



Journal of

Molecular Virology and Immunology

Moleküler Biyoloji Tekniklerinin Gelişim Sürecinde Dönüm Noktası Niteliğindeki Bilimsel Keşiflerin 150 Yıllık Tarihi

The 150-Year History of Scientific Discoveries as Milestones in the Development Process of Molecular Biology Techniques

Mehmet ŞAHİNER¹ [ID], Eray Serdar YURDAKUL² [ID], Fatih ŞAHİNER³ [ID]

¹Milli Eğitim Bakanlığı Gerger Anadolu İmam Hatip Lisesi, Adıyaman, Türkiye [The Ministry of Education Gerger Anadolu Imam Hatip High School, Adıyaman, Turkey].

²Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical History and Ethics, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

³Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye [Department of Medical Microbiology, Gulhane Medical Faculty, University of Health Sciences, Ankara, Turkey].

Makale geçmişi [Article Info]: Geliş Tarihi (Received): 02.11.2019. Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 17.05.2020.

İletişim [Correspondence]: Mehmet Şahiner; Biyolog, Milli Eğitim Bakanlığı Gerger Anadolu İmam Hatip Lisesi, Adıyaman, Türkiye. E-posta: msahiner.bio@gmail.com [Mehmet Şahiner; Biologist, The Ministry of Education Gerger Anadolu Imam Hatip High School, Adıyaman, Turkey. E-mail: msahiner.bio@gmail.com]

Özet

Genetik bilgi aktarımı ve DNA'nın keşfi ile ilgili ilk çalışmaların üzerinden geçen süre 150 yılı aşmıştır. Bir cerrahi bandajdaki lökositlerin çekirdeğinde bulunan ve başlangıçta nüklein olarak adlandırılan bir madde üzerindeki çalışmalar DNA'nın keşfi ile sonuçlanırken, her bir araştırmacı veya araştırma ekibinin eklediği yeni keşiflerle zincir halkaları gibi uzayan bilgi birikimi (*telahuk-u efkar*) günümüz tıbbının en önemli araçlarından olan birçok moleküler tanı yönteminin geliştirilmesine öncülük etmiştir. Nükleik asitlerin üç boyutlu yapısının tanımlanmasından sonraki 20 yıl içerisinde DNA replikasyon mekanizmaları, transkripsiyonun temel parametreleri ve protein senteziyle sonuçlanan translasyon aşamaları ayrıntılarıyla tanımlanmıştır. Bu temel bilgiler nükleik asitlerin saptanması, çoğaltılması, in-vitro sentezi ve klonlanması gibi manipülatif uygulamalarda kullanılan yöntemlerin geliştirilmesi süreçlerine öncülük etmiştir. Bir lökosit çekirdeğinde DNA'nın ilk fark edilmesinden yüz yıl sonra geliştirilen dizi analizi teknikleri ile insan genom projesi kapsamında bir hücreden bir kütüphaneyi dolduran genomik bilgi dizisi çıkarılmıştır. Araştırmacılara çok sayıda Nobel ödülü kazandıran bu süreçlerin sonrasında bilinmeyen mikroorganizmalar keşfedilmiş, gen susturulması ve klonlama çalışmaları yapılmış ve rekombinan gen teknolojisinin sunduğu tekniklerle sayısız biyomolekülün in-vitro üretimi mümkün hale gelmiştir. Yeni moleküler tekniklerinin geliştirilmesi tıp, biyoloji ve veterinerlikte tanı, tedavi ve gen teknolojisi alanlarında bilim insanlarına yeni pencereler açılmıştır. Bu makalede günümüzde kullanılan moleküler biyoloji tekniklerinin öncüleri niteliğindeki ilk çalışmaların ve zorlu süreçlerin sonunda ulaşılan tarihi keşiflerin hikayeleri özetlenmiştir.

Anahtar kelimeler: DNA, RNA, Sekanslama, Klonlama, Genetik.

Abstract

The time elapsed since the first studies on genetic information transfer and the discovery of DNA has exceeded 150 years. While studies on a substance that was originally called nuclein in the core of leukocytes in a surgical bandage resulted in the discovery of DNA, the knowledge of humanity has extended as chain

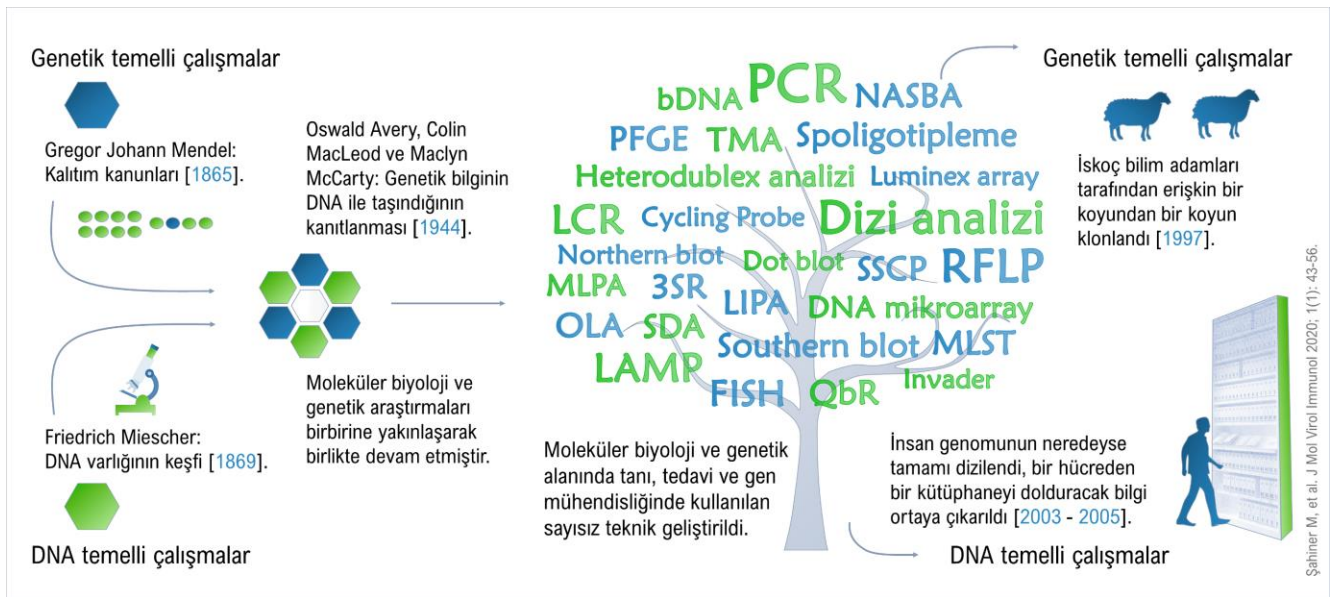
rings with the new discoveries added by each researcher or research team and has led to the development of many molecular diagnostic methods, one of the most important tools of today's medicine. DNA replication mechanisms, basic parameters of transcription and translation stages that result in protein synthesis are described in detail within 20 years after the definition of the three-dimensional structure of nucleic acids. This basic information pioneered the development of methods used in manipulative applications such as the detection, replication, in-vitro synthesis and cloning of nucleic acids. The genomic information filling a library from a cell was derived by using sequence analysis techniques, developed a hundred years after the first detection of DNA in a leukocyte nucleus, within the scope of the human genome project. After these processes, which gave researchers many Nobel prizes, unknown microorganisms were discovered, gene silencing and cloning studies were performed, and in-vitro production of numerous biomolecules has become possible with the techniques offered by recombinant gene technology. The development of new molecular techniques opens new windows for scientists for diagnosis, treatment and gene technology in the fields of medicine, biology and veterinary medicine. This article summarizes the stories of the earliest studies and pioneers of molecular biology techniques used today and the great discoveries reached at the end of the difficult processes.

Keywords: DNA, RNA, Sequencing, Cloning, Genetics.

Giriş

Gregor Johann Mendel'in 1865 yılında kalıtım kanunlarını formüle etmesi klasik genetiğin başlangıcı olarak kabul edilir [1]. Friedrich Miescher'in 1869 yılında deoksiribonükleik asit (DNA) varlığını keşfetmesi ve sonrasında yaptığı araştırmalar ise moleküler biyolojinin başlangıcı olarak kabul edilebilir [2]. Bu iki keşif neredeyse aynı yıllarda yapılmış ve ilginç olarak her iki alanda yapılan araştırmalar bir paralellik göstermiştir. Bu makalede daha çok Miescher'in keşfi üzerinden devam eden ve moleküler tekniklerin gelişmesine öncülük eden çalışmalara değinilecektir. Avery ve arkadaşlarının [3] 1944

yılında genetik bilginin DNA ile taşındığını kanıtlaması ve DNA'nın kalıttaki rolünü göstermesiyle moleküler biyoloji ve genetik araştırmaları birbirine yakınlaşarak birlikte devam etmiştir (Şekil 1). Bu derlemede, günümüzde moleküler biyoloji ve genetik alanlarında yaygın olarak kullanılan modern tekniklerin gelişim sürecinde her biri birer dönüm noktası niteliğinde olan bilimsel keşiflerin aslında sayısız araştırma ve fikrin birbirine eklenmesiyle ortaya çıktığını ve bugün her birimize sayısız faydaları sunan bu araçların aslında insanlığın birlikte gösterdiği çabalarla büyüyüp geliştiğini ve insanlığın ortak malı olduğunu vurgulamak amaçlanmıştır.



Şekil 1. Nükleik asitlerle ilgili ilk çalışmalardan günümüzde kullanılan modern tekniklere kadar uzanan 150 yılı aşan tarihi süreç [1-18]. Moleküler teknikler yüksek bir nizam ve hassas bir ölçüye dayanan DNA, RNA ve proteinler arasındaki etkileşimler ve bu etkileşimlerin düzenlenme mekanizmaları üzerine inşa edilmiştir.

DNA'nın Keşfi ve Yapısının Tanımlanması

Felix Hoppe-Seyler laboratuvarında (Tübingen Üniversitesi) çalışan İsviçreli genç hekim Friedrich Miescher 1869 yılı kışında bir cerrahi bandajdaki püye bulunan lökositlerin kimyasal kompozisyonu üzerinde mikroskopik araştırmalar yaparken hücre çekirdeğinde bulunan bir madde dikkatini çekmiştir [2]. Miescher daha sonra bu maddenin protein veya lipid yapıda olmadığını ve bol miktarda fosfor içerirken sülfür içermediğini ve daha başka özelliklerini ortaya koyarak, bulduğu şeyin yeni bir madde olduğu kanaatine varmış ve hücre çekirdeklerinde yerleşmiş olan bu maddeyi "nüklein" olarak adlandırmıştır [2]. Sonrasında Miescher yeni bir madde bulunduğunu ve onu "nüklein" olarak adlandırdığını bildiren bir makale yazmış ve Hoppe-Seyler'e sunmuştur. Hoppe-Seyler Miescher'in yaptığı deneyleri tekrarlamak için bu yazıları iki yıl kadar bekletmiş ve bu bilgileri doğruladıktan sonra Miescher'in püye hücreleri ve yumurta sarısında nüklein ile ilgili yaptığı çalışmaları 1871 yılında yayımlamıştır [2,19]. Derginin aynı baskısında Hoppe-Seyler ve öğrencilerinin çekirdekli kuş ve yılan eritrositlerinde ve maya hücrelerinde nükleini izole ettiklerine dair çalışmalar da yayımlanmıştır [20,21]. Sonraki yıllarda çekirdeksiz olan prokaryotlarda da nükleik asitlerin varlığı gösterilmiştir [2]. Miescher 1871'de tuz-benzeri bir protein ile kombine olması dışında lökositlerdeki benzer özellikleri olan nükleini somon sperm hücrelerinden saf olarak izole ettiğini bildirmiş ve bulduğu bu yeni proteini ise "protamin" olarak adlandırmıştır (günümüzde de aynı isimle anılmaktadır) [22]. Miescher 1871-73 yılları arasında yaptığı sonraki çalışmalarında nükleini boğa, kurbağa ve sazan balığı gibi türlerin sperm hücre çekirdeklerinden de izole etmiştir [2]. Bu çalışmalar Hoppe-Seyler laboratuvarında çalışan diğer bir araştırmacı olan Albrecht Kossel'in gelecekteki çalışmalarına ışık tutmuştur. Kossel 1878'de maya hücrelerinde nüklein üzerine yaptığı çalışmaları içeren ilk makalesini yayımlarken, bir yıl kadar sonra nükleinin non-protein komponentini izole ettiğine ve ksantin ve hipoksantininin onun yıkım ürünleri olduğuna dair yeni makaleler yayımlamıştır [2]. Kossel 1884'de yayımlanan bir makalesinde ise kuş

eritrositlerinde nüklein ile kombine olan ancak Miescher'in tanımladığı protaminden farklı yapıda olan bir protein tanımlamış ve ona histon adını vermiştir [2,23,24]. Miescher'in öğrencisi Richard Altmann ise 1889'da Miescher'in nüklein olarak adlandırdığı yapının yeni bir alt komponentini izole etmiş ve asit gibi davranan bu yapıya "Nucleinsäure" (nükleik asit) adını vermiştir [25]. Kossel yaptığı yeni çalışmalarla nükleinin ana yapıtaşlarını (pürin ve pirimidin bazları, bir şeker ve fosforik asit) tanımlamış ve bu maddelerin hücre çekirdeği ile sınırlı olduğunu doğrulamıştır [23]. Nükleik asitler de dahil olmak üzere proteinler üzerine yaptığı çalışmalarla hücre biyolojisinin anlaşılmasına sağladığı katkılardan dolayı 1910 yılında Kossel'e Nobel ödülü verilmiştir [2,26,27]. Günümüzde ise nüklein ya da nükleik asit yerine DNA'nın modern ismi olan "deoksiribonükleik asit" terimi kullanılmaktadır.

Sonraki yıllarda nükleik asitlere olan ilgi kısmen azalmış olsa da ilk olarak 1906 yılında Hermann Steudel tarafından öne sürülen ve Phoebus Levene tarafından geliştirilen tetranükleotit hipotezi ile yeni bir dönem başlamıştır [2,24]. Levene 1919'da DNA'nın baz, şeker (deoksiriboz) ve fosfat ünitelerinden oluştuğunu ve fosfat-şeker-baz yapısının birbiri ile bağlantılı olduğunu bulmuş ve bu üçlü yapıyı nükleotit olarak adlandırarak nükleotit birimlerinin de fosfat grupları aracılığıyla birbirlerine bağlanarak bir dizi oluştuğunu öne sürmüştür [2]. Ancak, Levene zincirin kısa olduğunu ve eşit oranlarda baz içeren, sabit ve tekrarlayıcı dizilerden oluştuğunu düşünüyordu. Torbjorn Caspersson ve Einar Hammerstein ise 1934 yılında DNA'nın sanıldığı gibi kısa bir molekül olmadığını ve polimerik yapıda olduğunu göstermişlerdir [28]. Tetranükleotit hipotezi doğruysa DNA tek tip monomerlerden oluşan bir molekül olmalıydı ve bu nedenle onun yapıtaşları genetik bilgiyi kopyalamak için uygun olmayacaktı. Tetranükleotit hipotezinin popüleritesi DNA'ya olan ilginin proteinlere yönelmesine neden olmuştur, çünkü farklı yaşam formları arasındaki kusursuz çeşitliliğin nedeni olarak 20 farklı aminoasit ve bunların kombinasyonları daha güçlü bir aday olarak görülüyordu [2,29]. Ancak Erwin Chargaff ve arkadaşları 1949 ve 1951 yılları arasında farklı

organizmalardan elde edilen DNA'ların baz içeriklerini kromatografik yöntemler ile inceledikleri çalışmalarının sonunda baz içeriğinin türler arasında farklılıklar gösterirken, aynı tür içinde sabit bir orana (aynı sayıda adenin ve timin, aynı sayıda guanin ve sitozin) sahip olduğunu belirleyerek tetranükleotit hipotezini çürütmüşlerdir [30,31].

Bazı araştırmacılar ise DNA'nın X ışını kırınım paternlerini (kristalografik veriler) inceleyerek bu molekülün üç boyutlu yapısını açıklamaya çalışmıştır. DNA'nın düzenli bir yapıya sahip olduğunu gösteren ilk X-ışını kırınım paternleri 1937 yılında William Astbury tarafından gösterilmiştir [32]. Devam eden yıllarda DNA'nın yapısını tanımlamak için üç ayrı araştırma grubu çeşitli çalışmalar yapmıştır [33]. Proteinlerin X-ışını kırınım paternlerini inceleyerek onların fiziksel yapılarını modellemeye çalışan Linus Pauling liderliğindeki ilk grup (*California Institute of Technology*) 1948 yılında birçok proteinin helikal şekiller içerdiğini keşfetmiştir [34]. Pauling proteinler üzerine yaptığı çalışmalarda olduğu gibi X ışını kırınım paternlerini inceleyerek DNA'nın üç boyutlu yapısını açıklamaya çalışmış ve 1953 yılında DNA'nın üç zincirli sarmal yapıda olabileceğine dair doğru olmayan bir önermede bulunmuştur [35]. Aynı dönemde Londra'da (*King's College London*) bulunan Maurice Wilkins ve ona sonradan katılan Rosalind Franklin de X-ışını verileri üzerinden DNA yapısını açıklamaya çalışıyordu. Franklin 1952'de saf DNA örneklerini kullandığı çalışmaların sonunda daha gelişmiş X-ışını verileri elde etmiş ve Astbury'nin 1937'de gösterdiği X-ışını kırınım paternlerinin varlığını doğrulamıştır. Franklin elindeki sonuçlara dayanarak DNA'nın sarmal yapılı bir molekül olabileceği sonucuna varmış, fakat yapısını ayrıntılı olarak ortaya koyamamıştır [36]. Üçüncü grupta yer alan James D. Watson ve Francis Crick (*Cambridge Üniversitesi*) ise önceki araştırmacıların çalışmalarından ortaya çıkan X-ışını kırınım paternleri ve nükleotitleri oluşturan moleküllerin kimyasal yapıları üzerinde çalışıp spesifik bağlantı noktalarını belirlemek suretiyle (metal çubuklar ve toplar kullanıp fiziksel modeller inşa ederek) 1953 yılında DNA'nın orijinal yapısını tanımlamışlardır. Watson-Crick modeline göre DNA komplementer baz çiftlerinden (A=T ve G≡C)

oluşan "double-helix" yapılı bir moleküldü [37]. Watson ve Crick yaptıkları çalışmalar nedeniyle (*Franklin'in ölümünden sonra*) 1962'de Nobel ödülü almışlardır [27].

DNA'nın Görevlerinin Açıklanması

Bilim adamları bir yandan DNA yapısını açıklamak için araştırmalar yaparken, diğer yandan da DNA'nın fonksiyonlarını ortaya koymaya çalışmışlardır. Kossel yaptığı deneylerle nükleinin enerji kaynağı veya deposu olarak işlev görmediğini, bunun yerine çoğalma ve yenilenme sırasında yeni protoplazmanın sentezi ile ilişkili bir molekül olduğu sonucuna varmıştır [38]. Genetik bilginin moleküler yapılarca taşındığını ve aktarılabilir olduğunu destekleyen ilk belirgin kanıt ise Frederick Griffith'ten gelmiştir. Griffith 1928 yılında yaptığı bir deneyde pnömokokların öldürülmüş "S (*smooth*)" formları ile aynı bakterinin canlı ama kapsülsüz olan "R (*rough*)" formlarını karıştırarak bakterilerin kapsül oluşturma özelliklerinin kapsülsüz formdaki bakterilere transfer edilebileceğini göstermiştir (*transformasyon prensibi*) [39]. Bir diğer önemli çalışmayla da belirli proteinlerin spesifik genler ile ilişkili olduğu ortaya konmuştur [40]. George Wells Beadle ve Edward Lawrie Tatum 1941 yılında bir mantarı (*Neurospora crassa*) X ışınlarına maruz bırakarak genetik mutasyonlara neden oldular. Sonra belirli mutasyonların sonucunda (enzimlerde meydana gelen bozukluklar nedeniyle) belirli metabolik aktivitelerin etkilendiğini gözlemlemişler ve her genin kendi ürününü (proteinini) ürettiğini öne sürerek (*bir gen bir enzim hipotezi*) 1958'de Nobel ödülü almışlardır [27]. Oswald Avery, Colin MacLeod ve Maclyn McCarty'nin 1944 yılında DNA'nın genetik bilgiyi taşıdığını kanıtlamaları ise moleküler genetik ve biyolojinin önemli dönüm noktalarından biri olmuştur [2,3]. Avery ve arkadaşları çalışmalarında kalıtsal özelliklerin saflaştırılmış DNA kullanılarak bir bakteriden diğerine, ya da bölünme sonucu oluşan yavru bakterilere transfer edilebileceğini ilk kez göstermişlerdir. Kalıtım için proteinlerin gerekliliği fikrinde olan araştırmacılar kritik bir dönüm noktası olan bu buluşa şüphe ile yaklaşarak önemini kısmen azaltmışlardır. Çünkü, DNA'yı oluşturan nükleik asitlerin kompozisyonu göz

önüne alındığında onlara göre, gerçekte bu moleküller genetik bilgiyi taşımak gibi kompleks bir şeyden sorumlu olmak için çok basitti. Bununla beraber Avery'nin araştırmalarının sonucu çok açıktı; "nükleik asitler (DNA) bir organizmanın genetik yapısından sorumludur" [5]. DNA'nın kalıttaki rolü ve genetik bilgi taşıdığı 1952 yılında Alfred Hershey ve Martha Chase tarafından da konfirme edilmiştir. Hershey-Chase deneyi ile *Escherichia coli* T2 bakteriyofajının üremesinde DNA'nın genetik materyal olarak rol oynadığı açıkça ortaya konmuştur [41]. Moleküler biyolojiye katkıları nedeniyle 1969 yılında Hershey Nobel ödülü almıştır [27]. DNA'nın genetik özelliklerin aktarımından nasıl sorumlu olabildiği sorusunun cevabı ise Watson ve Crick tarafından DNA'nın üç boyutlu yapısı ve genetik kod hakkındaki tanımlamaları ile çözülmüştür [5].

Watson ve Crick 1953 yılındaki bu modellemelerinden 2 ay sonra DNA için baz çiftlerinin hidrojen bağları ile spesifik olarak bağlanmasına dayalı semikonservatif replikasyon modelini önermişlerdir [42]. Bu ikinci modele göre replikasyonla meydana gelen çift zincirli her DNA molekülü biri orijinal DNA'dan gelen eski zincir ve diğeri onun üzerinden sentezlenen yeni komplementer zincir olmak üzere iki zincirden oluşmaktaydı. DNA replikasyonu için konservatif ve dispersif modeller de öne sürülmüştür. Ancak, 1958 yılında *E. coli* hücrelerinin işaretli azot moleküllerini kullanması prensibine dayalı Meselson-Stahl deneyi ile çift sarmal yapının semikonservatif mekanizma ile replike olduğunu doğrulanmıştır [43]. Aynı yıllarda (1957-1958) Herbert Taylor ve arkadaşları otoradyografi tekniği ile semikonservatif DNA replikasyonunun ökaryotlar için de geçerli olduğunu kanıtlayarak Meselson-Stahl deneyini tekrarlamışlardır [44]. DNA replikasyonunun anlaşılmasına yönelik çalışmalar yapan Arthur Kornberg ve arkadaşları ise 1957'de ilk DNA polimerazı (DNA polimeraz I) *E. coli*'den ayırttıklarını bildirmişlerdir [45]. Kornberg ve arkadaşları DNA polimeraz I'in varlığında *in vitro* DNA sentezi için dört tip deoksiribonükleozit trifosfat (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) ve kalıp DNA'ya gereksinim olduğunu göstermişler ve bu buluş DNA replikasyonunun daha açık bir şekilde anlaşılmasını sağlamıştır ve bu keşfinden dolayı 1959'da Kornberg'e Nobel

ödülü verilmiştir [27]. Bu bilgiler ışığında 1960'ların ortalarında Robert W. Holley, Har Gobind Khorana, Heinrich Matthaei, Marshall W. Nirenberg ve arkadaşları tarafından üç bazın yan yana gelmesi ile oluşan kodonların amino asitleri kodladığı (*genetik kod*) çözülmüştür. Genetik kodu ve protein sentezindeki fonksiyonlarını yorumlamalarından dolayı 1968'de Holley ve Khorana'ya Nobel ödülü verilmiştir [2,5,27,46].

RNA'nın Keşfi ve İlk Çalışmalar

DNA ve RNA'yı oluşturan farklı kimyasal yapılara dair ilk bilgiler 1903'te Levene tarafından açıklanmış olsa da 1900'lü yılların başlarında yapılan ilk çalışmalarda DNA ve RNA arasındaki biyolojik farklılıklar açık olarak bilinmiyordu. 1930'lardan sonra kimyasal tanı testleri kullanılarak nükleik asitlerin iki farklı karbonhidrat içerdiği gösterilmiş ve RNA için ortak isim olarak "ribonükleik asit" tanımı kullanılmıştır. Nükleozit bileşim analizleri ile RNA'nın DNA ile benzer nükleobazlar içerdiği, ancak RNA'da timin yerine urasil ve küçük miktarlarda pseudouridine ve dimetilguanin bulunduğu gösterilmiştir [47,48]. Severo Ochoa ve arkadaşları 1955 yılında nükleotit difosfatazların polimerleşmesini katalize etmek için onlardan bir fosfat grubunu parçalayabilen bir enzim (polinükleotit fosforilaz) tanımladıklarına dair bir bildiri yayımlamıştır [49]. Nükleik asit sentezinde yer alan bir enzimin ilk kez izole edildiği bu çalışma sonraki yıllarda homojen nükleotit polimerlerin üretilmesine kapı açmıştır. RNA sentez mekanizmasını açıklayan Ochoa'ya 1959 yılında Nobel ödülü verilmiştir [27]. Bununla beraber, Ochoa'nın bulduğu ve polinükleotit fosforilaz olarak adlandırmak istediği enzimin gerçekte bir polimeraz değil ribonükleaz olduğu sonradan anlaşılmıştır. RNA polimerazlar ise ilk olarak 1959'da Sam Weiss ve 1960'da Jerard Hurwitz tarafından, birbirlerinden bağımsız olarak keşfedilmiştir [50].

Crick protein sentezi ve nükleik asitler arasındaki ilişkiyi araştırırken DNA (ve RNA)'nın uzayan bir polipeptit zincirine 20 aminoasitten birini spesifik olarak bağlamak için çok fazla düzenli bir yapıya sahip olduğunu fark etmiş ve 1957'de "adaptör hipotezini" öne sürmüştür. Buna göre spesifik RNA kodları ve aminoasitler arasında bilgi aktarımında rol alan bir ara molekül

(günümüzde tRNA olarak bilinen) olmalıydı [51,52]. Crick ilk olarak 1957'de bir toplantıda dile getirdiği ve 1958'de yayımladığı bir makale ile genetik bilginin DNA (veya RNA)'dan proteinlere aktarıldığını, ancak ters yönde bir bilgi akışının olmadığını ifade eden "moleküler biyolojinin santral dogması" fikrini öne sürmüştür [53].

1950'lerin sonunda ortaya çıkan mesajcı RNA kavramı Crick'in öne sürdüğü "santral dogma" fikri ve Crick ile Sidney Brenner'in beraber tanımladığı kodon kavramıyla ilişkilidir [54]. Francois Jacob ve Jacques Monod 1961 yılında, bazı proteinlerin ekspresyonunu diğer genler üzerindeki belirli bölgelerin düzenlendiğini göstermiş ve DNA ve protein ürünler arasında aracı rol oynadığını varsaydıkları bu moleküllere mesajcı (*messenger*) RNA ismini vermişlerdir [55]. Genlerin (bakteri ve virüslerde) nasıl regüle edildiği konusunda yaptıkları analizler nedeniyle Jacob ve Monod 1965'te Nobel ödülü almışlardır [5,27]. DNA'nın içerdiği bilgiler ve proteinler arasındaki ilişki (*genetik kod*) 1961-1965 yılları arasında açık olarak tanımlanmıştır. Warner ve Rich 1964'de ribozomların protein sentezinde aktif rol oynadığını göstermiş ve mRNA kodlarını ribozomlara aktaran soluble RNA moleküllerinin (tRNA) fonksiyonlarını açıklamaya çalışmışlardır [56]. tRNA yapısıyla ilgili ilk önemli bilgiler ise 1965 yılında Holley ve arkadaşlarından gelmiştir [57]. Araştırmacılar tRNA moleküllerini izole edip ve sekanslamış ve elde ettikleri birkaç tRNA dizisine dayalı olarak yonca yaprağı yapısı olarak bilinen bir şema çıkarmışlardır. Holley'in bildirisinden birkaç yıl sonra Levitt (1969) 14 farklı tRNA sekansını inceleyerek tRNA için bir tersiyer yapı tanımlamıştır [58]. Sonraki yılında çeşitli gruplar tRNA yapısını açıklamak için tRNA kristalleri ürettiyseler de sınırlı kalitedeki bu kristalografi paternleri tRNA yapısını belirlemek için yeterli verileri sağlamamıştır [59]. Susman ve arkadaşları 1978'de tRNA'nın kristal yapısını tanımlamayı başarmışlar ve Holley'in yonca yaprağı tanımlamasını ve Levitt'in tersiyer etkileşimlerini doğrulamışlardır [60]. 1981'de tRNA moleküllerinin sekonder yapıları ortaya konmuştur [61]. tRNA'nın yapısal biyolojisinin açık olarak tanımlanması RNA fonksiyonlarının anlaşılmasında önemli bir basamak olmuş ve 1990'ların ortalarında nükleik asitler üzerine

yapılan araştırmalarda önceki yıllara kıyasla belirgin bir artış görülmüştür.

David Baltimore tarafından 1970 yılında RNA'dan DNA kopyalarının sentezlenmesine olanak sağlayan ters transkriptazların keşfi ile genler ve protein sentezi arasındaki ilişkileri açıklayan "santral dogma" fikrinin tersi yönünde de bilgi aktarımının mümkün olabildiği gösterilmiştir [62]. Baltimore bu keşfi ile 1975'de Nobel ödülü almış ve 2010 yılı itibarıyla RNA çalışmalarını içeren deneysel çalışmaları nedeniyle Nobel ödülü kazanan bilim adamı sayısı 30'a ulaşmıştır [27].

Son zamanlarda çift sarmallı RNA'nın gen-spesifik susturmaya (RNA interferans veya RNAi) neden olduğu bulunmuştur [63-65]. Deneysel olarak ilk defa 1998'de *Caenorhabditis elegans*'ta dsRNA'nın, gen ekspresyonunu spesifik ve selektif olarak inhibe ettiğini gösterilmiş ve bu olaya RNA interferansı (RNAi) adı verilmiştir. Bugün RNAi funguslar, bitkiler, omurgasızlar, memeliler gibi birçok türde gösterilmiştir [66-68]. Kısa, sentetik RNA dublekslerinin memeli hücrelerinde RNAi'na yol açabildiğinin gösterilmesi hücre biyolojisinin anlaşılması için çok güçlü bir araç olmuştur. Gen tedavisi için kritik önem taşıyan bu konudaki çabaların çoğu "antisens stratejisi" olarak tanımlanan bir mekanizmaya dayalıdır. Bu strateji uygun bir dizi ile hibridizasyon varlığında translasyonun engellenmesi veya bir RNA-DNA hibridinin RNaz H-aracılı yıkımı tetikleyebilmesi prensiplerini içermektedir [51].

Deneysel DNA Sentezi ve Hibridizasyon

DNA yapısının ve çalışma akışının aydınlatılmasından sonra araştırmacılar kimyasal gen sentezi yapılabilmesi için yoğun çabalar sarf etmişlerdir. İlk olarak Michelson ve Todd 1955 yılında ilk in-vitro dinükleotit (ditimidil, pTpT) sentezini yaptıklarına dair bir rapor yazmıştır [69]. Ancak sentezledikleri bu yapı çok stabil değildi. 1957'de oligonükleotitlerin fosfonat sentezi gerçekleştirilmiştir [70]. Sonraki yıllarda Khorana, Letsinger ve Carruthers ve diğer araştırmacılar tarafından fosforamidit ve fosfit triester metotlarının geliştirilmesi ve oligonükleotit sentezinin katı faz üzerinde yapılmasına olanak sağlayan yaklaşımların geliştirilmesi (1965) ile daha uzun ve stabil oligonükleotitlerin

sentezlenebilmesi mümkün olmuştur [6,51]. Oligonükleotit sentezinin başarılı olarak yapılabilmesi ve bazı genlerin nükleik asit dizi verilerinin (*sekans motifleri*) belirlenmesi yarı-sentetik hibridizasyon problemlerinin tasarlanmasına olanak sağlamıştır. Komplementer dizilerin varlığında onlarla hibridize olan bu problemler kompleks nükleik asit karışımları içinde spesifik RNA ve DNA parçalarının tespit edilmesi ve tanımlanmasını sağlamıştır [71]. Hibridizasyon tekniklerinin öncüsü sayılabilecek ilk uygulamalar ise 1960'lı yıllarda yapılmış ve 1969 yılında nükleik asitleri hedef dokular ya da hücreler içinde (ekstrakte etmeye gerek olmaksızın) tespit etmeye imkan veren "in situ hibridizasyon" (ISH) tekniği tanımlanmıştır [72].

Sonraki yıllarda restriksiyon enzimleri keşfedilmiş (1970) ve bu enzimlerin hibridizasyon metodları ile kombine edildiği yeni teknikler geliştirilmiştir. Edwin Southern tarafından 1975 yılında ilk blotlama tekniği olan Southern blotlama tekniği tanımlanmıştır [73]. Alwine, Kemp ve Stark tarafından da 1977 yılında Southern blotlama ile benzer bir yöntem olan Northern blotting yöntemi geliştirilmiştir [74]. Bu tekniğinin Southern blotlamadan major farklılığı bu yöntemin DNA'dan ziyade RNA analizinde kullanılması ve RNA'nın sekonder yapısını açabilmek için ekstra basamaklara gereksinimi olmasıdır [5]. Nükleik asitler arasındaki hibridizasyon varlığının görüntülenmesi için ilk zamanlar radyoaktif işaretler-etiketler kullanılırken, sonraki yıllarda önemli bir dezavantaj olan radyoaktif etiketlerin yerini çeşitli non-radyoaktif kimyasallar (kolorimetrik, kemo-floresan) almıştır. Radyoaktif olmayan ISH teknikleri 1977 ve 1980'li yıllarda geliştirilmiştir [75,76]. 1980'lerin ortalarına kadar Southern blot hibridizasyon yöntemi çoğu moleküler tanı laboratuvarının önemli bir parçası olmuştur. Ancak, uygulama zorluklarının yanında düşük duyarlılıklı olmaları nedeniyle hibridizasyon prensibine dayalı bu ilk yöntemlerin klinik yararları sınırlı kalmıştır [6,71,77].

Amplifikasyon Teknikleri

Düşük titreli viral enfeksiyonların, lösemili hastalarda minimal rezidüel hastalık varlığının, genlerdeki nokta mutasyonlarının veya

tümörlerdeki genetik bozuklukların tespiti gibi düşük sayılı moleküllerin algılanmasının klinik olarak önemli olduğu durumlar saptama duyarlılığı çok daha güçlü olan yeni testlerin geliştirilmesi için itici bir güç olmuştur. Bu amaçla, saptama öncesinde hedef nükleik asitlerin veya hedefi saptama amacıyla kullanılan sinyallerin veya problemlerin çoğaltılması (*amplifikasyonu*) prensibine dayalı yeni yaklaşımlar geliştirilmiştir. Böylece DNA ve RNA tespit protokollerinde sınırlayıcı bir adım olan hibridizasyon-prob algılama protokollerinin duyarlılık sorunları aşılmıştır [71,78]. Amplifikasyon tekniklerinden en yaygın kullanılanı ise polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemi olmuştur. Bu yöntemin tarihçesi bir sonraki başlıkta ele alınmıştır. Bir taraftan PCR ürünlerini saptamak ve tanımlamak için PCR ile diğer yöntemlerin kombinasyonunu içeren yeni yöntemler geliştirilirken, diğer taraftan farklı amplifikasyon ve tespit sistemleri tanımlanmıştır (Tablo 1). PCR işleminin başlangıcında revers transkriptazların kullanıldığı bir ön basamak ile RNA kantitasyonu da mümkün olmuştur [5].

1990'lardan itibaren nükleik asit hedeflerin doğrudan amplifikasyonu (transkripsiyon bazı amplifikasyon, 3SR), nükleik asitlere hibridize olan problemlerin amplifikasyonu (Qb replikaz, LCR; ligaz zincir reaksiyonu) ve sinyal amplifikasyonu (bDNA, hibrit capture) prensipleri ile çalışan test sistemleri geliştirilmiştir [7,9,17,71,78].

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Genetik kodun çözülmesinde büyük katkıları olan Khorana, DNA tamir mekanizmalarını inceleyerek sentetik oligonükleotit üretimi için çalışmalar yapıyordu (*Khorana projesi*) [46]. Khorana bu çalışmalarının birinde 1971'de DNA polimerazın tekrarlayan aplikasyonlarını (uygulamalarını) içeren ve PCR'dan farklı olarak tek bir primer-kalıp kompleksinin oluştuğu ve bu nedenle amplifikasyonla sonuçlanmayan bir yöntem tanımlamıştır [79]. Aynı tarihlerde (1971) Khorana'nın laboratuvarındaki araştırmacılar Kleppe ve arkadaşları çift zincirli DNA'nın bir bölgesini kopyalamak için iki adet DNA sentez primerinin kullanıldığı PCR'a çok benzeyen farklı bir yöntem tanımlamışlardır [80]. Fakat primer sentezi ve polimeraz saflaştırılmasındaki problemler nedeniyle çalışmalar sınırlı kalmış ve

takip eden 12 yıl içinde bu yaklaşımların tekrarlanarak amplifikasyon formatında kullanılması düşünülmemiştir. Kary Mullis 1983 yılı baharında Kuzey Kaliforniya dağları arasından geçtiği bir gece yolculuğu boyunca "Güzel bir fikir bazen sen onun için bakmıyorken geliverir" sözlerini düşünürken bir hesaba başlamış ve aklına onu PCR'ı geliştirmeye sevk eden bir ilham gelmiştir. PCR işleminin pratik yönleri Mullis'in çalıştığı Cetus Corporation şirketi tarafından geliştirilmiş ve nihayetinde Mullis 1991 yılında 300 milyon dolar karşılığında PCR için tüm haklarını bu şirkete devretmiştir [81]. PCR'ın mucidi Kary Mullis 1993 yılında Nobel ödülü almıştır [27].

PCR başlangıçta *E. coli*'den izole edilen bir non-termostabil DNA bağımlı DNA polimeraza (*Klenow parçası*; *E. coli* DNA polimeraz I) dayanmaktaydı. DNA polimeraz I Klenow parçasının kullanıldığı PCR ile ilgili ilk makale 1985 yılında yayımlanmıştır [82]. Bu polimeraz non-termostabil doğası nedeniyle her PCR döngüsünden sonra ısı ile inaktive oluyordu. İlk PCR işleminin tarif edilmesinden 10 yıl kadar önce tanımlanmış olan termostabil DNA polimerazların PCR teknolojisinde kullanılmaya başlanması ile DNA bağımlı DNA polimerazların her PCR döngüsünden sonra inaktive olması sorunu çözülmüş ve zahmetli ve kontaminasyon riski taşıyan bir prosedür olan her döngü sonrasında taze enzim ekleme işlemleri artık gereksiz hale gelmiştir [71]. Bu yeni gereksinime cevap olarak üretilen ısı döngü cihazları (*thermal cycler*) 1986'lardan sonra kullanılmaya başlanmıştır. Yüksek sıcaklıklarda yaşayabilen bir bakteri türü olan *Thermus aquaticus*'tan izole edilen *Taq* DNA polimeraz'ın PCR'da kullanıldığını açıklayan ilk makale ise 1988 yılında yayımlanmıştır [83]. Amplifikasyon ürünlerinin devam eden reaksiyon ile eşzamanlı görüntülenmesi ve kantitasyonuna imkan veren real-time PCR konsepti 1992-93 yıllarında gündeme gelmiş ve günümüzde yaygın olarak kullanılmaktadır [71,77,81].

Restriksiyon Endonükleazlar

Moleküler tanının bir diğer önemli aracı ise bakteriyel restriksiyon-modifikasyon sistemlerinin bir parçası olan restriksiyon enzimlerini kullanan yöntemlerdir. Restriksiyon enzimleri ile ilgili ilk çalışmalar Werner Arber tarafından yapılmıştır

[84,85]. Hamilton Smith ve arkadaşları DNA'yı kesen ilk restriksiyon enzimini 1970 yılında *Haemophilus influenzae*'dan izole etmişlerdir [86]. Restriksiyon enzimlerinin keşfi moleküler genetik alanında önemli uygulama kolaylıkları sağladığı gibi, moleküler tanı için de yeni seçenekler sunmuştur. Kelly ve Smith'in [87] 1970 yılında yaptıkları restriksiyon enzimlerinin sekans spesifitesi ile ilgili çalışmalar ve Danna ve Nathans'ın [88] 1971'de restriksiyon enzimlerini kullanarak viral DNA'nın restriksiyon fragmanlarını karakterize etmeleri bu konulardaki önemli çalışmalardır. Restriksiyon enzimleri üzerine yaptıkları çalışmalar Arber, Smith ve Nathans'a 1978 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır [27]. Restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı önemli bir tanı aracı olan RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)'nin insan hastalıklarını kapsayan gen haritalamadaki ilk kullanımı David Botstein [89] tarafından yapılmıştır. Şimdilerde ise RFLP sadece hastalıklara yönelik gen haritalanmasında değil adli vakalarda DNA örneklerinin kesin identifikasyonu gibi farklı alanlarda da kullanılmaktadır [5].

Dizi Analizi Teknikleri

İlk zamanlar daha küçük dizilemelerde kullanılan dizi analizi yöntemleri son yıllarda büyük ölçekli dizileme projeleri için anahtar olmuştur. DNA dizi analizi yapmak için ilk zamanlarda iki ana yöntem geliştirilmiştir. Bunlar kimyasal metot olarak bilinen Maxam-Gilbert metodu [90] ve enzimatik zincir-sonlandırma metodu (ddNTPs, *dideoksi dizileme*) olarak bilinen Sanger dizileme [91] teknikleridir. Tanımladıkları nükleik asit sekanslama metotlarının bilim dünyasına önemli katkıları nedeniyle Gilbert ve Sanger 1980'de Nobel ödülü almışlardır [27].

DNA dizi analizi ile ilk olarak 1977'de bir bakteriyofajın tam genom dizisi belirlenmiştir [92]. Daha sonraki yıllarda dizileme çalışmaları devam etmiş ve 1995'te ilk bakterinin (*Haemophilus influenzae*), 1996'da ilk ökaryotun (*Saccharomyces cerevisiae*), 2000'de meyve sineğinin (*Drosophila melanogaster*) tam genom dizileri belirlenmiştir [93-95]. İnsan genom projesine 1991 yılında başlanmış ve 2003-2005 yılları arasında insan genomunun neredeyse tamamı dizilenmiştir [5,6]. Günümüzde ise hızlı ve

yüksek kapasiteli yeni nesil dizi analizi teknikleri kullanılmaktadır [12].

Moleküler Genetik Uygulamaların Gelişimi

Sentetik oligonükleotitler ve oligonükleotit analogları ile yapılan uygulamalar tedavi amacı da dahil olmak üzere gen ekspresyonunun modülasyonu ve gen manipülasyonu için kolaylıklar sağlamıştır. Bu gelişmenin yanında spesifik restriksiyon enzimlerinin keşfi ile gen klonlanma çalışmalarının yolu açılmıştır. DNA'nın manipüle edilmesiyle başlayan süreçlerin sonunda moleküler tekniklerin insan hastalıklarının genetik temelini çözmeye yardım etme gücünün farkına varılmıştır. Böylece hormonların, enzimlerin ve diğer proteinlerin doğal kaynaklarından saflaştırılmaları yerine onların sentezi yoluna gidilmiş ve biyoteknoloji endüstrisi için yeni bir çağ başlamıştır. Laboratuvar ortamında hormonların tek seferde bol miktarda üretilmesi ile çeşitli hastalıkların tedavisi pratik bir hale gelmiştir [5]. Rekombinant DNA için ilk fikir Stanford Üniversitesi'nden Prof. Dale Kaiser'in öğrencisi Peter Lobban (bir yüksek lisans öğrencisi) tarafından ortaya atılmıştır. İlk rekombinant DNA molekülünün hücre içi replikasyonu ve üretimi ise 1972 ve 1973 yıllarında başarılı olarak gerçekleştirilmiştir [96-98]. Rekombinant DNA çalışmaları Poul Berg'e 1980 yılında Nobel ödülü kazandırmıştır [5,27].

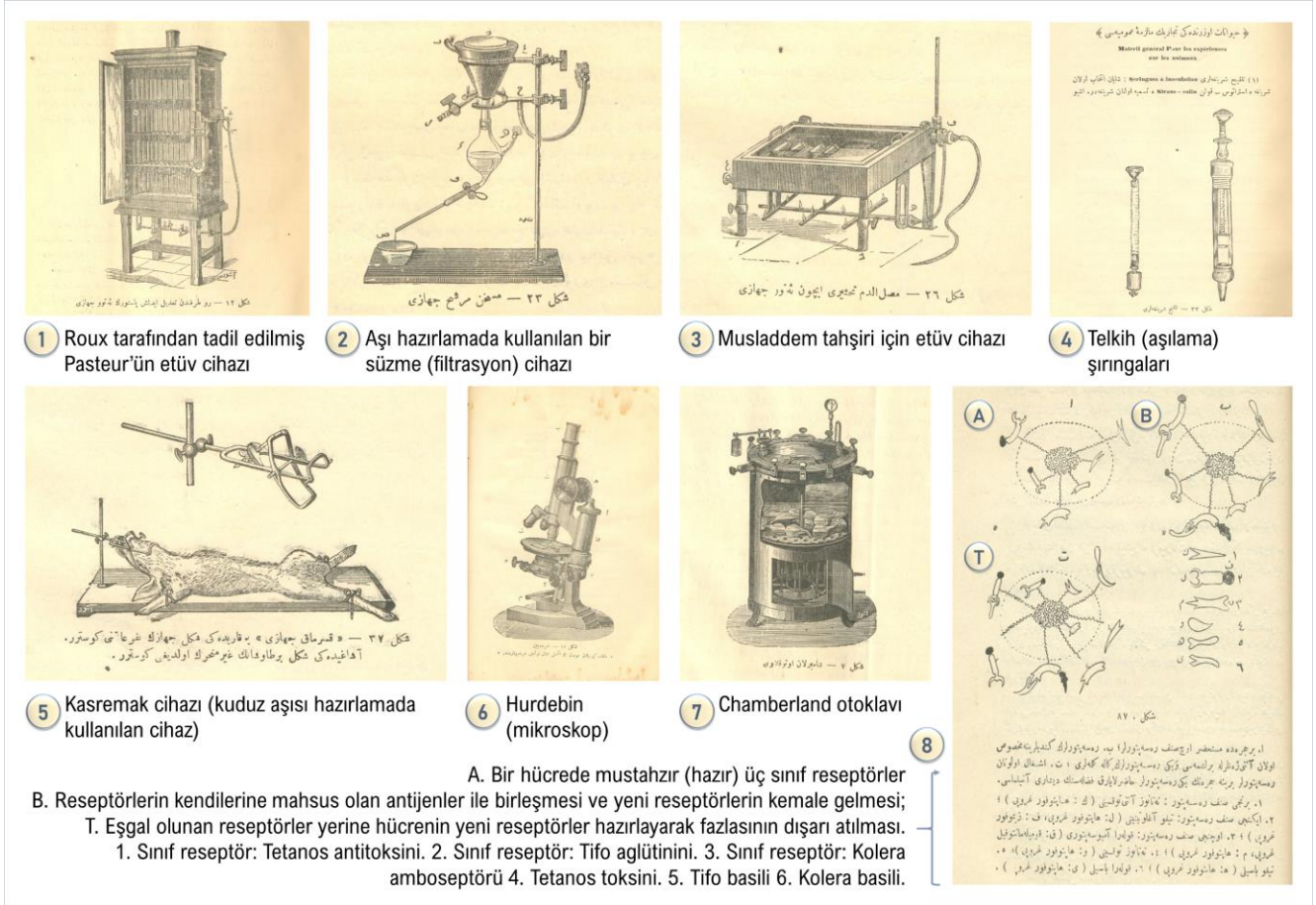
Genetik modifiye bakterilerin (*Escherichia coli*) kullanılmasıyla 1977 yılında ilk rekombinan insan hormonu (*somatostatin*) sentezlenmiştir [99]. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen genetik modifiye bakterilerin kullanıldığı ilk lisanslı ilaç olan insan insülini (*Humulin*) 1982 yılında Genentech tarafından üretilmeye başlanmıştır [100]. 1983'te bir mayaya ait 2 megabazlık ilk yapay kromozom sentezlenmiştir [101]. İskoç bilim adamlarının 1997'de erişkin bir koyundan bir koyun (*Dolly*) klonlamaları genetik bilimine yeni bir boyut daha getirmiştir [4].

Sonuç

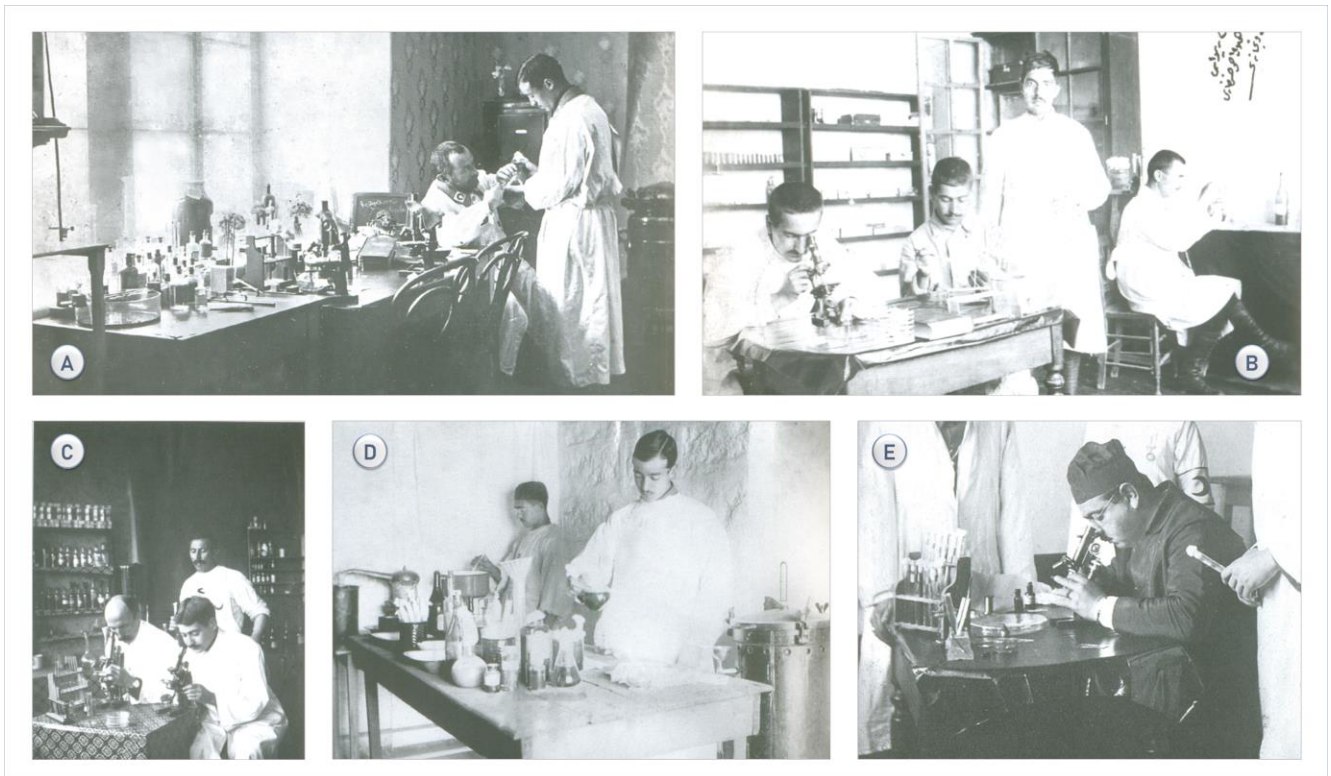
Bu makalede bir asır önceki temel teknikler ve nispeten basit cihazların (Resim 1 ve 2) yardımı ile yapılan ilk keşiflerden başlayarak günümüzde yaygın olarak kullanılan ileri tekniklerin geliştirilmesine uzanan süreçte hangi fikirlerin birbirine yardım ettiğini ve bugünün pratik araçlarının hangi çabaların sonunda bizlere ulaştığını anlamamıza yardımcı olabilecek kısa bir tarihçe sunulmuştur. Bilgiye erişimin kolaylaştığı ve teknolojik altyapı ve araştırma imkanlarının yaygınlaştığı günümüzde genç fikirlerin ve sınır konulmamış kabiliyetlerin doğru hedeflere odaklanması halinde gelecekte insanlığa hizmet edecek yeni keşifleri görebilir veya bir parçası olabiliriz.

Tablo 1: Moleküler tekniklerin gelişiminde önemli keşifler [2,5,6,77,102-104].

Tarih (yıl)	Önemli gelişmeler ve keşifler	Tarih (yıl)	Önemli gelişmeler ve keşifler
1869-71	DNA'nın bulunması ve izole edilmesi	1984	Polimeraz zincir reaksiyonunun keşfi
1953	DNA'nın üç boyutlu yapısı tanımlandı	1984	DNA parmak izi analizi
1957	Kısa oligonükleotitlerin fosfonat sentezi	1985-86	Termotabil DNA polimerazlar
1957	DNA polimerazların keşfi ve izolasyonu	1986	Otomatize DNA dizi analizi
1959-60	RNA polimerazların keşfi ve izolasyonu	1986	Floresan in situ hibridizasyon (FISH)
1965	Katı faz oligonükleotit sentezi	1988	MALDI-TOF kütle spektrofotometresi
1965	Kısa RNA'ların enzimatik sentezi	1988-91	DNA çip konseptinin başlangıcı
1969	İn-situ hibridizasyon tekniği	1989-91	Termofilik DNA ligazlar ve LCR
1970	Restriksiyon enzimlerinin keşfi	1991	Peptit nükleik asit problemleri (PNA)
1970	Ters (reverse) transkriptazların keşfi	1992	Strand-displacement amplifikasyon (SDA)
1975	Southern blotting tekniği tanımlandı	1992-93	Real-time PCR
1977	DNA dizi analizi yöntemleri	1992-93	Branched (dallı zincirli) DNA
1978-80	RFLP analizi tekniği geliştirildi	1996	Moleküler fener (<i>beacon</i>) problemleri
1984	Pulsed Field Gel Elektroforezi (PFGE)	1996	DNA çip (DNA mikroarray) uygulamaları



Resim 1. 19. Yüzyıl'ın sonlarında başta Avrupa ülkeleri ve Osmanlı İmparatorluğu hastane ve laboratuvarlarında aşı geliştirme çalışmaları, antijen-antikor etkileşimlerinin araştırılması ve temel biyolojik testler ve analizlerde kullanılan bazı cihaz ve ekipmanlar [105,106].



Resim 2. A, C, D: 19. Yüzyılın sonlarında Hilal-i Ahmer (Kızılay) tarafından kurulan ilk hastanelerden bazılarının bakteriyoloji laboratuvarları. B: Erzurum Sivas Osmanlı Hilal-i Ahmer Hastahanesi Mikrophanesi. E: Başhekim Dr. Sever Kamil Bey laboratuvarında çalışırken. [107,108]

Çıkar beyanı: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemiştir. **Finansal Destek:** Bu çalışmaya finansal destek verilmemiştir.

Kaynaklar

1. Schacherer J. Beyond the simplicity of Mendelian inheritance. *C R Biol* 2016; 339(7-8): 284-8. [[Crossref](#)]
2. Dahm R. Discovering DNA: Friedrich Miescher and the early years of nucleic acid research. *Hum Genet* 2008; 122(6): 565-81. [[Crossref](#)]
3. Avery OT, MacLeod CM, McCarty M. Studies of the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* Type III. *J Exp Med* 1944; 79(2): 137-58. [[Crossref](#)]
4. Turner L. A sheep named Dolly. *CMAJ* 1997; 156(8): 1149-50.
5. Corley RB. Detection and Analysis of Nucleic Acids (Chapter 2). In: Corley RB (ed), *A Guide to Methods in The Biomedical Sciences*. 2005, Springer, New York. pp:25-38.
6. Tsongalis GJ, Silverman LM. Molecular diagnostics: a historical perspective. *Clin Chim Acta* 2006; 369(2): 188-92. [[Crossref](#)]
7. Handricks DA, Comanor L. Signal Amplification-Based Techniques. In: Lorincz A (ed), *Nucleic Acid Testing for Human Disease*. 2006, CRC/Taylor & Francis, New York. pp.19-64.
8. Warford A, Pringle JH, Hay J, Henderson SD, Lauder I. Southern blot analysis of DNA extracted from formal-saline fixed and paraffin wax embedded tissue. *J Pathol* 1988; 154(4): 313-20. [[Crossref](#)]
9. Yan L, Zhou J, Zheng Y, Gamson AS, Roembke BT, Nakayama S, et al. Isothermal amplified detection of DNA and RNA. *Mol Biosyst* 2014; 10(5): 970-1003. [[Crossref](#)]
10. Prakash O, Verma M, Sharma P, Kumar M, Kumari K, Singh A, et al. Polyphasic approach of bacterial classification - An overview of recent advances. *Indian J Microbiol* 2007; 47(2): 98-108. [[Crossref](#)]
11. Harth E, Romero J, Torres R, Espejo RT. Intragenomic heterogeneity and intergenomic recombination among *Vibrio parahaemolyticus* 16S rRNA genes. *Microbiology* 2007; 153(Pt 8): 2640-7. [[Crossref](#)]
12. Goldberg B, Sichtig H, Geyer C, Ledebor N, Weinstock GM. Making the Leap from Research Laboratory to Clinic: Challenges and Opportunities for Next-Generation Sequencing in Infectious Disease Diagnostics. *mBio* 2015; 6(6): e01888-15. [[Crossref](#)]
13. Lamoril J, Bogard M, Ameziame N, Deybach JC, Bouizegarène P. Biologie moléculaire et microbiologie clinique en 2007: Généralités - Partie 1 Molecular biology in clinical microbiology in 2007 - Part 1. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2007; 22(1): 5-18. [[Crossref](#)]
14. Lau TV, Tan JMA, Puthuchear SD, Puah SM, Chua KH. Genetic relatedness and novel sequence types of clinical *Aeromonas dhakensis* from Malaysia. *Braz J Microbiol* 2020. [[Crossref](#)]
15. Hoza AS, Mfinanga SG, Moser I, König B. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Tanga, Tanzania: First insight of MIRU-VNTR and microarray-based spoligotyping in a high burden country. *Tuberculosis (Edinb)* 2016; 98: 116-24. [[Crossref](#)]
16. Matsumoto T, Tsuchihashi Z, Ito C, Fujita K, Goto M, Furuichi Y. Genetic Diagnosis of Werner's Syndrome, a Premature Aging Disease, by Mutant Allele Specific Amplification (MASA) and Oligomer Ligation Assay (OLA). *Journal of Anti-Aging Medicine* 1998 [2009]; 1(2): 131-40. [[Crossref](#)]
17. Self-sustained sequence replication (3SR): an isothermal transcription-based amplification system alternative to PCR. Fahy E, Kwok DY, Gingeras TR. *PCR Methods Appl* 1991; 1(1): 25-33. [[Crossref](#)]
18. Chernesky MA. Nucleic acid tests for the diagnosis of sexually transmitted diseases. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1999; 24(4): 437-46. [[Crossref](#)]
19. Miescher F. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 1871; 4: 441-60.
20. Plósz P. Ueber das chemische Verhalten der Kerne der Vogelund Schlangenblutkörperchen. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 1871; 4: 461-2.
21. Hoppe-Seyler F. Ueber die chemische Zusammensetzung des Eiters. *Medicinisch-chemische Untersuchungen* 1871; 4: 486-501.
22. Miescher F. Das Protamin - Eine neue organische Basis aus den Samenfäden des Rheinlachs. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 1874; VII: 376.
23. Portugal FH, Cohen JS. A century of DNA, A History of the Discovery of the Structure and Function of the Genetic Substance. 1977, MIT, Cambridge. pp. 6-30.
24. Olby RC. The path to the double helix: the discovery of DNA. 1994, Dover Publications, Mineola.
25. Altmann R. Ueber Nucleinsäuren. *Arch Anat Phys* 1889: 524-36.
26. Jones ME. Albrecht Kossel, a biographical sketch. *Yale J Biol Med* 1953; 26(1): 80-97.
27. Nobel Prize Organisation, The official website of the Nobel Prize, All Nobel Prizes, Oslo, Norway. Available at: <https://www.nobelprize.org/prizes/lists/all-nobel-prizes> [Accessed May 5, 2020].
28. Charles H. Calisher. Sequences vs viruses: producer vs product, cause and effect. *Croat Med J* 2007; 48(1): 103-6.

- 29.** Levene P, The structure of yeast nucleic acid. *J Biol Chem* 1919; 40 (2): 415-24.
- 30.** Chargaff E, Vischer E, Doniger R, Green C, Misani F. The composition of the desoxypentose nucleic acid of thymus and spleen. *J Biol Chem* 1949; 177: 405-16.
- 31.** Chargaff E. Structure and function of nucleic acid as cell constituent. *Fed Proc* 1951; 10: 654-59.
- 32.** Astbury WT. X-ray studies of nucleic acids. *Symp Soc Exp Biol* 1947; 1: 66-76.
- 33.** Klug A. The discovery of the DNA double helix. *J Mol Biol* 2004; 335(1): 3-26. [[Crossref](#)]
- 34.** Pauling L. X-ray diffraction studies of amino acids, peptides and proteins. First International Poliomyelitis Conference, New York, July 12-17, 1948, 7 pages. [Filed under: LP Publications, 1948 p.19]
- 35.** Pauling L, Corey RB. A Proposed Structure For The Nucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1953; 39(2): 84-97. [[Crossref](#)]
- 36.** Franklin RE, Gosling RG. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 1953; 172(4369): 156-7. [[Crossref](#)]
- 37.** Watson JD, Crick FH. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171(4356): 737-8. [[Crossref](#)]
- 38.** Kossel A. Beziehungen der Chemie zur Physiologie. In: Meyer Ev (ed), *Die Kultur der Gegenwart, ihre Entwicklung und ihre Ziele: Chemie.* 1913, Teubner, Leipzig. pp:376-412.
- 39.** Griffith F. The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* 1928; 27(2): 113-59. [[Crossref](#)]
- 40.** Beadle GW, Tatum EL. Genetic Control of Biochemical Reactions in *Neurospora*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1941; 27(11): 499-506. [[Crossref](#)]
- 41.** Hershey A, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952; 36(1): 39-56. [[Crossref](#)]
- 42.** Watson JD, Crick FH. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 1953; 171(4361): 964-7. [[Crossref](#)]
- 43.** Meselson M, Stahl FW. The replication of DNA in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1958; 44(7): 671-82. [[Crossref](#)]
- 44.** Griffiths AJF. The Structure and Replication of DNA (Chapter 8). In: Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbart MW (eds), *An Introduction to Genetic Analysis* (7th edition). 2000, W. H. Freeman, New York.
- 45.** Lehman IR, Bessman MJ, Simms ES, Kornberg A. Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. I. Preparation of substrates and partial purification of an enzyme from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1958; 233(1): 163-70.
- 46.** Khorana HG. Polynucleotide synthesis and the genetic code. *Fed Proc* 1965; 24(6): 1473-87.
- 47.** Allen FW. The Biochemistry of the Nucleic Acids, Purines, and Pyrimidines. *Annual Review of Biochemistry* 1941; 10: 221-44. [[Crossref](#)]
- 48.** Siekevitz P, Zamecnik PC. Ribosomes and protein synthesis. *J Cell Biol* 1981; 91(3Pt2): 53s-65s. [[Crossref](#)]
- 49.** Grunberg-Manago M, Ortiz PJ, Ochoa S. Enzymatic synthesis of nucleic acidlike polynucleotides. *Science* 1955; 122(3176): 907-10. [[Crossref](#)]
- 50.** Furth JJ, Hurwitz J, Anders M. The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. I. The purification and properties of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem* 1962; 237: 2611-9.
- 51.** MacMillan AM. Fifty years of "Watson-Crick". *Pure Appl Chem* 2004; 76(7-8): 1521-4. [[Crossref](#)]
- 52.** Yamane T, Cheng TY, Sueoka N. Species Specificity of Amino Acid Transfer-RNA and Amino Acyl T-RNA Synthetase. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1963; 28: 569-78. [[Crossref](#)]
- 53.** Crick FH. The biological replication of macromolecules. *Symp Soc Exp Biol* 1958; 12: 138-63.
- 54.** Crick FH, Barnett L, Brenner S, Watts-Tobin RJ. General nature of the genetic code for proteins. *Nature* 1961; 192 (4809): 1227-32. [[Crossref](#)]
- 55.** Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961; 3: 318-56. [[Crossref](#)]
- 56.** Warner JR, Rich A. The number of soluble RNA molecules on reticulocyte polyribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; 51(6): 1134-41. [[Crossref](#)]
- 57.** Holley RW, Apgar J, Everett GA, Madison JT, Marquisee M, Merrill SH, et al. Structure of a ribonucleic acid. *Science* 1965; 147(3664): 1462-5. [[Crossref](#)]
- 58.** Levitt M. Detailed molecular model for transfer ribonucleic acid. *Nature* 1969; 224(5221): 759-63. [[Crossref](#)]
- 59.** Kim SH, Rich A. Single crystals of transfer RNA: an X-ray diffraction study. *Science* 1968; 162(3860): 1381-4. [[Crossref](#)]
- 60.** Sussman JL, Holbrook SR, Warrant RW, Church GM, Kim SH. Crystal structure of yeast phenylalanine transfer RNA. I. Crystallographic refinement. *J Mol Biol* 1978; 123(4): 607-30. [[Crossref](#)]
- 61.** Noller HF, Woese CR. Secondary structure of 16S ribosomal RNA. *Science* 1981; 212(4493): 403-11. [[Crossref](#)]
- 62.** Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970; 226(5252): 1209-11. [[Crossref](#)]
- 63.** Han H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol* 2018; 1706: 293-302. [[Crossref](#)]
- 64.** Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature* 2004; 431(7006): 338-42. [[Crossref](#)]

65. Lundstrom K. Coronavirus Pandemic-Therapy and Vaccines. *Biomedicines* 2020; 8(5): pii.E109. [[Crossref](#)]
66. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391(6669): 806-11. [[Crossref](#)]
67. Ding SW, Han Q, Wang J, Li WX. Antiviral RNA interference in mammals. *Curr Opin Immunol* 2018; 54:109-14. [[Crossref](#)]
68. Rosa C, Kuo YW, Wuriyanghan H, Falk BW. RNA Interference Mechanisms and Applications in Plant Pathology. *Annu Rev Phytopathol* 2018; 56: 581-610. [[Crossref](#)]
69. Michelson AM, Todd SR. Nucleotides part XXXII. Synthesis of a dithymidine dinucleotide containing a 3': 5'-internucleotidic linkage. *J Chem Soc* 1955; 2632-8. [[Crossref](#)]
70. Hall RH, Todd A, Webb RF. Nucleotides. Part XLI. Mixed anhydrides as intermediates in the synthesis of dinucleoside phosphates. *J Chem Soc* 1957; 3291-6. [[Crossref](#)]
71. van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP. The Polymerase Chain Reaction (Chapter 1). In: van Pelt-Verkuil E, van Belkum A, Hays JP (eds), *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. 2008, Springer, New York. pp:1-7.
72. Pardue ML, Gall JG. Molecular hybridization of radioactive DNA to the DNA of cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1969; 64(2): 600-4. [[Crossref](#)]
73. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98(3): 503-17. [[Crossref](#)]
74. Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5350-4. [[Crossref](#)]
75. Bauman JG, Wiegant J, Borst P, van Duijn P. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by in situ hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res* 1980; 128(2): 485-90. [[Crossref](#)]
76. Rudkin GT, Stollar BD. High resolution detection of DNA-RNA hybrids in situ by indirect immunofluorescence. *Nature* 1977; 265(5593): 472-3. [[Crossref](#)]
77. Patrinos GP, Ansorge W. Molecular Diagnostics: Past, Present, and Future (Chapter-1). In: Patrinos GP, Ansorge W (eds), *Molecular Diagnostics*. 2005, Elsevier, San Diego, California. pp:1-11.
78. Şahiner F, Gümral R. Sinyal amplifikasyon teknikleri ve tanısal virolojideki uygulamaları. *J Ist Faculty Med* 2019. [[Crossref](#)]
79. Panet A, Khorana HG. Studies on polynucleotides. The linkage of deoxyribopolynucleotide templates to cellulose and its use in their replication. *J Biol Chem* 1974; 249(16): 5213-21.
80. Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol* 1971; 56(2): 341-61. [[Crossref](#)]
81. McPherson MJ, Moller SG. An introduction to PCR (Chapter 1). In: McPherson MJ, Moller SG (eds), *PCR: The Basics*. 2000, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK. pp:1-7.
82. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985; 230(4732): 1350-4. [[Crossref](#)]
83. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239(4839): 487-91. [[Crossref](#)]
84. Arber W, Linn S. DNA modification and restriction. *Annu Rev Biochem* 1969; 38: 467-500. [[Crossref](#)]
85. Roberts RJ. How restriction enzymes became the workhorses of molecular biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(17): 5905-8. [[Crossref](#)]
86. Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol* 1970; 51(2): 379-91. [[Crossref](#)]
87. Kelly TJ Jr, Smith HO. A restriction enzyme from *Hemophilus influenzae*. II. *J Mol Biol* 1970; 51(2): 393-409. [[Crossref](#)]
88. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68(12): 2913-7. [[Crossref](#)]
89. Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 1980; 32(3): 314-31.
90. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(2): 560-4. [[Crossref](#)]
91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74(12): 5463-7. [[Crossref](#)]
92. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson AR, Fiddes CA, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977; 265(5596): 687-95. [[Crossref](#)]
93. Feldmann H, Aigle M, Aljinovic G, André B, Baclet MC, Barthe C, et al. Complete DNA sequence of yeast chromosome II. *EMBO J* 1994; 13(24): 5795-809. [[Crossref](#)]
94. Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, et al. Life with 6000 genes. *Science* 1996; 274(5287): 546-567. [[Crossref](#)]

- 95.** Adams MD, Celniker SE, Holt RA, Evans CA, Gocayne JD, Amanatides PG, et al. The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. Science 2000; 287(5461): 2185-95. [[Crossref](#)]
- 96.** Cohen S, Chang A, Boyer H, Helling R. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A 1973; 70(11): 3240-4. [[Crossref](#)]
- 97.** Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical Method for Inserting New Genetic Information into DNA of Simian Virus 40: Circular SV40 DNA Molecules Containing Lambda Phage Genes and the Galactose Operon of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A 1972; 69(10): 2904-9. [[Crossref](#)]
- 98.** Lobban PE, Kaiser AD. Enzymatic end-to-end joining of DNA molecules. J Mol Biol 1973; 78(3): 453-71. [[Crossref](#)]
- 99.** Itakura K, Hirose T, Crea R, Riggs AD, Heyneker HL, Bolivar F, et al. Expression in *Escherichia coli* of a chemically synthesized gene for the hormone somatostatin. Science 1977; 198(4321): 1056-63. [[Crossref](#)]
- 100.** Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. Science 1983; 219(4585): 632-7. [[Crossref](#)]
- 101.** Murray AW, Szostak JW. Construction of artificial chromosomes in yeast. Nature 1983; 305(5931): 189-93. [[Crossref](#)]
- 102.** Jeffreys AJ, Wilson V, Thein SL. Individual-specific 'fingerprints' of human DNA. Nature 1985; 316(6023): 76-9. [[Crossref](#)]
- 103.** Schwartz DC, Cantor CR. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. Cell 1984; 37(1): 67-75. [[Crossref](#)]
- 104.** Gut IG. DNA analysis by MALDI-TOF mass spectrometry. Hum Mutat 2004; 23(5): 437-41. [[Crossref](#)]
- 105.** Ali Süreyya, Salim Tevfik (eds). Usul-i Teşhis-i Seriri (3. baskı). 1330 (1914), Tıp ve Fen Kütüphanesi, Kader Matbaası, İstanbul.
- 106.** Aziz Hamdi (ed). Ameli ve Nazari Bakteriyoloji Dersleri. 1322 (1906), Mektebi Tıbbiye-i Şahane Matbaası, İstanbul.
- 107.** Yurdakul ES. Kızılay'ın İlk Hastaneleri (1877-1878): Yatan Hastalarda Görülen Enfeksiyonlar ve Mortalite Oranları. Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi 2019; 49(2): 104-12. [[Crossref](#)]
- 108.** Ataç A. Besim Ömer Paşa (Besim Ömer Akalın Hatıra Albümü). 2011, Roche Müstahzarları, Ankara.