolojide çığır açabilecek

tüm bu olasılıkları mümkün kılacak. Dizi analiz teknikleri ilk kullanılmaya başlandığında hem pahalı ve hem de çok emek istiyordu. Bu yüzden de kullanımı oldukça sınırlıydı. Teknik ucuzlaşıp, kolaylaştıkça kullanımı yaygınlaştı. DNA sentezini de benzeri bir süreç bekliyor. Sentetik genomik yaygınlaştıkça çok çeşitli, karmaşık ve yeni kimyasal süreç tasarlanacak, bu teknikler enerji, eczacılık ve tekstil alanlarında yeni yaklaşımları doğuracak. Ancak sağladığı bu önemli ilerlemeye rağmen Venter'in destekçileri de, şüpheçiler de bu işteki bir sonraki aşama olan asgari genomu taşıyacak olan, en azından 300 bin baz uzunluğundaki genomun sentezlenmesinde tekniğin işe yarayıp yaramayacağından emin değil. Bir virüsten bir mikrop genomuna atlayabilmek gerçekten büyük bir adım olacak.

## Genomdan Yaşama

Peki Venter'in yapay kromozomu çalışırsa ve laboratuvar ortamında asgari genomla yaşayabilen yapay bir yaşam üretildiğinde ne olacak. Venter'in bu minik organizmayla ilgili büyük planları var. Eğer ekip işleyen genomik bir iskelet inşa etmeyi başarırsa bu iskelet üzerine ekleyecekleri yeni genlerle -belki bin kadar yeni gen- çok farklı biyolojik işlevleri olan mikroskobik fabrikalar kurmayı planlıyor. Bu yeni işlevler arasında alternatif biyolojik enerji kaynakları yaratmak, karbon gazı emisyonunu düşürmek, radyoaktiviteyle kirlenmiş alanları temizlemek

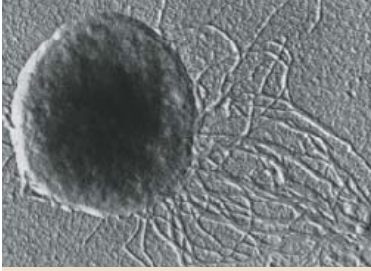
de var. Venter'in çalışmalarını destekleyen ABD Enerji Bakanlığı, Venter'i genomik araştırmalardan elde edilen teorik bilgilerin pratiğe aktarılması için ayırdığı bütçeden destekliyor. Venter'in bu amaçla kurduğu Alternatif Biyolojik Enerji Enstitüsü (IBEA) araştırmacıları, üzerinde çok az çalışmış yüzlerce deniz bakterisinin genomunu yararlı genler bulmak umuduyla araştırıyor.

Yapay yaşam nanoteknoloji araştırmacılarının da ilgisini çekiyor. Harvard Tıp Okulu'ndan George Church: "Biyolojik sistemler neyi iyi yaparlar?" diye soruyor ve cevabını kendisini veriyor. "Bir şeyler inşa etmekte gerçekçende çok iyiler." Bu onları DNA hafıza bankaları gibi yaşayan nano-fabrikalar inşa etmek isteyen nanoteknoloji araştırmacıları için çekici kılıyor. Ancak bunu yapabilmek için sistemin davranışlarının biliniyor ve tahmin edilebilir olması gerekiyor. Bunu sağlamanın iyi bir yolu da yaşamı yapı taşlarından yeniden yapmak. Church diğer yandan da evrimin repertuarını geliştirmek istiyor. Canlıların proteinleri inşa ederken kullandıkları toplam 20 amino aside ek olarak yapay amino asitleri de içeren proteinler yaparak proteinlerin kimyasal yeteneklerini geliştirmek istiyor. Bilim adamları bu yapay amino asitlerin biyokimyaya ve tıbbı kazandıracığı büyük potansiyel hakkında tahminlerde bulunmaya henüz başladılar.

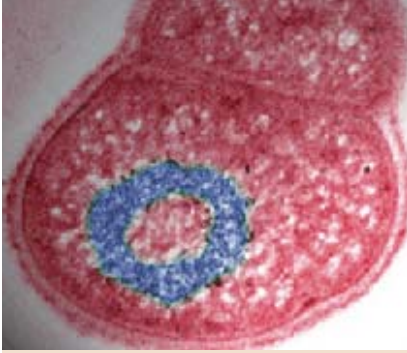
Diğer yandan pek çok insan yapay yaşamın doğuracağı tehlikelerden dolayı endişeli, eğer bu yaratıklar kulla-

## Geleceğin Genlerini Taşıyan Mikroorganizmalar

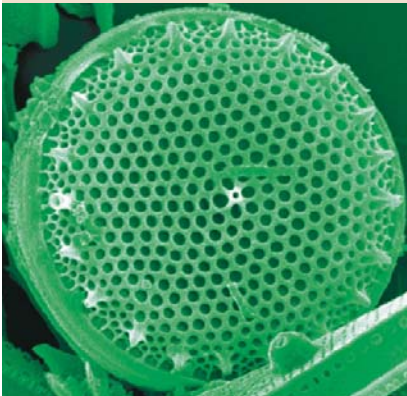
Mikroorganizmalar hemen her ortam koşulunda yaşayacak ve pek çok kaynaktan enerji üretebilecek bir metabolik çeşitliliğe sahipler. Bu çeşitlilik onların çok çeşitli biyokimyasal yeteneklerinden kaynaklanıyor. Yapay yaşam ve genomik araştırmalar bize bu engin dünyanın kapılarını açmak üzere...



**Methanococcus jannaschii:** Önemli bir enerji kaynağı olan metanı üreten bu bakteri, endüstriyel süreçlerde kullanılmasını sağlayacak yüksek sıcaklık ve basınca dayanıklı enzimlere sahip

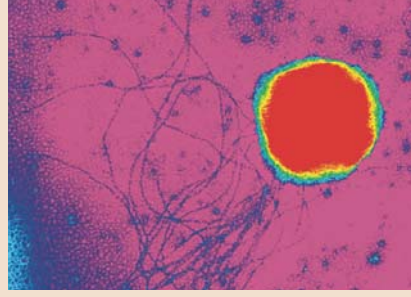


**Deinococcus radiodurans:** Aşırı derecede yüksek radyoaktiviteye dayanabilen bu bakteri aynı zamanda radyoaktif atıkların temizlenmesinde kullanılabilen özellikler de taşıyor.



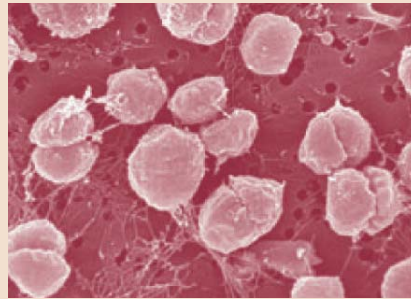
**Thalassiosira pseudonana:** Okyanuslarda yaşayan bir diyatom olan bu canlı, atmosferdeki karbonun okyanusların tabanına pompalanmasını sağlayan biyolojik süreçlerde önemli bir yeri var. Bu özelliklerinden küresel ısınmanın durdurulmasında yararlanılabilir.

**Geobacter metallireducens:** Yeryüzünün derinliklerinde güneş ışığından ve oksijenden uzakta yaşayan bakterilerden biri. Demir ve manganez gibi metalleri tüketerek yaşamını sürdürüyor. Bakterinin metaller-



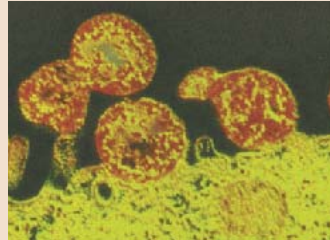
den oluşan menüsünde uranyum ve plütonyum da bulunması araştırmacıların ilgisini çekiyor. Uranyumu kullanırken, onu suda çözülebilir biçiminden çözünmez biçimine çevirerek çokerten bakteri, uranyumla kirlenmiş yer altı sularının temizlenmesinde ve toprağa geçen uranyumun sonradan çıkartılmasında kullanılabilir. ABD Enerji Bakanlığı bakteriyi alan çalışmalarına başlamış.

Bu bakterinin yakın akrabası olan *G. sulfurreducens*'le yapılan alan çalışmalarında sudaki uranyumu %90 oranında azaltmayı başarmışlar. Bakterinin uranyumu besin olarak kullanırken kullandığı süreç aynı zamanda bataryalar için alternatif bir enerji kaynağı oluşturuyor. Araştırmacılar *Geobacter* hücrelerinden elektrik akımı elde etmeyi başarmış. *Geobacter* gücüyle çalışan bir otomobil belki hiç yapılamayabilir. Ancak okyanus tabanında çalışacak bilgisayarlar güç kaynağı sağlamakta kullanılabilirler.



**Polaromonas naphthalenivorans:** New York yakınındaki bir çöplükte bulunan bu bakteri kömür katranında bulunan naftalini parçalıyor. Naftalinin kendisi önemli bir kirlenici değil ancak kömür katranında bulunan pek çok başka kimyasal madde yer altı sularını kirlenip önemli çevresel sorunlara yol açma potansiyeli taşıyor. Bakterinin keşfi kimyasal atıkları parçalayan bakterilerin araştırılması ve tanımlanmasında bilim adamlarına cesaret veriyor.

Mikoplazmalar bilinen en küçük serbest yaşayan hücrelerdir, hücre duvarları olmayan, parazit yaşa-



ma uyumlu, alışılmadık derecede küçük bir genomu sahip bu prokaryot grubunun basit yapıları nedeniyle tüm canlıların ortak atasının en yakın akrabası olabileceği düşünülüyordu. Venter'in genom dizilimini bulmasıyla *Mycoplasma genitalium*'un aynı zamanda bilinen en az sayıda gene sahip serbest yaşayan hücre olduğu da ortaya çıktı.

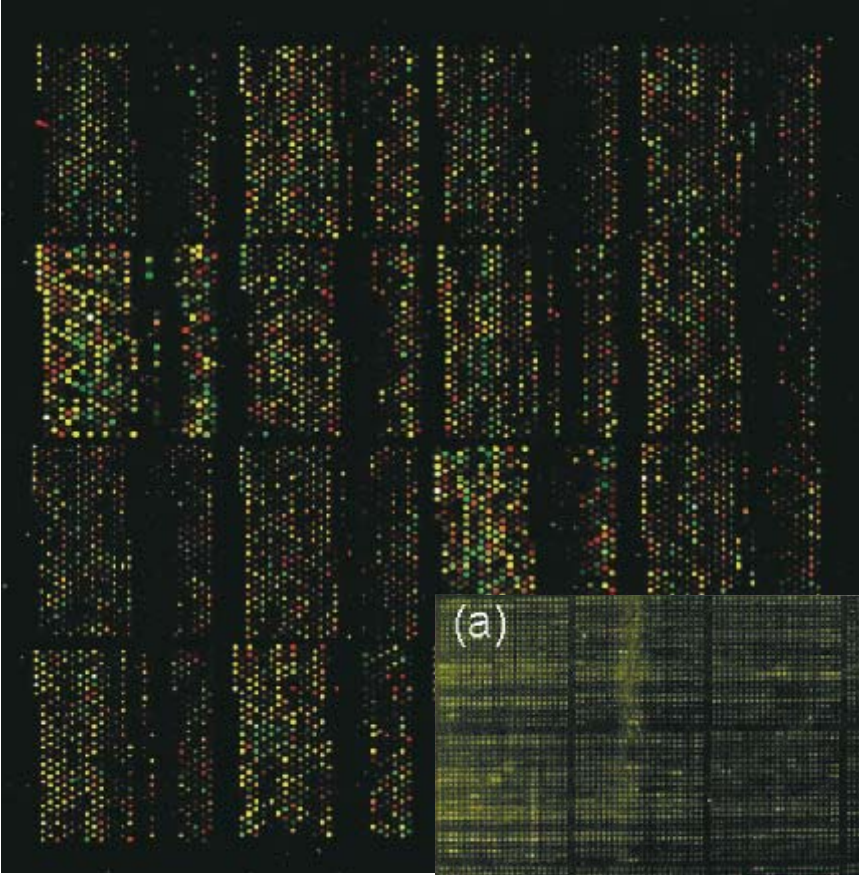
nıldıkları yerlerden doğal çevreye kaçarlarsa ya da tekno-teröristler bağırsıklık sistemimizin baş edemeyeceği öldürücü mikroplar yaratırlarsa ne olacak. Organizmaların asgari genom taşımaları burada kilit nokta çünkü tüm ihtiyaçları yaşama ortamlarına bilim adamları tarafından konulan yapay bakteriler tıpkı küçük bebekler gibi elden beslenecek. Yapay canlılar doğal koşullarda yaşama şansları sıfır olacak şekilde tasarlanacaklar.

Craig Venter yapay kromozom çalışmalarına başlarken, biyolojik silah tehdidini karşı araştırmalarının tüm ayrıntılarını açıklamayabileceklerini duyurmuştu. Ancak yukarıda sayılan nedenlerle yapay yaşamın biyolojik silah olarak kullanılması da olası görülüyor. Biyolojik silah üretimde zaten başarılı ve çevrede yaygın olarak bulunan organizmalara, onları ölümcül yapacak birkaç gen eklemenin, bütün organizmayı yeni baştan yapmaktan çok daha verimli bir yol olacağı söyleniyor.

## Yapay Kromozomlardan Yapay Yaşama

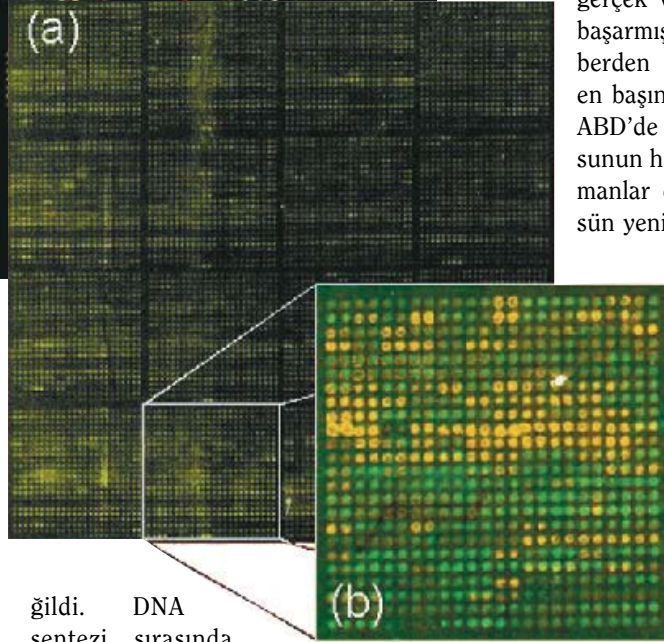
Wöhler'in 1828 yılında üre'nin kimyasal sentezini başarısından beri yaşamın kimyasal olarak sentezlenmesi, sentetik organik kimyanın önünde aşılması gereken bir hedef olarak duruyor. DNA'nın genetik rolünün anlaşılmasından bu yana çabaların büyük bölümü oligonükleotidlerin (kısa DNA zincirleri) ve genlerin sentezlenmesi yönünde harcandı. Venter'in girişimi bugüne kadar bu amaçla atılmış en büyük adım.

1999 yılında Venter'in ekibi her hücre için bir genin etkinliğini bozarak yaklaşık 300 genden oluşan asgari bir prokaryotik genom tanımladı. Kendini kopyalayabilen hücresel yaşam için gerekli tüm bilgiyi taşıdığı düşünülükleri bu genomu işlerliğini test etmek isteyen ekip asgari genomu taşıyan sentetik bir kromozom hazırlayarak bakteri hücresinde denemeye karar verir. Venter yapay yaşam yaratma isteğini duyurduktan sonra Genomik Etiği Grubundan etik onay almak üzere çalışmalarını durdurdu. 2002 yılı



linda Venter'in TIGR'i tarafından sınırsız şekilde desteklenen, etik araştırmacıları ve dini liderlerin katılımıyla düzenlenen bir panelden, insanoğlunun faydası için gerekli önlemlerin alınması koşuluyla Venter'in araştırmasının etik olduğu görüşü çıktı. Venter izinle birlikte ABD Enerji Bakanlığında da, yaşam için gerekli asgari sayıda geni taşıyan tek hücreli bir organizma yaratmak üzere 3 milyon dolar destek alır.

Günümüz teknikleriyle temel kimyasal maddelerden bütünüyle yapay bir bakteri yapmak mümkün görünmüyor. Bunun yerine Venter ve ekibi; basit kimyasal molekülleri sentezleyerek oluşturacakları tamamen yapay bir kromozomu, DNA'sı çıkarılmış başka bir bakteriye aktarmayı planlıyor. Nobel ödüllü Hamilton Smith'de Venter'in ekibinde çalışmalara aktif olarak katılıyor. Smith, DNA moleküllerini kesip yapıştırmakta kullanılan restriksiyon enzimlerinin kaşiflerinden biri. Yapay bir kromozom sentezlemek için 500 bin bazdan oluşan DNA zincirleri sentezleyebilmek gerekiyor. Ancak Venter'in planın duyurduğu sırada 5 bin bazdan daha uzun DNA zinciri sentezlemek mümkün de-



ğildi. DNA sentezi sırasında birkaç bazın yanlış yerleşmesi olağan bir durum ancak zincirin uzunluğu arttıkça yanlış oranı da giderek artıyor ve sonunda istediğiniz diziyle ilgisi olmayan bir zinciriniz oluyor. Çalışan bir kromozom istiyorsanız hata oranının oldukça düşük olması gerek. Venter üç-dört yıl içinde ilk yapay yaşam örneğini sentezleyebileceğini açıkladığında bunu olası görünlerin sayısı pek fazla değildi. Yalnız iş yapay kromozomu sentezlemekle bitmiyor, bunu bir hücrenin içine nakledince ne olacağını şu anda kimse bilmiyor. Sentezlenmiş genom hücre içinde öylesine işlevsiz bir şekilde de kalabilir. Venter'in bu soruya cevabı bunu bilmenin yalnız bir tek yolu olduğu şeklinde; deneyip, görmek. Biyokimyacıların küçük gen takımlarını

hücreler içine sürekli soktuklarını ve her seferinde bakterilerin mutlu bir şekilde yeni proteinler üretmeye başladığını söyleyen Venter, aynı şeyin hazırlanan yapay genomla da olmasının onu hiç şaşırtmayacağını söylüyor.

2002 yılında ilk yapay kromozom sentezlendiği haberi ne var ki bilimsel kamuoyunda herkesçe sevinçle karşılanmadı. Araştırmacılar çocuk felci virüsünün genomundan oluşan ilk uzun DNA zincirinin kalıp kullanmadan kimyasal yollarla sentezlemişlerdi. New York Eyalet Üniversitesi'nden virolog Wimmer ve ekibi internetten indirdikleri çocuk felci virüsünün DNA diziliminden, kendilerine posta

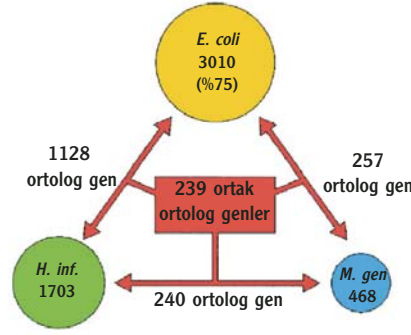
yoluyla ulaşan malzemeyle gerçek virüsler sentezlemeyi başarmıştı. İşin garibi bu haberden mutlu olmayanların en başında Venter geliyordu. ABD'de biyolojik silah korkusunun hat safhaya ulaştığı zamanlar da tehlikeli bir virüsün yeniden yaratılması fazla sevinçle karşılanmadı. Venter'de çalışmayı "sorumsuzca, kışkırtıcı ve bilimsellik sorumluluktan uzak" olarak değerlendirdi. Araştırmacılar virüsü kısa baz dizilerini ucuca ekleyerek ürettikleri tamamlayıcı DNA'dan [cDNA] RNA poli-

meraz enzimiyle tek zincirli RNA sentezleyerek üretmiş. Bulaşıcı biçimi RNA olan virüs hücrelere verildiğinde doğal bir virüs gibi çoğalıp, protein kılıf üretilip hücreden çıktıktan sonra diğer hücrelere bulaşmış. Fareler üzerinde yapılan deneyler yapay virüsün, doğal virüsle aynı hastalık belirtilerine yol açtığını kısacası doğalından farksız olduğunu göstermiş.

## Asgari Genom

Peki Venter'in sentezlemek için can attığı bu asgari genom nedir? Her şey 1995 yılında Venter'in başkanlığını yaptığı TIGR'nin (The Institute For Genomic Research) insan üriner kanalında yaşayan parazit bir bakteri olan

Mycoplasma genitalium'un genomunun dizilimini çıkarmasıyla başlar. Yalnızca 580.000 baz çiftinden (580 kb) oluşan M. genitalium'un genomunda yalnızca 517 gen vardı. Bu bir canlıdan bilinen en küçük gen sayıydı. Minik genomun ortaya çıkmasıyla akıllara bazı temel sorular geldi: "Acaba bir hücrenin canlılığını koruması için gerekli gen sayısı ne kadardı? Tüm canlılarda ortak asgari bir gen takımı var mıydı?" Bu sorular, tüm organizmaların asgari veya gereğinden daha fazla miktarda bir genetik malzemeye ortak olarak sahip olup olmadıklarına ilişkin bir tartışmanın başlamasına yol açtı. Bir canlının uygun koşullarda, canlılık için temel kabul edilen tüm işlevleri yerine getirmesini sağlayacak miktarda genetik bilginin bu asgari gen takımında bulunduğu ileri sürüldü: Bu, eğer varsa, yaşamın DNA üzerine yazılmış reçetesi idi. Günümüz canlıları "yaşamın zorunlu temel işlevlerine" ek ola-



Şekilde çemberler kabaca her bakterinin genom büyüklüğünü yansıtacak biçimde çizilmiştir.

rak tamamen uyumsal nedenlerle daha karmaşık ve lüks diyebileceğimiz metabolik yollara sahip. Evrimsel süreç içinde gerçekleşen, gen çiftlenmeleri [duplikasyon], yatay gen taşınması [lateral gen transferi] gibi olaylar canlıların genom büyüklüğünü artırmış, çevresel değişimlere karşı gen ifadesini düzenleyen kontrol mekanizmaları gelişmiş. Tüm bunlar canlıların yaşamını kolaylaştırıp, uyum yeteneğini ar-

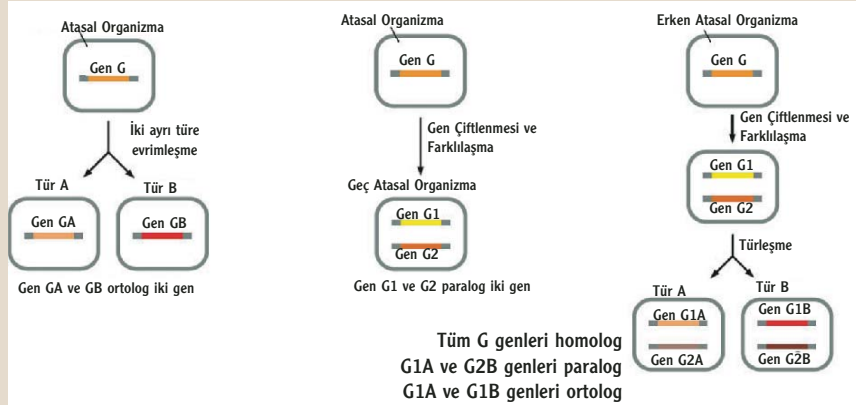
tır; onlara çok yönlü bir yaşam tarzı sağlar. Ancak, varlıkları zorunlu olmayan ve genomu şişiren bu fazladan genlerin elenmesiyle, bu asgari genoma yeniden ulaşılabileceği düşünüldü. Gerçi herkes aynı kanıda değil: Bazı bilim adamları yaşamın bir genler toplamından ibaret olmadığı düşüncesindeyken, önemli bir çoğunlukta tek bir asgari gen takımı diye bir şey olamayacağını, her ortamın koşullarına göre gerekli genlerin farklı olacağını dile getiriyor. Yine de bir grup bilim adamı, asgari gen takımını ortaya çıkarmak için araştırmalara çoktan başlamıştı.

Eğer varsa, asgari bir gen takımının yapay yaşam araştırmaları için neden önemli olduğunu Imperial College'dan Paul Davies şöyle anlatıyor: "Canlı bir hücre şaşırtıcı karmaşıklıkta, bilgiyi işleyen ve kopyalayan bir süper bilgisayar olarak düşünülebilir. DNA, yaşamın kaynağı olan özel bir molekül değil, sahip olduğu bilisi-

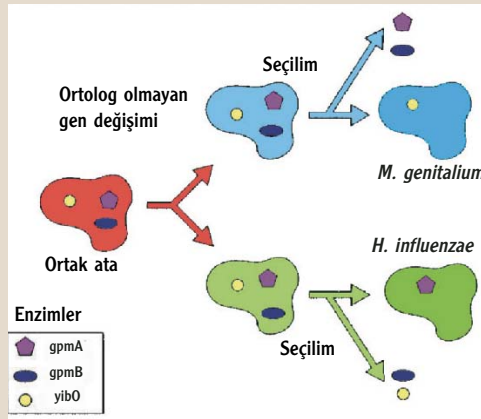
## Ortolog ve Paralog Genler ile Ortolog Olmayan Gen Değişimi

Homoloji, evrimsel analizin temel kavramlarından biridir ve ortak atadan köken alındığına işaret eder. Ortak atadan gelen DNA dizileri incelenirken homoloji kavramı birbirinden farklı iki kavramla karşılanır: Ortolog ve paralog genler. Ortolog iki gen, ortak atadan gelen iki organizmanın aynı işlevi gören genleri için kullanılır. Bu iki gen, kendilerini taşıyan organizmaları iki farklı türe evrimleştiren süreçlerin benzerleri tarafından değiştirilir; birbirinden farklılaştırılır. Ortolog iki gen arasındaki farklılık miktarı, bu iki organizmanın ortak atalarından ayrıldıkları zamanın uzunluğuyla da ilişkilidir. Ortolog genlerin belirlenmesi, organizmalar arası evrimsel ilişkilerin ortaya çıkarılmasında oldukça önemlidir. Diğer yandan paralog genler, aynı organizmada (genomda) bulunan aynı kökenden gelmiş ancak farklı işlevleri olan genleri tanımlar. Evrimsel süreç içerisinde zaman zaman meydana gelen çiftlenme [duplikasyon] denilen bir çeşit mutasyon, bir kromozom üzerinde bulunan bir genin bir kopyasını daha üretir. Artık o genom, aynı genin iki kopyasını taşıyordur. Ancak, evrimsel değişimin bir kromozom üzerindeki iki farklı yer üzerindeki etkisi bile farklıdır ve başlangıçta aynı işlevi yerine getiren bu genler, zamanla birbirinden farklılaşarak farklı işlevler kazanmaya başlarlar. Paralog genlerin oluşması organizmaların yeni genler kazanmalarında oldukça önemli bir yoldur.

Asgari gen takımı araştırmaları, aynı etkinliği gösteren proteinlerin ortolog olmaya- bilesini ortaya çıkardı. Uzun zamandır farklı enzimlerin aynı aktiviteyi gösterebildiği bilirse de bunun yaygınlığı hakkında fazla bir



bilgi yoktu. Ortolog olmayan gen değişimlerinin sıklığı bu araştırmalar sonucunda ortaya çıktı. Doksanlı yılların sonunda bakteriler ve arkeaların

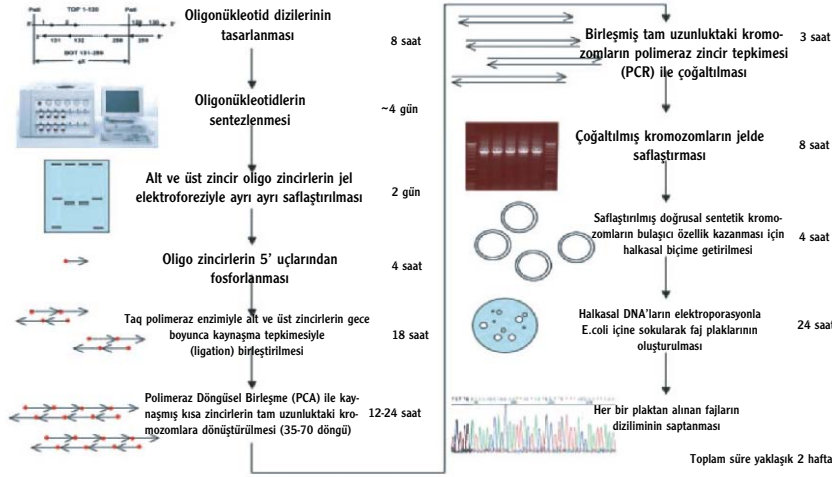


sitrik asit (Krebs) döngüsü enzimleri üzerinde yapılan bir araştırma, E. coli enzimlerinin %25'ten daha fazla bir bölümünün en az bir türde yer değiştirmeye uğradığı ya da en azından olmadığını göstermiş. Gen yer değiştirmelerine tüm enzim tiplerinde ve her biyolojik süreçte rastlanmıştır.

Koonin ve ekibi, H. influenzae, M. genitalium tüm genom dizilimini o zaman için bilinen E. coli genleriyle ortolog olan genleri bulmak için karşılaştırdıklarında %75'i bilinen E. coli genleri içinde H. influenzae'nın genlerinin %70'ine ait ortologlar bulunmuş. Filogenetik olarak çok daha uzak olan M. genitalium genlerinin de büyük bölümünün (her üç bakteri için ortak bir gen takımı dahil) H. influenzae ve E. coli genleri arasında ortologları vardı.

Ortologlar her üç genomda kodlanan protein dizileri karşılaştırılarak belirlenmiş.

## øX174'ün Kimyasal Yolla Sentezlenmesi



**Kaynaşma tepkimesi:** øX genomunun birleştirilmesinin ilk aşaması. Hassas şekilde tasarlanmış kısa (oligo) zincirler, koşulların dikkatli bir şekilde ayarlandığı tepkime ortamına tamamlayıcı zincirlerin kendiliğinden birbirini bulup bağlanması için bırakılır. Alt ve üst zincirler tamamlayıcı kısımlarından yapbozu andırır biçimde birleştiğinde Taq polimeraz enzimi zincirleri fosforlanmış uçlarından birbirine bağlayarak kesintisiz zincirlerin boyunu uzatır.

**Polimeraz Döngüsel Birleşme (PCA):** PCR tepkimesine benzeyen PCA döngüsel olarak değişen sıcaklıkla birlikte karşılıklı tamamlayıcı DNA zincirlerinin birbirinden ayrılıp yeniden birleşmesi esasına da-

yanıyor. Ancak PCR'dan farklı olarak ortamda bir çift öncü (primer) molekül bol miktarda bulunmuyor. Her döngüde DNA zincirleri birbirinden ayrılıyor ve tamamlayıcı DNA dizileri tekrar birleşiyor. Eğer yeniden birleşen 3' uçları karşı zinciri kalıp olarak kullanıp uzayacak durumdaysa polimeraz enzimleri tarafından yeni bazların eklenmesiyle uzatılarak, zincirlerin tamamlayıcı karşı zincirin bulunmayan kısımları sentezlenir. Tepkime DNA zincirleri tamamlanmaya ya da daha fazla uzayamayınca kadar her döngü boyunca devam eder. PCA tepkimesinin DNA miktarını artırmadığına dikkat edilmeli. Venter'in ekibinin bu araştırma için geliştirdiği bu tekniğin kinetiği henüz tam anlaşılmamış.

matematiksel bir kod kullanarak aktaran bir genetik veri bankasıdır. Hücrenin işlevlerinin pek çoğu, maddesel olan donanım düzeyinde değil, bilişim düzeyinde anlaşılabilir. Kimyasal maddeleri bir tüpün içinde karıştırarak yaşam elde etmeye çalışmak, kablo ve düğmeleri lehimleyerek Windows 98 elde etmeye benzer: İşe yaramaz, çünkü soruna yanlış kavramsal düzeyde yaklaşılmıştır." Bir canlıya ait asgari gen takımını belirlemek; hücreyi oluşturacak yapısal molekülleri üretmek üzere gerekli enzimlerin bilgisini, enerji akışının hangi ana metabolik yoldan hangi enzimlerle sağlandığını, hücre bölünmesi için DNA'yı uygun biçimde kopyalayacak enzimleri bilgisini vb. belirlemek Davies'in sözünü ettiği işletim sisteminin kodlarını çözmemiz anlamına geliyor.

Yaşam için gerekli olan asgari genom büyüklüğünü tahmine yönelik ilk çalışmalar 1990'lı yılların ortalarında başladı. Bakterilerin, bazı genlerinin içine kısa DNA dizileri sokularak işlevsiz hale getirilmesine tolerans

gösterebilirler, bazı gen bölgelerinin işlevini yitirmesine karşı son derece dayanıksız oldukları, mutasyonların doğasını anlamak üzere yapılan çalışmalardan bu yana biliniyordu. Bazı genlerin işlevsiz hale gelmesi, sentezlenmeyen ürünün bakterinin üreme ortamına konmasıyla telafi edilse de, "vazgeçilmez genler" olarak adlandırılan bir grup genin işlevini yitirmesi, her koşulda bakterinin ölümüyle sonuçlanıyordu. Bakterilere ihtiyaç duydukları hemen her maddeyi sağlayan son derece zengin bir besin ve uygun fiziksel koşulların sağlandığı bir or-

tamdaki vazgeçilmez genlerin listesi bize asgari genomu verecektir. Bu amaca yönelik ilk çalışmalar, rastgele seçilen gen bölgelerinin mutasyonlarla işlevsiz hale getirilmesi ve elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesine dayanıyordu. Bacillus subtilis'in tüm genom diziliminin bilinmediği yıllarda, bakterinin 79 gen bölgesi üzerinde yapılan ilk çalışma, bu canlı için asgari genom büyüklüğünün 318-562 kb olması gerektiği ortaya koydu. Bu büyüklük, 580 kb'lık M. genitalium'un genom büyüklüğünün biraz altındaydı.

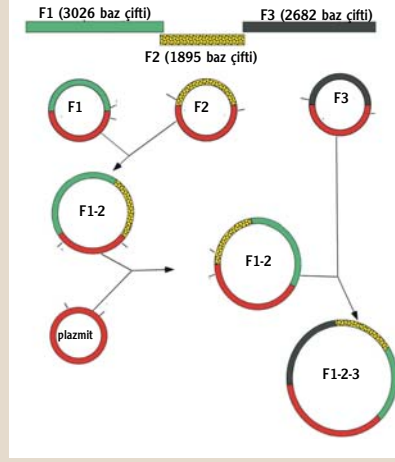
## Karşılaştırmalı, Teorik, Evrimsel Genomik

Asgari gen takımını tanımlamaya yönelik ilk genom-sonrası çalışma, ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü'nden Eugene Koonin ve ekibi tarafından, tüm genom dizilimleri ortaya çıkarılan ilk iki organizma olan Haemophilus influenzae ve Mycoplasma genitalium bakterileri üzerinde yapıldı. Çalışma iki bakterinin gen dizilerinin karşılaştırılması, evrimsel geçmişlerinin incelenmesine dayanıyordu. 468 protein kodlayan geniyle M. genitalium bilinen en az sayıda gene sahip canlıdır ama bu genlerin de bir kısmı vazgeçilebilirler arasındaydı. Bu bir avuç genin ne kadarının gerçekten vazgeçilmez olduğunu belirlemek için araştırmacılar H. influenzae'nin genomuyla, M. genitalium'un genomunun ürettiği tüm proteinleri birbiriyle karşılaştırdılar. Sırasıyla biri Gram pozitif, diğeri Gram negatif olan bu iki bakterinin son ortak ataları 1.5 milyar yıl önce yaşamış, dahası her ikisi de parazit olan bu canlılar bir dizi gen ayıklanması geçirecek genomlarını küçültmüşlerdi. Araştırmacılar her iki bakteri-



## Çocuk Felci Virüsü (PV1(M)) cDNA'sının Oluşturulma Stratejisi

7500 bazdan (nükleotidden) oluşan virüs genomunu sentezlemeye, ticari olarak satılan ortalama 69 baz uzunluğunda uçları birbirini tamamlayıcısı olan saf, artı ve eksi kutuplu oligonükleotid zincirlerinin birleştirilmesiyle başlandı. Bir DNA ikili sarmalının yalnızca bir zinciri protein sentezinde kullanılır, diğer zincir ise onun tamamlayıcısı olarak görev yapar. Bu zincirlerden protein sentezi için kullanılmalı artı kutuplu, diğeri eksi kutuplu olarak tanımlanır. Birbirlerinin tamamlayıcısı olan bu kısa zincirlerin birleştirilmesiyle ortalama uzunluğu 400-600 baz çifti (bç) olan ve yine yapışkan uçlar taşıyan zincirler elde edildi. Bu DNA parçaları da üç farklı plazmit içine yerleştirilecek üç büyük DNA dizisi elde etmek üzere birleştirildi. Halkasal DNA molekülleri olan plazmitler, bakteriler içinde kendi kendilerini kopyalayarak çoğaltabilen, bakteri kromozomlarına göre daha küçük işlevsel DNA'lardır. Genetik mühendisliğinde DNA'yı sonradan tekrar birleşebilecek şekilde kesebilen enzimlerle-restriksion enzimleri- yeniden biçimlendirilmiş DNA parçalarını hücrelere sokmak için kullanılır. Wimmer'de küçük DNA zincirlerini uç uca ekleyerek elde ettiği normal yollarla sentezlenemeyecek uzunluktaki üç DNA parçasının her birini önce bir plazmit içine yerleştirmiş. Daha sonra bu plazmitleri teker teker enzimler-



le kesip birbirine yapıştırarak sonunda tek bir plazmit içinde PV1 virüsünün genomunu oluşturmak üzere birleştirmiş. Ancak PV1 virüsünün DNA'dan değil RNA'dan oluşan genomu, tamamlayıcı zincirden (cDNA) virüs RNA'sının sentezlemesiyle bulaşıcı biçimine getirilmiş. DNA diziliminde hatlarının olmaması için ince elenip sık dokunması ve her bir DNA zincirinin nereye nasıl yerleştirileceğinin dikkatlice hesaplanmasının gerektiği bu çalışma yaklaşık 3 yıl sürmüştü.

de de ortolog, yani genomlardaki iki farklı genin aynı kökenden gelip aynı işi yapan genlerin, asgari gen takımında büyük olasılıkla bulunmaları gerektiği görüşünden yola çıkmışlar. Koninin her iki bakteride ortolog olan 240 gen belirlemiş. Ancak "ortolog olmayan gen değişimi" nedeniyle bu sayı, tam olarak asgari gen takımına karşılık gelmiyor. Ekip, ortolog olmayan, ancak vazgeçilmez işlevlere ait 22 gen daha tanımlamış. Bunlardan parazit yaşamla ilgili olduğu belirlenen 6 genin sonradan elenmesiyle: Çağdaş hücresel yaşama ait asgari gen takımının 256 (yaklaşık 260) genden oluşması gerektiği sonucuna ulaşılmış. Bu sonuç, daha önceden B. subtilis'e yapılan çalışmayla da uyumlu.

### Venter İş Başında

1999 yılında Craig Venter asgari gen takımını belirlemek üzere o zamana kadar yapılan en kapsamlı deneysel çalışmayı yayınladı. Venter araştırmasında M. genitalium ve onun yakın akrabası Mycoplasma pneumoniae'yi kullandı. 580 kb'lık M. genitalium genomunun 517 geninden protein şifre-

leyenleri sayısı, yentilerinin bulunmasıyla 480'e ulaştı. Bakterinin bilinen en yakın akrabası olan M. pneumoniae'yle genomlarının karşılaştırılmasıyla, M. pneumoniae'nin her bir M. genitalium geni için bir ortolog taşıdığı ve bunlara ek olarak 197 tane de fazladan gen taşıdığını gösterdi. İki türün ortolog genleri arasında amino asit dizi ortaklığının yaklaşık yalnızca %65 olması önemli boyutta bir evrimsel uzaklığa işaret ediyor. Bu durum Venter'e iki organizma tarafından paylaşılan ve M. genitalium'un protein kodlayan genlerinin toplamına eşit olan 480 genin, asgari gen takımına yakınlığını test etme olanağı sağladı. Venter, transpozon [yer değiştirici genetik elementler] denen ve DNA dizilimi bilinen kısa DNA parçalarını bakterilerin genleri içine sokarak, mutasyona uğrattığı genleri işlevsiz hale getirdi. Mutasyona uğradığı halde hayatta kalmayı başaran bakteri kolonileri, mutasyonu taşıdığı genin vazgeçilebilir olduğunu gösterecekti. Yaşayan M. genitalium kolonilerinde 140 farklı gende, M. pneumoniae kolonilerinde de 179 farklı gende transpozon olduğu belirlendi.

M. pneumoniae'ye özel mutasyon bölgelerinin ortalama yoğunluğunun her iki tür için de ortak olan bölgelerin yoğunluğunun 5.5 katı olması, bu türe ait fazladan tüm genlerin vazgeçilebilir olduğu görüşünü destekliyor. Türe özgü mutasyon bölgelerine ek olarak gözlenen mutasyonların büyük bölümü, her iki tür için de ortak olan bölgelere dağılıyor. Tüm genom dizilimi saptanmış üçüncü mikoplazma olan Ureaplasma urealyticum'la M. genitalium da belirlenen gereksiz genlerin karşılaştırılması ve bunların büyük çoğunluğunun Ureaplasma urealyticum'da bulunamaması, genlerin gereksizliğini destekliyor.

M. genitalium'un tüm vazgeçilebilir genlerini hesaplamak için, her iki türe ait birikmiş genom bilgileri değerlendirildi ve vazgeçilebilir genlerin sayısının yaklaşık 180-215 arasında olması gerektiği bulundu. Bu, M. genitalium için vazgeçilmez protein kodlayan gen sayısının 265-350 arasında olduğu anlamına geliyor. Venter'in deneyi sırasında transpozon mutasyonu ile işlevini kaybetmemiş 351 genin 111 tanesinin işlevinin bilinmemesi, deneyin en can alıcı sonuçlarından biri oldu. Her ne kadar mutasyon taşımayan genlerin tamamının vazgeçilmez genler olduğu söylemek mümkün olmasa da, büyük bir kısmının gerekli olduğunu söyleyebiliriz. Bilinen en basit hücresel yaşam biçiminin, hücresel işlevler için gerekli genlerinin önemli bir bölümünün işlevinin bilinmemesi, hücresel yaşam için gerekli temel moleküler mekanizmaların tamamının henüz aydınlatılmamış olduğunu gösteriyordu.

Venter deneyini anlattığı makalenin sonunda, gazete manşetlerine de yansıtacak arzusunun dile getirir: "Gerekli gen takımı asgari genomla aynı şey değil, vazgeçilebilir gibi gözükken bir gen başka koşullar altında vazgeçilmez de olabilir. Burada sunulan veriler asgari genoma sahip bir hücreyi laboratuvar ortamında inşa etmek için gerekli ilk deneyler için ip uçları veriyor. Kendini kopyalayan yaşam için gerekli asgari genomu belirlemenin bir yolu takip çıkarılabilir, yapay bir kromozom yapıp test etmekten geçiyor. Bu, etik değerlendirme için beklenen bir deney."

Venter'in mikoplazması, bilinen en az sayıda gene sahip canlı olsa da hak-

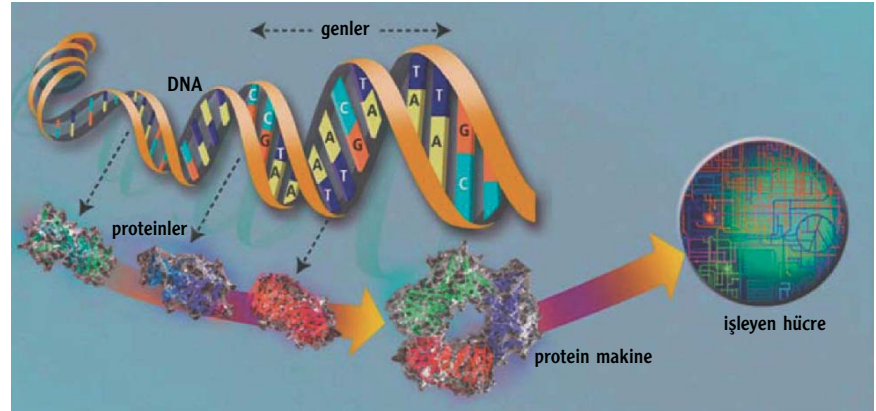
kında yeterli bilgiye sahip olmadığı-mız bir organizmaydı. Bu yüzden bakterinin vazgeçilmez genlerin üçte birinin işlevinin bilinmemesi hücre biyolojisindeki bilgisizliğimizden daha çok mikoplazmalar hakkındaki bilgisizliğimize yormak daha doğru olur. Venter'in ekibi bu bilinmeyen 100 kadar geni araştırırdı, başka araştırmacılar, laboratuvarların daha aşına olduğu iki bakterinin Escherichia coli ve Bacillus subtilis'in vazgeçilmez genlerinin listesini çıkarmak üzere çalışmalara başladı. Bu bakteriler hakkında her ne kadar çok daha fazla şey bilirse ve üretilmeleri mikoplazmalara göre çok daha kolay da olsa, çok fazla sayıda gen taşıdıkları için araştırmacılara acı dolu gün ve geceler yaşattıkları kesin. Her iki bakteri üzerinde ki araştırmada 2003 yılı içinde tamamlandı. Fransa Ulusal Tarım Enstitüsü'nden Dusko Ehrlich ve 96 uluslararası katılımcının B. subtilis'in 4100 geninin her birini tek tek işlevsiz hale getirdikleri araştırma sonucu bunlardan yalnızca 271'nin vazgeçilmez olduğunu buldu. Bu sonuç Venter'in bulgularıyla uyuyor. Ancak, iyi tanınan bakterinin vazgeçilmez genleri içinde işlevi bilinmeyenlerin sayısı bir düzine kadar. E. coli'yle yürütülen çalışma sonucu ise toplam 3126 gen içinden 620'sinin vazgeçilmez olduğu görülmüş.

Farklı organizmalar üzerinde de benzeri çalışmalar sürüyor. Aşgari gen takımı çalışmaları henüz kesin sonuçlar vermekten uzak; ancak, Venter'in deendiği yapay kromozomları sentezleyip, denemek için gerekli temeli hazırlıyor.

## Yokuş Yukarı

Venter'in yapay yaşam üretme yaklaşımı "tepeden aşağı" [top down] bir yöntem, karmaşık ve büyük olandan daha basit ve küçük bir biçim üretmeye dayanıyor. Ancak gerçek anlamda yapı taşlarından bir canlı sentezlemeye çalışanlardan var. Bu yokuş yukarı [bottom up] tekniğin kullanımı henüz emekleme aşamasında ancak tatmin edici sonuçlar alınmaya başlandı bile.

Her ne kadar yaşamın tanımı tartışmalı da olsa, kendini sürekli yenileyip, kopyalayabilen ve evrimleşme potansiyeline sahip küçük bir alanda toplan-



mış moleküler bileşimlerin canlı kabul edilmesi gerektiği genel kabul görüyor. Kendini yenilemek ve kopyalamak, çevreden alınan molekül ve enerjinin hücresel biçimlere dönüştürülmesini, evrimleşebilme de hücresel süreçlerde kalıtılabilir çeşitliliğin varlığını gerektirir. Bu özellikleri taşıyan moleküler yapılar oluşturmanın en kolay yolunun DNA, RNA gibi bilişim polimerlerinin ve hücresel bileşenleri kimyasal olarak üreten ve düzenleyen metabolik sistemlerin lipit kesecikler gibi kapalı fiziksel hacimlerde toplamak olduğunda görüş birliği var.

Biri ABD'deki Los Alamos Ulusal Laboratuvarı'nda (LANL), diğeri 7. Avrupa Yapay Yaşam Konferansında düzenlenen iki çalıştayda yapay hücrelerin kimyasal olarak inşa edilmesine yönelik yapılan çalışmalar değerlendirildi. Yaşamı yapı taşlarında yeniden yaratmaya yönelik çalışmaların çoğunluğu kendini kopyalayabilen lipit kesecikler tasarlamaya yoğunlaşmış. İçinde kalıp kullanarak kendini kopyalayabilen RNA moleküllerinin bulunduğu lipit kesecikler, kesecik yüzeyinin amino asitlerden protein üretiminde katalizör olarak kullanıldığı sistemler şimdiki değin üretimi başarılı sistemler arasında. Yapay hücre araştırmalarında farklı kimyasal sistemlerin başarılı biçimde kaynaştırılabilmesi en zorlayıcı sorunlardan biri. LANL'dan Steen Rasmussen ve ABD Argonne Ulusal Laboratuvarı'ndan Liaohai Chen'in birlikte tasarladıkları ilkin hücre genetik, metabolizma ve kapsayıcı moleküllerin tek bir kimyasal sistemde birleştirilebildiği ilk açık örnek. Chen-Rasmussen ilkin hücresinde, lipitlerden oluşan kapsayıcı moleküllerin dış yüzeylerine PNA molekülleri bağlı. PNA nükleotidlerin şeker-fosfat

bağı yerine, yalancı peptid bağlarıyla birbirine bağlandığı DNA analogu bir molekül. PNA'ların hem bilişim molekülü hem de elektron taşıyıcı olarak görev yaptığı sistem, ışık enerjisi kullanılarak lipit ve PNA molekülleri üreten bir metabolizmaya sahip. Sistemin lipit üretebildiği deneysel olarak ispatlanmış ancak diğer özelliklerin deneysel olarak kanıtlanması henüz başılamamış.

Yapay hücre araştırmaları yaşamın doğası ve kökeni sorunlarına cevap bulmamıza yardım edecek, diğer yandan bu araştırmaların kendini yenileyebilen ve kopyalayabilen nano-makineler gibi önemli teknolojik gelişmelere de yol açacak. Var olan organizmalardan farklı genetik ve metabolik özelliklere sahip nano-makineler gerçek anlamıyla yaşayan bir teknoloji, ancak çok güçlü yeteneklere sahip olmasının yanı sıra önemli sosyal ve ahlaki etkileri de olacak. Çalıştay katılımcılarının tümü eninde sonunda yapay hücrelerin üretileceği konusunda hemfikir ancak bunun ne zaman başarılabileceği konusunda bir fikir birliği yok.

Murat Gülsaçan

### Kaynaklar

- Venter C.J. et al., Generating a Synthetic genome by whole genome assembly: øX174 bacteriophage from synthetic oligonucleotids, PNAS, December 23 2003, vol 100 no.26
- Osterman A.L. et al., Experimental Determination and System Level Analysis of Essential Genes in Escherichia coli MG1655, Journal of Bacteriology, Oct. 2003, p 5673-5684
- Konin E.V., Mushegian A. R., 1996 Complete genome sequences of cellular life forms: glimpses of the theoretical evolutionary genomics
- The minimal genom concept 1999, Arcady Mushegian
- The search for essential genes Reich K. A., 2000
- Bedau M.A., Artificial Life: organization, adaptation and complexity from the bottom up, TRENDS in Cognitive Sciences, Vol.7 No.11 November 2003
- Wimmer E. et al., Chemical Synthesis of Poliovirus cDNA: Generation of Infectious Virus in the Absence of Natural Template, Science, Vol. 297, 9 August 2002
- Bernhard Palson, Tinker, Tailor: Can Venter Stitch Together a Genome From Scratch? Science, Vol 299 14 February 2003
- Rasmussen S. et al., Transitions from NonLiving to Living Matter, Science, Vol 303, 13 February 2004