Bölüm 2

Probiyotiklerde Gen Mühendisliği ve Biyoteknolojik Uygulamalar

Özge Şebnem Çıldır[1]

Özet

Probiyotikler gerek insan gerekse hayvan sağlığı ve beslenmesinde önemli fonksiyonlara sahiptir. Probiyotik bakteri, maya ve mantarlar mikrobiyotanın oldukça önemli elemanlarıdır. Patojenlerin baskılanması, sindirimin kolaylaştırılması, immun sistemin güçlendirilmesi ve daha birçok fonksiyonu bulunan bu mikroorganizmalar yaşamın ayrılmaz bir parçasıdır. Evciltme ile birlikte hayatımıza giren geleneksel biyoteknoloji, DNA'nın keşfedilmesinden sonra modern biyoteknoloji halini almış ve gelişen teknolojiye paralel olarak devrim niteliğindeki tekniklerle donanmıştır. Gen mühendisliği ile canlılar arası DNA transferleri, gen eklenmesi, çıkartılması, gen konversiyonu mümkün hale gelmiştir. İndüklenen mutasyonlar, rekombinant DNA teknolojisi, homolog rekombinasyon ve CRISPR/Cas gibi yöntemler bu amaçla kullanılmaktadır. Birçok organizmada olduğu gibi probiyotiklerde de gen mühendisliği uygulamaları ile manipülasyonlar gerçekleştirilmektedir. Biyoteknolojik yaklaşımlarla probiyotiklerin etkinliklerini artırmak, probiyotik olmayan mikroorganizmalara probiyotik özellik kazandırmak, ürün elde etmek, farmasötik veya aşıların taşınabilmesi için araç geliştirmek, probiyotikleri belirli hastalık veya patojenlerle mücadele için manipüle etmek ve kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımına uygun probiyotikler tasarlamak hedeflenmektedir. Bu bölümde biyoteknoloji ve probiyotiklere ilişkin genel bilgiler verilmesinin ardından, probiyotiklerin manipülasyonunda hali hazırda kullanılmakta olan biyoteknolojik yöntemlere değinilecektir.

1. Giriş

Biyoteknoloji; mal ve hizmet sağlamak amacıyla malzemelerin biyolojik ajanlar tarafından işlenmesinde bilimsel ve mühendislik ilkelerinin uygulanmasıdır (Glick & Patten, 2022). Evciltme (MÖ 8000) ile birlikte

1 Dr. Öğr. Üyesi, Kafkas Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Genetik Anabilim Dalı, TR-36100, Kars, Türkiye, oscildir@kafkas.edu.tr, 0000-0001-7070-4212

https://doi.org/10.58830/ozgur.pub358.c1515

insan hayatına giren geleneksel biyoteknoloji, fermente ürünlerin üretimi, bitkilerin ıslahı, hastalıkla mücadele gibi çeşitli alanlarda kullanılmış; 1953 yılında DNA'nın yapısının keşfedilmesi ve 1970'li yıllardan itibaren ise gen manipülasyonuna ilişkin tekniklerin geliştirilmesi sonrasında ise moleküler yöntemlerin kullanıldığı modern biyoteknoloji halini almıştır (Glick & Patten, 2022; Nicholl, 2008). Biyoteknolojinin temellerini mikrobiyoloji, genetik, biyokimya, immünoloji, hücre biyolojisi ve kimya mühendisliği alanları oluşturmaktadır. İlgili her bir alanda meydana gelen ilerlemeler biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesindeki bilgi birikimini artırmış, genlere ilişkin bilgilerin eldesi ve genetik manipülasyon mümkün hale gelmiştir. Bu sayede, canlı organizmaları kullanarak faydalı mal ve hizmetler üretmek amacıyla genlerin manipülasyonuyla ilgilenen disiplin olan moleküler biyoteknoloji ortaya çıkmıştır (Glick & Patten, 2022). Bilimsel, medikal veya endüstriyel amaçlarla kullanılan genetik mühendisliği birbiri ile ilişkili ya da birbirinden tamamen farklı organizmalar arasında genetik materyalin değişimi ve yeniden düzenlenmesi ile ilgili tekniklerin toplamı olarak tanımlanmaktadır (Akçelik, 2007). Bu alan, gen manipülasyonu, gen klonlama, rekombinant DNA teknolojisi ve genetik modifikasyon gibi çeşitli teknolojileri kapsamaktadır (Nicholl, 2008). Genetik mühendisliği, tarım ve hayvancılık; ilaç ve sağlık sektörü; gıda ve diğer sanayi alanları ile enerji ve askeri alanlar gibi çok çeşitli alanlarda uygulama imkanlarına sahiptir (Erbaş, 2008).

Organizmalar trilyonlarca mikroorganizma ile kaplıdır. Her bir organizma kendi konakçı ilişkili mikrobiyotası ile etkileşim halindedir (Josephs-Spaulding vd., 2016). Mikrobiyota; canlının vücudunda bulunan bakteri, virus, mantar ve arkeleri kapsamaktadır. Bu mikroorganizmalar gastrointestinal, deri, solunum, ürogenital sistemlere ait hayati organlarda bulunabilmektedir. Diyet, antibiyotik kullanımı, stres gibi faktörler mikrobiyota kompozisyonunu bozabilmektedir (Küllük & Dalğın, 2021). Probiyotikler, konakçının sindirim sistemi florasında yaşayan, floranın dengesini konakçının sağlığını olumlu yönde etkileyecek şekilde düzenleyen mikroorganizmalardır (Gülmez & Güven, 2002). Sindirim sistemi florasında probiyotik olarak adlandırılan bakteri, mantar ve mayalar hem insan hem de hayvanların sağlıklı bir yaşam sürdürmesinde oldukça önemlidir. Probiyotikler sayesinde gastrointestinal sistemde patojenlerin aktiviteleri engellenir, gıdaların sindirilebilirliğinde artış görülür, bağışıklık sistemi kuvvetlenir ve kan kolesterol seviyesinde düşüş gözlenir. Probiyotiklerin etki mekanizmalarını genel kapsamda incelediğimizde farklı etki mekanizmaları ile karşılaşmaktayız. Bu etkiler arasında sindirimi iyileştirmek için besin maddelerinin metabolize edilmesi, doğrudan ve dolaylı patojenlere

antagonist etkiler göstermek, bariyer fonksiyonu geliştirmek, mikrobiyomu düzenlemek, sinir sistemine iletilen sinyalleri değiştirmek ve bağışıklık sistemini düzenlemek bulunmaktadır (Suez vd., 2019). Probiyotikler patojenler üzerine antagonist etki göstererek patojenlerin sayısında düşüşe neden olmaktadır. Yarışmalı olarak bağırsak duvarına yapışmaları ise patojenlerin bağırsak epiteline tutunmalarını engellemektedir. Patojenlerin üremesi için gerekli besin maddelerinin probiyotikler tarafından tüketilmesi patojenlerin etkinliğini azaltan bir diğer mekanizmadır. Patojenler üzerindeki etkilerinin haricinde bağırsaklardaki enzim aktivitesinin artışını sağlayan probiyotikler aynı zamanda bazı toksinlerin emilimi üzerinde negatif bir etkiye sahiptir. Bağışıklık sistemi üzerinde ise sindirim sistemi hastalıkları başta olmak üzere karaciğer, ürogenital sistem hastalıkları, immun sistemin düzenlenmesi, alerji, kanser, kolesterol düzeyinin regülasyonu ile ilgili olumlu etkileri söz konusudur. Antibiyotik kullanımı nedeniyle gelişen diyare vakalarında probiyotik kullanımının olumlu etkileri bildirilmiştir. Ülseratif kolit, Crohn hastalığı, spastik kolon-irritabl bağırsak sendromu gibi yangısal bağırsak hastalıklarında semptomların hafifletilmesinde probiyotiklerden yararlanılmaktadır. Karaciğer fonksiyonlarının bozulmasının sonucunda meydana gelen hepatik ensefalopati olgularında probiyotik kullanımının ensefalopatinin kontrol altına alınmasında yardımcı olduğu bildirilmiştir (Koçak vd., 2016; Sezen, 2013; M. K. Yadav vd., 2022). Yine probiyotiklerin anti-mutajenik ve anti-karsinojenik etkilerinin yanı sıra B grubu vitaminlerin sentezinde de rol oynadığı bilinmektedir (Koçak vd., 2016).

Çiftlik hayvanlarında mikrobiyotanın verim özellikleri, yemden yararlanma oranı ve süt yağı gibi karakterlerde etkili olduğu bildirilmektedir (Küllük & Dalğın, 2021). Evcil hayvanlarda probiyotikler hayvan sağlığını koruyucu ve verim artırıcı olarak kullanılmasının yanı sıra yem teknolojisine de uygulanmaktadır (Karademir & Karademir, 2003). Ruminantlarda özellikle neonatal buzağılarda meydana gelen ishal vakalarına karşı bağırsak mikrobiyotasının bir bölümünü oluşturan probiyotiklerin olumlu etkileri olduğu bilinmektedir (Kocaoğlu Güçlü & Kara, 2009). Hayvan sağlığının yanı sıra, ruminant beslemede probiyotiklerin yem katkı maddesi olarak kullanımı ile rumen mikrobiyatasının düzenlenmesi ve bu sayede verimliliğin artırılmasına yönelik çalışmalar mevcuttur (Kocaoğlu Güçlü & Kara, 2009; Öztürk, 2008). Yem katkı maddesi olarak kullanılan probiyotik mayaların ruminantlarda yem tüketimi, süt üretimi, canlı ağırlık artışı gibi verimle ilişkili özelliklerinde artışın yanı sıra; yemlerin sindirilebilirlik düzeyi, selülolitik ve anaerobik bakterilerin sayısı ve rumen pH'sında artışa yol açtığı ve rumen uçucu yağ asitleri miktar ve oranlarını olumlu yönde etkilediği bildirilmiştir (Öztürk, 2008). Pet hayvanlarında ise özellikle köpeklerin yüzyıllardır

birlikte yaşadıkları insanlarla yalnızca aynı çevreyi değil, aynı zamanda mikrobiyotalarını da paylaşmaları söz konusudur. Evcil hayvan varlığının insanlarda mikrobiyota gelişiminde büyük bir rolü olduğu ve çeşitli alerjik hastalıkların görülme oranlarını azalttığı kanıtlanmıştır. Evcil hayvanlarda probiyotikler bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, stresle başa çıkma durumlarında, bağırsaklardaki patojenlerin neden olduğu enfeksiyonlardan korunma, büyüme ve gelişmeyi artırıcı etki, alerjilerin kontrolü ve obezite ile mücadele gibi çeşitli amaçlarla kullanılabilmektedir (Küllük & Dalğın, 2021).

Biyoteknoloji terimine geri dönüş yaptığımızda, başlı başına biyoteknolojik ürün kapsamına girmesi ve biyoteknolojik ürün eldesinde kullanılmasının yanı sıra (Karademir & Karademir, 2003), probiyotikleri genetik mühendisliği uygulamalarının odağında görmekteyiz. Bu uygulamalar probiyotiklerin fonksiyonlarını güçlendirmek, fermantasyon ve uzun raf ömrü sağlamak amacıyla probiyotiklerin dayanıklılığını artırmak ve sağlığı desteklemek için probiyotik olmayan suşlardan gen mühendisliği ile terapötik moleküller üretmek amacıyla yapılmaktadır (Desmond vd., 2006). Probiyotikler geleneksel veya genetik mühendisliği aracılığıyla modifiye edildiğinde, biyomühendislik ürünü probiyotikler olarak adlandırılır. Biyomühendislik ürünü mikroorganizmalar, besinlerden yararlanmayı artırmak, enterik metan üretimini azaltmak, patojenlere ve enfeksiyöz ajanlara karşı savunmayı güçlendirmek amacıyla tasarlanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen terapötikler ve nutrasötikler insan hastalıklarının tedavisinde immünomodülatör, metabolik veya normal bağırsak mikrobiyotasının bozulması gibi durumlarda kullanılabilirler. Akut ishal, *Helicobacter pylori* enfeksiyonu, nekrotizan enterokolit (NEC), yangısal bağırsak hastalıkları, antibiyotiğe bağlı ishal (AAD) kistik fibrozis gibi hastalıklarda genetiği değiştirilmiş probiyotiklerin kullanılabilmesi söz konusudur (Yadav ve Shukla, 2019). Klonlama, kromozomal mutasyonlar, genom düzenleme gibi genetik mühendisliği uygulamaları probiyotiklerde kullanılmaktadır (Desmond vd., 2006). Rekombinant DNA teknolojisi, uyarılmış mutasyonlar ve homolog rekombinasyon gibi tekniklerin yanı sıra, probiyotiklerde de genom düzenleme tekniklerinden CRISPR-Cas sistemi kullanımı gittikçe yaygınlaşmaya başlamıştır. Çok suşlu bileşimlerin oluşturulması, probiyotikleri kullanırken hastanın mikrobiyomuna özel kişiselleştirilmiş probiyotikler tasarlanması ve modifiye probiyotiklerin oluşturulması bu sayede mümkün olabilmektedir. Gen mühendisliği uygulamaları, probiyotiklerin etkinliğini ve terapötik ajanların dağıtımında kullanılacak sistemleri geliştirmek; teşhis aracı olarak kullanımın önünü açmak, spesifik özellikleri geliştirmek ve antimikrobiyal etkiyi artırmak gibi amaçlarla kullanılmaktadır. Gen mühendisliği ile probiyotiklere yabancı

DNA'lar eklenebilir ve probiyotiklerin genomları modifiye edilebilir (Khablenko vd., 2022).

2. Rekombinant DNA Teknolojisi ve Transformasyon

Rekombinant DNA teknolojisi ve genetik mühendisliğinin altyapısını gen klonlama tekniği oluşturmaktadır. Modern biyoteknoloji alanındaki tekniklerin gelişimi ile organizmalara ait genlerin manipülasyonu mümkün hale gelmiştir. Gen klonlaması, ilgilenilen gen veya gen bölgesinin bir vektöre aktarılarak konak hücrede çoğaltılması işlemidir. Şekil 1'de şematik olarak görülebilen klonlama işlem basamakları temelde şu şekilde özetlenebilir:

- Çoğaltılmak veya aktarılmak istenen hedef gen veya gen bölgesi (klonlanacak gen) restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek elde edilir.

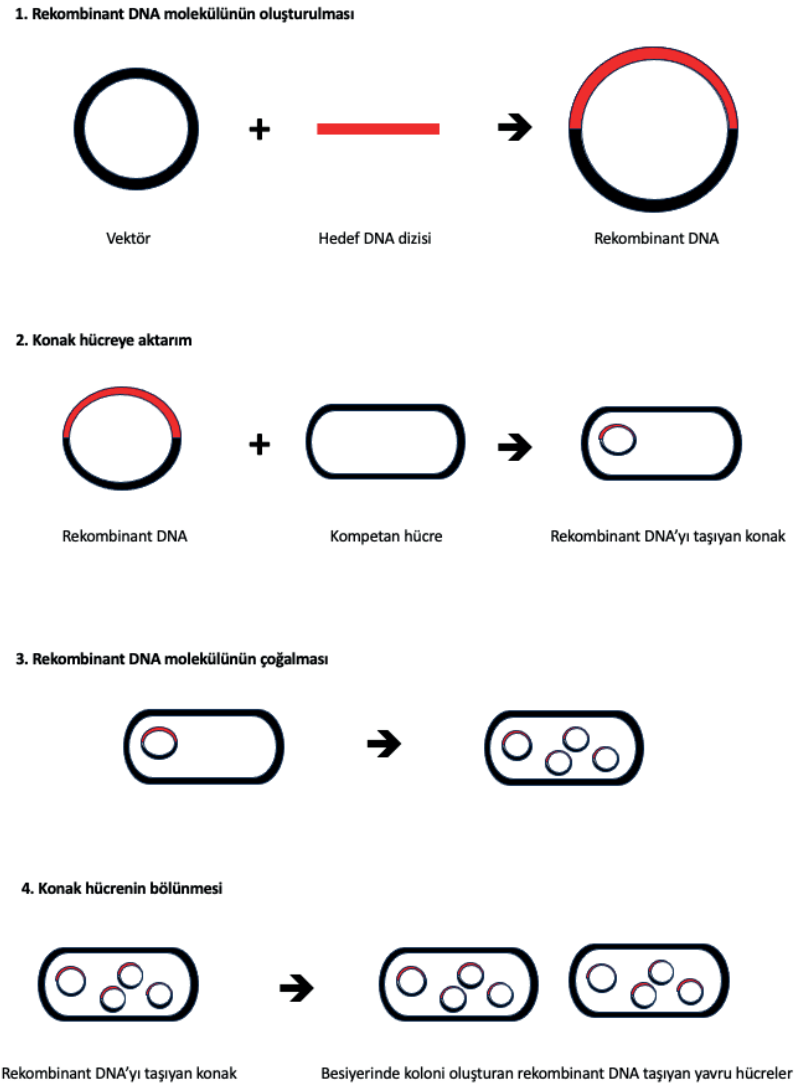
- Klonlanacak geni içeren DNA dizisi restriksiyon endonükleazlar ve ligaz enzimleri aracılığıyla vektör adı verilen bir DNA molekülüne entegre edilir.

- İlgili gen bölgesini taşıyan vektör konak hücreye aktarılır (transformasyon).

- Konak hücre besiyerine ekilerek çoğaltılır; konak hücre ile birlikte vektöre entegre olan hedef DNA dizisi de çoğaltılmış olur (Brown, 2013a).

Gen klonlaması ile birlikte gelişen rekombinant DNA teknolojisi sayesinde rekombinant protein üretimi, rekombinant farmasötik üretimi, rekombinant aşılar, gen tedavisi, gen ekleme ve çıkarma yöntemleri ile gerçekleştirilen genetik olarak modifiye edilmiş veya genetiği değiştirilmiş organizmaların (GMO/GDO) eldesi gibi birçok uygulama alanı ortaya çıkmıştır.

Bakterilerin çoğu bulundukları ortamdan DNA moleküllerini alabilme yeteneğine sahiptir. Bakteri türleri ve suşları arasında bu yetenek değişiklik göstermektedir (Brown, 2013b). 1928'de Griffith'in farelerde zatürre üzerine yapmış olduğu deney transformasyon prensibinin varlığını gösteren araştırma olarak kayda geçmiştir. Deney kapsamında patojen ve patojen olmayan *Streptococcus pneumoniae* suşları ile çalışan Griffith farelere canlı ve ısı ile öldürülen patojenik ve patojenik olmayan suşları enjekte etmiştir. Patojenik olmayan canlı suş ve ısı ile öldürülmüş patojenik suşun birlikte verildiği farelerin hastalandığı tespit edilmiş; patojenik olmayan suşun patojenik suşa dönüşümü transformasyon olarak adlandırılmıştır (Griffith, 1928). Bakterilerin ortamdan DNA moleküllerini alabilme yeteneği olarak tanımlanabilen transformasyon prensibine dayanan çalışmada transformasyona neden olan faktörün DNA olduğu kanıtlanmıştır (Avery vd., 1944). Bu deney aynı zamanda kalıtım materyalinin DNA olduğunu göstermiş ve genetik alanında önemli gelişmeleri de beraberinde getirmiştir.



Şekil 1. Gen klonlama basamakları (Brown, 2013a'dan esinlenerek hazırlanmıştır).

Transformasyon, serbest DNA'nın alınması yoluyla başka bir kaynaktan DNA getirilerek bir hücrenin genotipinin değiştirilmesini içerir (Desmond vd., 2006). Transformasyon bakterilerin ortamdan aldıkları DNA'lar sayesinde hayatta kalma ihtimallerini artıran veya farklı özellikler kazanmalarını sağlayabilen bir mekanizmadır. Bakteri içine alınan DNA'lar

genellikle yıkımlanır, ancak plazmit gibi moleküller parçalanmadan konakçı ile birlikte replike olabilmektedir (Brown, 2013b). *Bacillus* ve *Streptococcus* cinsi bakterilerin kolay bir şekilde transformasyon geçirebildikleri bilinmektedir. Konak hücreler fiziksel veya kimyasal birtakım işlemlerle kompetan (transformasyon kabiliyeti geliştirilmiş) hücre haline getirilerek serbest DNA'nın hücre içine alımı sağlanabildiği gibi (Brown, 2013b), elektrik akımı ve tampon çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilen elektroporasyon yöntemi ile de bakterilerin transformasyonu gerçekleştirilebilmektedir (Desmond vd., 2006). Plazmit yerine faj vektörü kullanılarak gerçekleştirilen çalışmalarda bakteriler faj vektörüne sahip bakteriyofajlar ile enfekte edilerek (transfeksiyon) de rekombinant hücreler meydana getirilebilmektedir (Brown, 2013b). Probiyotiklerde transformasyon bakterilerin kontrollü bir şekilde iyileştirilmesi ve önemli ticari özelliklerin genetik bağlantısının araştırılması için kullanılmaktadır (Desmond vd., 2006). Bakteri olmayan probiyotiklerde ise dış kaynaktan konak hücreye DNA dizisi eklemede farklı yöntemler söz konusudur. Bir maya olan *Saccharomyces cerevisia*'da lityum klorit ve lityum asetat ile muamele kullanılan yöntemlerden biridir. Bunun haricinde maya ve mantarlarda hücre duvarının uzaklaştırılması ile protoplast oluşturularak DNA girişi elektroporasyonla sağlanabilir. Bu prosedürün ardından hücre duvarı kendiliğinden oluşabilmektedir. Mikroenjeksiyon veya DNA ile sarılmış altın ya da tungsten mikroprojektiller ile hücrelerin bombardımana tabi tutulması da DNA aktarımında kullanılan yöntemlerdendir, ancak bu yöntemler probiyotiklerde değil, daha çok yüksek organizmalarda kullanılmaktadır (Brown, 2013b).

Transformasyonun başarısının saptanmasında belirteçler kullanılmaktadır. Diğer bakterilerde seçilim için antibiyotik direncine ilişkin belirteçler yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, probiyotikler gıda maddeleri olarak kabul edilmektedir ve antibiyotik direnç genlerine sahip mikroorganizmaların florada bulunması risk teşkil edeceğinden, belirteç olarak kesinlikle aktarılabilir antibiyotik belirteçleri kullanılmaz. Bunun yerine, şeker kullanımına dayalı belirteçler, oksotrofik belirteçler ve direnç/bağışıklık kazandıran belirteçler kullanılmaktadır (Desmond vd., 2006).

3. Uyarılmış Mutasyonlar

Bu teknikte radyasyon veya kimyasal mutajenler kullanılarak hedef organizmanın DNA dizisinde mutasyon oluşumu tetiklenir. Kontrolsüz olan bu sistem, en eski tekniklerden biri olmakla birlikte; istenmeyen mutasyonların meydana gelmesine zemin hazırlayabileceği için kullanılmamakta ve kullanımı önerilmemektedir (Khablenko vd., 2022).

4. Homolog Rekombinasyon

Homolog rekombinasyon, gen eklenmesi, silinmesi ve değiştirilmesi amacıyla kullanılan genom düzenleme tekniklerinden ilkidir. Bu teknik tek zincirli (ssDNA) veya çift zincirli DNA'da (dsDNA) gerçekleştirilebilmektedir. dsDNA'da tekniğin uygulanabilmesi için bakteriyofaj tarafından kodlanan λ-Redαβγ ve RecET gereklidir. Redα/RecE ekzojen dsDNA'yı 5'→3' ekzonükleaz aktivitesiyle ssDNA haline getirmektedir. Boşta kalan ssDNA'nın 3' ucu konakçı genomuna invaze olur. İplikçik invazyonu ve değişimi Redβ/RecT aracılığıyla gerçekleştirilir. Redγ ekzojen DNA'nın nükleazlar tarafından parçalanmasına engel olur. İplikçik invazyonu sonrasında Redβ/RecT komplementer zincirin tamamlanmasını sağlar ve gen dönüşümü gerçekleştirilir.

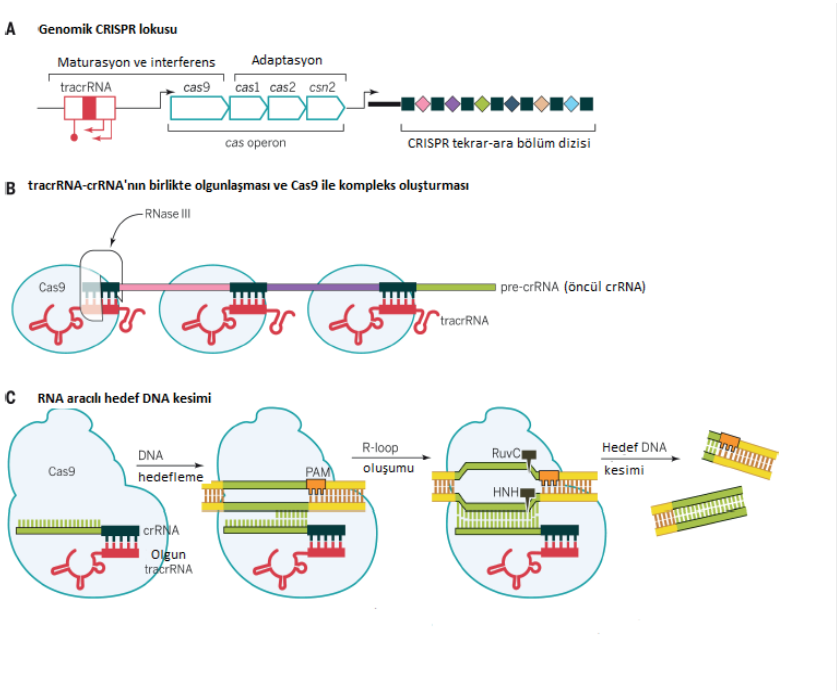
SsDNA ile gerçekleştirilen homolog rekombinasyon işleminde ise Redβ/RecT ifadeleri gereklidir. SsDNA bu proteinler aracılığıyla homolog dizilere yönlendirilerek gen dönüşümü sağlanmaktadır (Wu vd., 2021).

5. CRISPR/Cas Sistemi

1987 yılında Ishino ve arkadaşları tarafından keşfedilen kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar (CRISPR) ve CRISPR ile ilişkili endonükleazlar (Cas) olarak bilinen CRISPR/Cas sistemi, virüs ve plazmitlere karşı bakteri ve arkelerde doğal olarak bulunan bir bağışıklık sistemidir. 2012 yılında sistem Jinek ve arkadaşları tarafından yeniden yapılandırılmış (Doudna & Charpentier, 2014) ve genom düzenleme amacıyla evcil hayvanlar da dahil olmak üzere birçok organizmada denemeleri yapılmıştır (Çıldır & Özmen, 2018).

Sistem Cas9 endonükleaz, trans-aktive edici bir CRISPR RNA (tracrRNA) ve kümelenmiş düzenli aralıklı kısa palindromik tekrarlar arasına yerleştirilmiş ara (spacer) dizilerden oluşan bir öncül crRNA dizisinden oluşur. Öncül crRNA, olgun crRNA'yı oluşturmak için tekrar dizileri içinde işlenir ve ardından tracrRNA ile dubleks oluşturur. Oluşan bu çift zincirli yapı Cas9 ile etkileşime girer, mevcut DNA'da üç nükleotitten oluşan bir protospasere komşu motif (PAM) arar ve proksimal kromozomal tamamlayıcı dizilere (protospaser) bağlanarak kromozomda çift zincir kırığı yaratır. DNA'da meydana gelen çift zincir kırıklarının tamiri için homolog olmayan uç birleştirme (NHEJ) veya homolog rekombinasyon (HR) mekanizmaları devreye girer ve bu sayede de istenen mutasyonlar üretilebilir. Teknik genom düzenleme amacıyla kullanıldığında crRNA ve tracrRNA dizileri yerini her iki diziyi de kapsayan bir rehber RNA (gRNA)

molekülüne bırakmıştır (Doudna & Charpentier, 2014). Sistemin çalışma prensibi Şekil 2'de görülmektedir.



Şekil 2. Tip II CRISPR/Cas sistemi biyolojisi, Türkçeleştirilmiş (Doudna & Charpentier, 2014)

S. pyogenes'in tip II-A sistemi örnek olarak gösterilmiştir. **(A)** tracrRNA ve CRISPR dizisi ile cas geni operonu. **(B)** Antiviral savunma yolağı Cas9 ile ribonükleaz III tarafından birlikte işlenmiş; düzetilmiş ve R-loop formasyonu almış tracrRNA-cr-RNA çiftlerinin birlikte çalışmasını ve DNA kesimini hedeflemesini içerir. **(C)** tracrRNA-crRNA çifti ile doğal DNA kesiminin ayrıntıları.

Eskiden yalnızca DNA dizisi üzerinde gerçekleştirilen çift zincir kırıkları söz konusuyken, sonraki yıllarda CRISPR/Cas sistemlerinde yapılan birtakım değişiklikler sayesinde baz düzenleyici (BE), primer düzenleyici (PE) ve CRISPR-aracılı transpozaz (CAST) teknolojileri ortaya çıkmıştır. Baz düzenleme teknolojisinde nükleaz aktivitesi olmadığı için ölü Cas9 olarak adlandırılan bir dCas9 enzimi ve Cas9 nikaz (nCas9) kullanılmaktadır. Enzimler hedef bölgeyi bulur ancak yalnızca tek bir iplikçikte kesime neden olur. Devreye sistemin bir parçası olan deaminaz enzimi girer ve hedef bazda modifikasyona neden olur. Primer düzenleyici CRISPR/Cas sisteminde Cas9

nikaz, ters transkriptaz enzimleri ve pegRNA adı verilen primer düzenleyici rehber RNA bulunmaktadır. PegRNA rehber RNA, saç tokası yapısı ve 3' ucunda ters transkriptaz enzimi için bir kalıptan ve ters transkripsiyonu başlatmak için kesilen DNA ipliğinin 3′ ucuyla hibridizasyon için bir primer bağlanma bölgesinden (PBS) oluşmaktadır. Hedef DNA kesilir, primer bölgesi ile eşleşme gerçekleşir, ters transkripsiyon primeri istenen dizileri barındırmaktadır. Ters transkripsiyon işlemi gerçekleştiğinde DNA onarımı istenen baz dizisini içerecek şekilde gerçekleşir ve genom düzenlenmiş olur. CRISPR-aracılı transpozaz (CAST) sisteminde ise CRISPR nükleazları genellikle inaktiftir. Tn7 benzeri transpozonlarda donör DNA ve transpozona ait genler bulunmaktadır. CAST sistemlerinin CRISPR elemanları (genellikle Cas12k veya Cascade) crRNA'nın rehberliğinde belirli bir bölgeye bağlanır ve donör DNA parçasını hedef bölgenin 3' ucu bölgesine entegre etmek için transpozonlara ait TniQ, TnsC ve TnsA/B komplekslerini kullanır (Wei & Li, 2023).

Genom düzenleme teknikleri ve uygulama alanları teknolojiye paralel bir şekilde gelişim göstermektedir. FDA tarafından da CRISPR/Cas sisteminin tedavi amaçlı kullanımının güvenilirliğine ilişkin incelemelerde bulunulacağına dair haberler bulunmaktadır (Ledford, 2023).

6. Sonuç

Biyoteknolojik yöntemler ve biyoinformatik araçların birbirine paralel gelişim göstermesinin bir sonucu olarak, gen mühendisliği uygulamaları gün geçtikçe daha spesifik ve hedefe yönelik olacak şekilde geliştirilmektedir. Daha güvenli genom düzenleme tekniklerinin kullanılmaya başlanması, gen düzenlenmesi hususunda gerek toplum gerekse bilim camiasında endişe uyandıran riskler ve şüpheleri gün geçtikçe azaltmaktadır. Yakın zaman dilimine kadar veteriner hekimlikte probiyotiklerin gıda endüstrisi, hayvan besleme, hayvan sağlığı gibi alanların haricinde kullanımı söz konusu değildi. Ancak, genetiği düzenlenmiş probiyotiklerin artık farklı işlevler için özel hedeflere yönelebilen, metabolit sentezinde kullanılabilen, aşı ve ilaç taşıtı görevi gören canlı mikro araçlar olarak kullanılabildiğini biliyoruz. Hayvan sağlığı ve refahının iyileştirilmesinin yanı sıra, hayvansal ürünlerde verim özelliklerinin artırılmasına yönelik birçok faaliyeti mümkün hale getirebilecek olan genetiği değiştirilmiş probiyotiklerin gelecekteki kullanım alanlarını düşündüğümüzde; sınırlarının bilim insanlarının hayal gücüne kalmış olduğunu söylemek abartılı olmayacaktır.

KAYNAKLAR

Akçelik, M. (2007). Genetik mühendisliği ve yaşamımızdaki yeri. *6'th Ankara Biotechnology Days: Biotechnology, Biosafety and Socio-economic Approaches*, 5–18.

Avery, O. T., MacLeod, C. M., & McCarty, M. (1944). STUDIES ON THE CHEMICAL NATURE OF THE SUBSTANCE INDUCING TRANSFORMATION OF PNEUMOCOCCAL TYPES. *Journal of Experimental Medicine*, *79*(2), 137–158. https://doi.org/10.1084/jem.79.2.137

Brown, T. A. (2013a). *Gen Klonlama ve DNA Analizi Giriş* (T. A. Brown (ed.); 5. Basımda). Nobel Akademik Yayıncılık.

Brown, T. A. (2013b). *Gen Klonlama ve DNA Analizi Giriş* (T. A. Brown (ed.); 5. Basımda). Nobel Akademik Yayıncılık.

Çıldır, Ö. Ş., & Özmen, Ö. (2018). Çiftlik Hayvanlarında CRISPR/Cas9 Uygulamaları. *Selcuk Journal of Agricultural and Food Sciences*, *32*(3), 559–566. https://doi.org/10.15316/sjafs.2018.137

Desmond, C., Ross, P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2006). Genetic Engineering of Probiotic Bacteria. Içinde I. Goktepe, V. K. Juneja, & M. Ahmedna (Ed.), *Probiotics in Food Safety and Human Health* (ss. 139–164). CRC Press.

Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2014). The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, *346*(6213). https://doi.org/10.1126/science.1258096

Erbaş, H. (2008). Biyoteknolojinin Tarihsel Gelişimi ve Uygulama Alanları. Içinde H. Erbaş (Ed.), *Türkiye'de Biyoteknoloji ve Toplumsal Kesimler: Profesyoneller, Kentsel Tüketiciler ve Köylüler* (Birinci ba, ss. 7–23). Ankara Üniversitesi Basımevi.

Glick, B. R., & Patten, C. L. (2022). *Molecular Biotechnology Principles and Applications of Recombinant DNA* (B. R. Glick & C. L. Patten (ed.); 6. baskı). Wiley.

Griffith, F. (1928). The Significance of Pneumococcal Types. *Journal of Hygiene*, *27*(2), 113–159. https://doi.org/10.1017/S0022172400031879

Gülmez, M., & Güven, A. (2002). Probiyotik, Prebiyotik ve Sinbiyotikler. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, *8*(1), 83–89.

Josephs-Spaulding, J., Beeler, E., & Singh, O. V. (2016). Human microbiome versus food-borne pathogens: friend or foe. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(11), 4845–4863. https://doi.org/10.1007/s00253-016-7523-7

Karademir, G., & Karademir, B. (2003). Yem Katkı Maddesi Olarak Kullanılan Biyoteknolojik Ürünler. *Lalahan Hayvancılık Araştırma Enstitüsü Dergisi*, *43*(1), 61–74.

Khablenko, A. D., Danylenko, S. G., Yalovenko, O. I., Duhan, O. M., Potemskaia, O. I., & Prykhodko, D. S. (2022). Recombinant Probiotic Preparations: Current State, Development and Application Prospects. *Innovative Biosystems and Bioengineering*, *6*(3–4), 119–147. https://doi.org/10.20535/ibb.2022.6.3-4.268349

Koçak, Y., Fındık, A., & Çiftçi, A. (2016). Probiyotikler: Genel Özellikleri ve Güvenilirlikleri Probiotics: General Features and Safety. *Etlik Vet Mikrobiyol Derg*, *27*(2), 118–122. http://vetkontrol.tarim.gov.tr/merkez

Kocaoğlu Güçlü, B., & Kara, K. (2009). Ruminant Beslemede Alternatif Yem Katkı Maddelerinin Kullanımı: 1. Probiyotik, Prebiyotik ve Enzim Use of Alternative Feed Additives in Ruminant Nutrition: 1. Probiotic, Prebiotic, and Enzyme. *Erciyes Üniv Vet Fak Derg*, *6*(1), 65–75.

Küllük, E., & Dalğın, D. (2021). Veteriner Sahada Güncel Mikrobiyota Kavramı. *Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi*, *32*(1), 77–88. https://doi.org/10.35864/evmd.674349

Ledford, H. (2023). Is CRISPR safe? Genome editing gets its first FDA scrutiny. *Nature*. https://doi.org/10.1038/d41586-023-03317-7

Nicholl, D. S. T. (2008). An Introduction to Genetic Engineering. İçinde *An Introduction to Genetic Engineering*. https://doi.org/10.1017/cbo9780511800986

Öztürk, H. (2008). Ruminant beslenmesinde probiyotik mayalar. *Veteriner Hekimler Derneği Dergisi*, *79*(3), 37–42.

Sezen, G. (2013). Prebiyotik, Probiyotik ve Sinbiyotiklerin İnsan ve Hayvan Sağlığı Üzerine Etkileri. *Atatürk Üniversitesi Veteriner Bilimleri Dergisi*, *8*(3), 248–258. https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/33998

Suez, J., Zmora, N., Segal, E., & Elinav, E. (2019). The pros, cons, and many unknowns of probiotics. *Nature Medicine*, *25*(5), 716–729. https://doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x

Wei, J., & Li, Y. (2023). CRISPR-based gene editing technology and its application in microbial engineering. *Engineering Microbiology*, *3*(4), 100101. https://doi.org/10.1016/j.engmic.2023.100101

Wu, J., Xin, Y., Kong, J., & Guo, T. (2021). Genetic tools for the development of recombinant lactic acid bacteria. *Microbial Cell Factories*, *20*(1), 1–10. https://doi.org/10.1186/s12934-021-01607-1

Yadav, M. K., Kumari, I., Singh, B., Sharma, K. K., & Tiwari, S. K. (2022). Probiotics, prebiotics and synbiotics: Safe options for next-generation therapeutics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *106*(2), 505–521. https://doi.org/10.1007/s00253-021-11646-8

Yadav, M., & Shukla, P. (2019). Recent systems biology approaches for probiotics use in health aspects: a review. *3 Biotech*, *9*(12), 1–10. https://doi.org/10.1007/s13205-019-1980-5