## Rekombinasyonun Tespit Edilmesi

DNA parçalarının fiziksel değişimini tespit edebilmek için; rekombinasyon sonucu oluşan hücrelerin, fenotipik olarak atasal hücrelerden farklı olması gereklidir. Mikroorganizmaların kullanıldığı durumlarda ise, çoğu zaman, rekombinant hücrelerde tanımlanan ancak alıcı hücrede bulunmayan seçici özellikler göz önünde bulundurulur. Örneğin; atasal hücrelerin (alıcı ve verici hücreler) gelişemediği ancak rekombinantların gelişme özelliği gösterdiği gelişme ortamları bu durumda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bakterilerde antibiyotik dirençlilik ya da besin istekleri gibi çeşitli seçici ve seçici olmayan marker özellikler bulunmaktadır. Rekombinant koloni seçim işleminde; uygun seçim kriterleri uygulanması durumunda, tek bir petri plağına 108 veya daha fazla bakteri hücre ekimi yapılabilir. Burada, ortamdaki çok miktarda atasal hücreler koloni oluşturamaz ve dolayısı ile az sayıdaki rekombinant hücreye ait koloniler tek tek belirlenebilir. Böyle bir durumda ters mutasyon oranı düşük olduğu için yanılgı doğal olarak minimize edilir. Seçim çok etkin olduğundan ve çaprazlamalar milyarlarca hücre kullanılarak yapıldığından, rekombinasyonel analizler hem prokaryotik ve hem de ökaryotik mikrobiyel genetikte büyük önem taşımaktadır.

## Komplementasyon (tamamlama) Testi

İki mutant hücre çaprazlandığında, her ikisi de aynı baz çiftlerinde mutasyon içermiyorsa, homolog rekombinasyon yolu ile doğal tip rekombinantlar meydana gelebilir. Yani, iki Trp- *E. coli* hücresi (gelişme için ortamda triptofana ihtiyaç duyan) eşleştirildiğinde Trp+ rekombinantlar elde ediliyorsa, iki hücredeki mutasyonların aynı baz çiftlerinde olmadığı söylenebilir. Ancak bu deney ile mutasyonların aynı gen içinde olup olmadığı tespit edilememektedir. Komplementasyon testi ilk olarak diploid ökaryotik organizmalarda kullanılmıştır. Bilindiği gibi, diploid organizmalarda hücre, her iki ebeveynden gelen homolog kromozom çiftleri içerir. Eğer iki mutasyon kromozom çiftinin iki üyesinde ayrı ayrı meydana gelir ise trans konfigürasyon, iki mutasyon aynı kromozom üzerinde ise cis konfigürasyon olarak adlandırılır. Bu tür bir diploit durum prokaryotlarda mevcut değildir. Ancak prokaryotlarda komplementasyon testleri için kullanılacak diploid bir durum; bir vericiden gelen bir DNA fragmentinin, alıcı kromozomun bir bölgesi için eşleşmesi esnasında söz konusu olabilmektedir. Prokaryotlarda da komplementasyon testinin prensibi ve adlandırma (**cis** ve **trans**), ökaryotlardakinin aynısıdır.

Belirli bir prokaryot hücrede mutasyon sonucu, Trp- fenotipe neden olacak şekilde triptofan genlerinden biri inaktive edilirse ve daha sonra başka bir kaynaktan doğal tip genin bir kopyası hücreye sokulursa, kısmi diploid hücre oluşumu sonucu doğal tip fenotip tekrar meydana gelir. Ancak bu durum ökaryotlarda, mutasyonun dominant olmadığı hallerde geçerlidir. Böyle bir mutasyonun tamamlayıcı olduğu söylenebilir. Prokaryotlarda, ökaryotlara nazaran oldukça küçük kromozomal bir fragment, genellikle çok sayıda geni taşıyabilmektedir. Örneğin; triptofan biyosentezi için gereken genler bir operon (tek bir promotordan transkribe edilen birden fazla gen) oluşturmaktadır. Bu durum da belirli bir kromozomal fagment aracılığı tüm operon genlerinin transferini mümkün kılmaktadır. Alıcı hücre operonundaki bir gende bulunan mutasyon yanında, verici hücreden gelen operonda da farklı bir gende bir mutasyon söz konusu ise; DNA fragmentleri arasında gerçekleşen homolog bölge rekombinasyonu sonucu bu iki mutasyon birbirini maskeler. Yani, iki mutasyonun birbirini tamamlaması (komplementasyon) söz konusu olur. Şekil 34’de bu durum görülmektedir. Genler, hücre stoplazmasında diffüze olan proteinler ürettikleri için mutasyonlar tamamlayıcı olabilmektedir (yani yani iki mutantın çaprazlanması ile doğal tip fenotip elde edilebilmektedir). Yalnız promotor’lar gibi regülatör bölgelerde meydana gelen mutasyonlar tamamlanamaz. Çünkü bu genler DNA düzeyinde fonksiyoneldir. Ökaryotik organizmalarda tamamlama için rekombinasyona ihtiyaç yoktur. Bu durumda testi yapabilmek için, mutasyonların trans pozisyonda olması zorunludur. Eğer mutasyonlar bir kromozom üzerinde meydana gelir ve diğer kromozom doğal halini korur ise, her iki mutasyonun da dominant olmadığı ortaya çıkar. Bu nedenle **cis** pozisyondaki mutasyonlar kontrol olarak kullanılır.



Şekil 34. Komplementasyon (tamamlama) testi.

Bu tip komplementasyon testi cis-trans testi olarak adlandırılmakta ve iki mutasyonun aynı genetik (fonksiyonel) birimde olup olmadığının tespitinde kullanılmaktadır. **Cis-trans** testi ile tanımlanan genetik ünite **sistron** (bir gene denk gelen terim) olarak adlandırılabilmektedir. Önceden belirtildiği gibi aynı sistron üzerindeki iki mutasyon birbirini tamamlayamaz. Komplementasyonun meydana geldiğinin saptanması, mutasyonların farklı sistronlar (değişik genler) üzerinde bulunduğunun ifadesidir. Yukarıda açıklanan anlamı nedeniyle; bir mRNA molekülünün taşıdığı genetik bilginin, tek bir gene (monosistronik) veya birden fazla gene (polisistronik) ait olduğunu ifade etmek için de sistron (cistron) teriminden yararlanılmaktadır.

**C) DNA Kazanımı**

Bir genomda meydana gelen iç sekans düzenlemeleri; yukarıda izah edilen iki rekombinasyon yöntemine (homolog ve bölge-spesifik rekombinasyonlar) ilave olarak, bir başka organizmanın genomundan bir DNA parçasının alımı ile de gerçekleşebilir. Bu (verici) organizmanın, alıcı bakteri ile az ya da çok akrabalık ilişkisi bulunur. Verici hücre genomundan verici DNA’nın hareketi, çoğu zaman viral ya da plazmid vektörler aracılığı ile olur. Bu transfer tipi horizantal ya da lateral gen transferi olarak adlandırılır (yatay gen transferi). Horizantal gen transferinde; transformasyon, bakteriyel konjugasyon ve faj ortamlı transdüksiyon olmak üzere başlıca üç mekanizma rol oynamaktadır. DNA kazanımı stratejisinde, verici hücre genomundan genlerin hareketi ve alıcı hücre genomuna entegrasyonunda hareketli DNA elementleri ana rolü oynamaktadır. Ancak burada diğer bir rekombinasyon süreci de devreye girer. DNA kazanımı, çok sayıda doğal limitleyicinin (kısıtlayıcının) etkisi altındadır. Bu sayede, alıcı bakteri hem yeni biyolojik fonksiyonlar kazanır hem de genetik stabilitesini korur. Bu durum evrim stratejisi için çok önemli bir noktadır.

**C-1 Transformasyon**

Genetik transformasyon, serbest DNA molekülünün alıcı hücreye alınmasıyla genetik değişimin meydana geldiği bir süreçtir. Bakterilerde genetik transformasyonun keşfi ile canlılarda DNA’ nın genetik materyal olduğuna dair ilk delilelde edilmiştir. Gram pozitif ve Gram negatif bakteriler ile Arke’ lerin (*Archaea*) bazı türlerinin doğal olarak transformasyon yapabilme yeteneğinde olduğu bulunmuştur. Ancak transforme olabilir tanımı yapılan cinsler içerisinde, sadece bazı suşlar veya türlerde transformasyon gerçekleşebilmektedir. Prokaryotlarda DNA, hücre içinde büyük bir molekül olarak bulunmakta ve hücre parçalandığında ortama dağılmaktadır. Ekstrem uzunluğu nedeni ile DNA (*B. subtilis*’te 1700 μm) kolayca kırılabilmektedir. *B. subtilis*’in 4.2 megabaz çifti (4.2 milyon baz çifti) uzunluğundaki kromozomu dikkatlice ekstrakte edilmeye çalışılsa da molekül yaklaşık 15 kilobaz çiftlik (15 bin baz çifti) fragmentler halinde kırılmıştır. DNA’da 1 gen yaklaşık 1000 nukleotidden oluştuğu için bu fragmentlerde de ~15 gen bulunmaktadır.

## Competence (Kompetent Özellik)

DNA moleküllerinin transformasyonunu gerçekleştirebilen hücreler, kompetent olarak tanımlanmaktadır. Kompetent özellik kalıtsaldır ve yalnız bazı suşlarda gözlenebilmektedir. Bakterilerde bu yeteneğin regülasyonel kontrol altında olduğu belirlenmiştir. Doğal transformasyon yeteneği içeren bakterilerde DNA’nın alımı ve işlenmesi sürecinde özel proteinlerin görev aldığı saptanmıştır. Bu kompetent-spesifik proteinler, membranla ilişkili bir DNA bağlanma proteini, hücre duvarı otolisini ve çeşitli nukleazlar içermektedir. *Bacillus subtilis*’te doğal kompetent mekanizma; iki-elemanlı regülatörler ile kontrol edilen quorum-sensing sisteminin (kompetent hücre sayısını kontrol eden sistemin) bir parçasıdır. Hücreler gelişme sırasında küçük bir peptit üretip, salgılamakta ve bu peptidin yüksek konsantrasyonlarda bulunması halinde de kompetent hale geçmektedir. *Bacillus subtilis*’te söz konusu peptitin üretilmesinde sensör görevi yapan proteinin ComA, regülatör görevi yapan proteinin ise ComP olduğu saptanmıştır. Bu Sistem sayesinde *Bacillus* cinsinde 1–2 saat içerisinde %20 oranında, *Streptococcus* cinsinde ise birkaç dakika içerisinde %100 oranında hücrenin kompetent hale geçebildiği saptanmıştır.

## DNA’nın Hücre İçine Alımı

DNA’nın hücre içine alınması işlemi bakteriden bakteriye farklılık göstermektedir. Gram negatif *Haemophilus* cinsinde, sadece tek zincir DNA parçaları genetik rekombinasyon yolu ile genoma entegre olmasına rağmen, DNA hücreye çift zincir formunda alınmaktadır. Gram pozitif olan *Streptococcus* ve *Bacillus* cinslerinde ise; komplementer (tamamlayıcı) DNA zinciri enzimatik yıkıma uğratıldıktan sonra, tek zincir DNA halinde hücre içine alınmaktadır. Ancak hücrelerin genellikle çift zincir DNA moleküllerine daha etkin olarak bağlandığı bilinmektedir.

Transformasyonun başlangıcında DNA molekülü kompetent bakteriye geri dönüşümlü olarak bağlanmakta ve daha sonra sonra bu bağlanma geri dönüşümsüz hale gelmektedir. Kompetent hücreler, kompetent olmayanlara oranla daha fazla miktarda DNA molekülüne bağlama yeteneğindedir. Genoma ait kırık DNA parçaları hücre içine alınırkenbir kez daha yıkıma uğratılmaktadır. Örneğin; *Streptococcus* *pneumoniae*’da her hücre yaklaşık 10 adet 15–20 kb büyüklükte çift zincir DNA molekülüne bağlanabilmektedir. Ancak alım sırasında bunlar yaklaşık 8 kb’lık tek zincir parçalara dönüştürülmektedir. Transforme edilecek DNA fragmentlerinin ortamda yüksek konsantrasyonlarda bulunması halinde, birbiri ile yarışan fragmentler sistemi doygun hale getirir. Bu durumda populasyondaki tüm hücreleri transforme etmek mümkün değildir. Bugüne kadar elde edilen en yüksek transformasyon frekansı % 20’dir. Genelde elde edilen değerler ise % 0,1–1 arasındadır. Transformant oluşumunun tespit edilebildiği en düşük DNA konsantrasyonu yaklaşık 0.00001 μg/mL (1x10-5 μg/mL) dir.

*Haemophilus influenza’*nın, yabancı DNA molekülüne geri dönüşümsüz bağlanma gösterebilmesi ve söz konusu DNA’yı hücre içine alabilmesi için, 11 baz çifti uzunlukta belirli bir DNA serisine gereksinimi olduğu saptanmıştır. Bu seri *Haemophilus* kromozomunda yüksek sıklıkta bulunmaktadır. Bazı bakterilerin doğal ortamlarında kompetent hale gelebilmeleri, transformasyonun doğal gen transferinde önemli bir rol oynadığını kanıtlamaktadır.

## Transforme Olan DNA’nın Kromozoma Entegrasyonu

Hücreye alınacak DNA, DNA bağlanma proteini yardımı ile hücre yüzeyine tutunmaktadır. Daha sonra da bu DNA, çift zincir halinde veya bir nukleaz tarafından bir zinciri yıkıma uğratıldıktan sonra tek-zincir halinde hücreye alınmaktadır (Şekil 78). Hücre içine alımdan kromozoma ulaşana kadar, yabancı DNA bir kompetent-spesifik proteinle birleşmektedir. Bu protein muhtemelen alınan fragmenti nukleazlardan koruma görevi görmektedir. Kromozoma ulaşınca ise görevi RecA proteini devralmakta ve DNA rekombinasyonel süreçlerde alıcı hücre genomuna bağlanmaktadır (entegre olmaktadır) (Şekil 35).

 

## Şekil 35. Transforme olan DNA nın entegrasyonı

## Transfeksiyon

Bakteri hücresinden değil de bakteriyel bir virüsten ekstrakte edilmiş bir DNA molekülü ile bakterilerin transforme edilme süreci tranfeksiyon olarak adlandırılmaktadır. Eğer DNA litik bir bakteriyofaja ait ise, transfeksiyon normal virüs üretimine neden olmakta ve standart faj plak oluşumu testi ile ölçülebilmektedir. Transfeksiyonda aktarılan faj DNA’nın gerek küçük oluşu ve gerekse kromozomal DNA’e genellikle özel bölgelerden bağlanma yeteneği içermesi, çoğu kez homojen DNA populasyonu oluşumuna yol açmaktadır. Söz konusu avantajları nedeni ile transfeksiyon; transformasyon ve rekombinasyon mekanizmalarının detaylarının araştırılmasında kullanılmaktadır. Diğer yandan, konvansiyonel transformasyonda, transforme olan DNA genellikle farklı uzunluklardadır ve kromozomal DNA moleküllerine rastgele bağlanır. Bu durum rekombinant analiz çalışmalarında karmaşık deneylerin düzenlenmesi zorunluluğunu doğurur.

## Yapay Olarak İndüklenen Kompetent Özellik

Yüksek düzeyde meydana gelen doğal transformasyon yalnızca birkaç bakteri cinsinde rastlanmaktadır. Örneğin, *Acinetobacter*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Haemophilus*, *Neissera* ve *Thermus* cinsleri kolayca transfrome edilebilmektedir. Birçok prokaryot organizma ise, doğal koşullarda çok düşük transformasyon sıklığı içermekte veya hiç transforme olamamaktadır. Bu tip bakterilerde; gelişme ortamı, sıcaklık ve diğer faktörlerin değiştirilmesi suretiyle kompetent özelliğin indüklenmesi çalışmaları yapılmıştır. Genetik mühendisliğinde DNA’nın hücre içine transferini gerçekleştirmek önemli olduğundan, ilk çalışmalar *E. coli* bakterisi ile yürütülmüştür. *E. coli*, yüksek kalsiyum konsantrasyonuna maruz bırakıldıktan sonra soğukta tutulduğunda, düşük etkinlikte transformasyonun meydana geldiği saptanmıştır. Bu uygulama sonucu çift zincir DNA alımı, tek zincir forma oranla daha etkin bir şekilde gerçekleştiğinden, plazmid DNA transformasyonu için uygun koşul yaratılabilmektedir. Kalsiyumun bu olaydaki etkisi bilinmemektedir. Bu prosedür diğer bazı Gram negatif bakterilerde de etkilidir. Ancak, yapay olarak indükleme artık elektroporasyon olarak adlandırılan yeni bir yöntemle yüksek verimde meydana getirilmektedir.

## Elektroporasyon Yolu ile DNA Transferi

Hücreler kısa süreli elektrik akımlarına maruz bırakıldığında membranda küçük porlar oluşmaktadır. DNA molekülleri elektrik akımı uygulaması sırasında hücre dışında iken, bu oluşan porlardan hücre içine girebilmektedir. Bu işlem elektroporasyon olarak adlandırılmaktadır. Elektroporasyonda uygulanan akımın hassas olarak kontrol edilmesi gerekmektedir. Bu süre sadece milisaniyelerle ölçüldüğünden, özel güç kaynağına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu teknik hem Arke’ler ve hem de bakterilerin çeşitli türlerinde kullanılabilmektedir. Elektroporasyon aynı zamanda bir hücreden diğerine plazmidlerin transferini de olanaklı kılmaktadır. Zira bu teknik küçük DNA moleküllerinin hücrelere girmesini sağlarken, hücrede bulunan kromozom dışı genetik materyalin de hücreden elimine olmasına neden olabilmektedir.

**Transformasyon Yöntemi Kullanılarak Gen Haritalarının Yapımı**

Transformasyon yöntemi kullanılarak prokaryotlarda gen sırası ve harita mesafelerinin saptanması mümkündür. Örneğin; *x+* ve *y+* sembolleri ile ifade edilen iki gen, kromozom üzerinde birbirinden çok uzakta bulunuyor ise, bu DNA’nın transformasyonu için oluşturulacak parçalarında (fragment), söz konusu genler daima ayrı parçalar üzerinde yer alacaktır. Dolayısı ile; *x+* ve *y+* özellikteki verici (dönör) DNA parçaları ile *x* ve *y* özellikteki alıcı hücrelerin eş zamanlı transformasyon denemelerine tabi tutulması sonucu *x+* ve *y+* özellikte transformant (yabancı DNA ile rekombine olmuş hücre) hücre oluşma olasılığı, tek *x+* ve tek *y+* transformant oluşma olasılıklarının çarpımına eşit olacaktır. Örneğin; eğer alıcı olarak kullanılan 103 hücrenin 1 adetinde *x+* ya da *y+* transformant meydana gelmiş ise (*x+* ya da *y+* transformasyon sıklığı 10-3), *x+* ve *y+* (ikisi birlikte) transformant oluşma olasılığı 10-3 X 10-3 = 10-6 olacaktır. Eğer iki gen, rastgele oluşacak fragmentlerde bile çoğunlukla aynı fragment üzerinde kalacak kadar birbirine yakın ise, iki genin birlikte transforme olma oranı, söz konusu genlerin tek tek transforme olma oranlarına yaklaşır. Fragmente edilen (değişik parçalara ayrılan ) verici bir DNA’nın *p+, q+* ve *o+* genlerinin alıcı hücrelerdeki transformasyon durumu incelendiğinde; eğer, 1- *p+*, 2- *p+ ve q+,*3- *q+* ve *o+* ve 4- *o+* olmak üzere 4 transformant meydana geliyor ise, bu verici DNA’da gen sırasının *p+, q+* ve *o+* şeklinde olduğu belirlenir. Bu genlerin birlikte oluşturdukları transformasyon sıklığı, transformasyonlarında rol alan fragmentlerin ortalama büyüklüklerine bölünerek, birbirine olan bağıl mesafeleri de belirlenebilir.

**C-2 Bakteriyel Konjugasyon**

Konjugasyon, iki ya da daha çok bakterinin yüzeysel teması sonucu DNA’nın tek yönlü (vericiden alıcıya) transferi olarak tanımlanmaktadır. Burada konjugatif bir plazmid bakteri genlerinin taşınımı için vektör olarak görev görür. Sonuçta meydana gelen bir rekombinasyon süreci ile taşınan verici DNA’sı alıcı kromozomuna entegre olur ya da verici hücre parçasını taşıyan konjugatif plazmid hücrede otonom (kromozom dışı ve bağımsız replikasyon yeteneğinde) bir plazmid haline geçer. Konjugatif plazmidler geniş bir konakçı spesifitesi gösterebilir (farklı konakçılara kendi aktarımlarını yönetebilirler). Konjugal plazmidlerin büyük bir çoğunluğunun, bulundukları konakçılarda inaktif (represse) durumda olduğu dikkate

alındığında, bu stratejinin de evrim için etkin bir yol olarak ifade edilme olasılığı ortadan kalkmaktadır. Bu tartışmanın bir diğer boyutunu; konjugatif plazmidlerin otonom replikasyon durumundan, kromozomal entegrasyona kayma kapasiteleri teşkil etmektedir. Bu durum genellikle IS elementleri tarafından sağlanır (IS elementleri plazmidleri kromozoma taşır). Bu durum yavaş ancak dinamik farklılaşan genler için farlılaşmanın kaynağını teşkil eder.