

Bölüm 3

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİLERİ

Perçin PAZARCI¹

GİRİŞ

Rekombinant DNA (rDNA) teknolojisi, farklı organizmalardan alınan genetik materyalin çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılarak kesilip daha sonra elde edilen DNA parçalarının birleştirilmesi sonucu normalde biyolojik organizmalarda var olmayan DNA dizilerinin elde edilmesine dayanan bir teknolojidir(1). İlk bakışta imkansız gibi görünen bu teknoloji tüm canlılarda bulunan DNA'nın aynı kimyasal yapıya sahip olmasından dolayı mümkündür ve aslında bu teknolojinin temeli olan rekombinasyon canlı organizmalarda sıkça görülür ve canlılar arasındaki çeşitliliğin en önemli etkenlerinden biridir(2).

Moleküler düzeyde rekombinasyon, farklı nükleotid dizilerine sahip iki DNA molekülünün homoloji gösteren bölgeleri arasında parça alışverişi sonucu meydana gelen yeni gruplamalardır(2). Bu yeni gruplamalar sonucunda orijinal DNA dizisi ile aynı olmayan ancak onlara ait nükleotid dizilerinin bir kısmını barındıran rDNA molekülleri oluşur. Canlılarda ise rekombinasyon eşeyli üremede mayozda gerçekleşen kromozomlar arası parça değişimleri ile, bakterilerde transformasyon, konjugasyon gibi mekanizmalarla meydana gelerek çeşitliliğe katkı sağlar. Hem moleküler düzeyde hem de canlılar düzeyinde bakıldığında rekombinasyonun temeli DNA molekülleri arasında homoloji olmasına dayanmaktadır ve

¹ Dr. Öğr. Üyesi, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji AD,
ppazarci@cu.edu.tr

bu yüzden doğada rekombinasyon aynı türe ait bireyler arasında veya birbirine çok yakın türler arasında meydana gelebilmektedir(3).

Rekombinant DNA teknolojisinde uygulanan yöntemler sayesinde doğada bulunan kısıtlamalar kalkmış, farklı türler arasında DNA rekombinasyonu mümkün hale gelmiş, doğada bulunmayan farklı görevlere sahip proteinlerin üretimi mümkün hale gelmiş, başka bir canlıda sentezlenen proteinin diğer bir canlıda sentezlenebilmesinin önü açılmış ve doğada bulunmayan canlı türlerinin laboratuvarında dizayn edilebilmesine olanak sağlanmıştır(3).

Rekombinant DNA fikri ilk olarak Stanford Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Departmanı'nda öğrenci olan Peter Lobban tarafından ortaya atılmıştır(4). Bu konuda yapılan ilk başarılı çalışmalar ve yayınlar ise 1972-1973 yıllarında yayınlanmıştır(5-7). Yine aynı yıllarda Stanford Üniversitesi tarafından yapılan patent başvurusunda teknolojinin yaratıcısı olarak Stanley N. Cohen ve Herbert W. Boyer'in isimleri gösterilmiştir(8). Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen ilk lisanslı ilaç ise Genentech firması tarafından geliştirilen ve 1983 yılında piyasaya sürülen insülin olmuştur(9).

REKOMBİNANT DNA ELDESİNDE KULLANILAN YÖNTEMLER

Rekombinant DNA elde edilirken uygulanan aşamaları basitçe sıralamak gerekirse(10); öncelikle herhangi bir canlıdan, istenilen özelliklere sahip DNA parçalarının kesilip izole edilmesi gerekir. Daha sonra izole edilen bu DNA parçaları birleştirilir ve ardından vektör adı verilen taşıyıcı özellikteki bir DNA molekülüne bağlanır. Ardından elde edilen rDNA uygun bir konak hücreye yerleştirilir ve çoğaltılır. Son olarak yavru hücrelerde genin ifadesi sağlanır ürün alınır.

Ancak, başarılı bir rDNA üretimi için bu aşamalar gerçekleştirilirken dikkat edilmesi gereken bazı noktalar vardır. Bu noktaları yine yukardaki sırayla ele alırsak(10); ilk olarak yapılan DNA kesiminin tahmin edilebilir ve tekrarlanabilir olması gerekir, kesilen DNA'nın bilinmeyen rastgele parçalar olması kabul edilebilir değildir. İkinci olarak, DNA parçalarının birleştirilirken hangi sırayla birleşecekleri, hangi parçanın nerde bulunacağını kontrol edilebilmesi gereklidir. Üçüncü olarak, kullanılan vektörün iyi bir şekilde amplifiye olabiliyor olması ve çokça kopya üretebilmesi gereklidir. Son olarak gen ifadesi meydana geldiğinde elde ürünün ve bu ürünü üreten hücrelerin çeşitli markerlarla tanımlanabilmesi gereklidir.

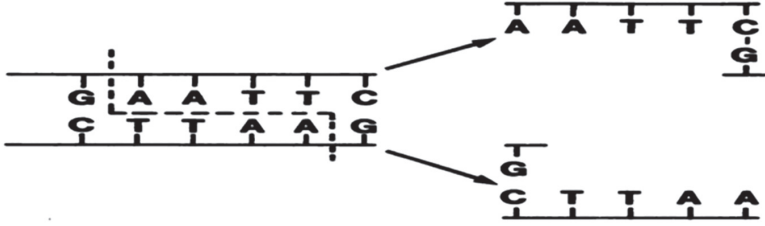
DNA Parçalarının İzole Edilmesi

DNA parçalarının bütün bir DNA'dan kesilip ayrılması için bakterilerden elde edilen, restriksiyon-modifikasyon (R-M) enzimleri adı verilen ve asıl görevi hücreye giren yabancı DNA parçalarını yok ederken hücrenin kendi DNA'sını yaptığı modifikasyonlarla bu etkiden korumak olan enzimler kullanılır(11). Bu enzimler ilk olarak 1960'lı yıllarda keşfedilmiş, 1970'li yıllarda bakterilerden izole edilmeye başlanmıştır ve günümüzde bilinen R-M enzimleri sayısı 3000'i aşmıştır(12-14). Genel olarak restriksiyon enzimleri endonükleazlar (DNA'yı iç bölgelerinden kesen) ve ekzonükleazlardan (DNA'yı ucundan başlayarak kesen) oluşur. Rekombinant DNA uygulamalarında çoğunlukla endonükleazlar kullanılır. Bu enzimler tanıma ve kesim özelliklerine göre 4 gruba ayrılır (Tablo 1).

Tablo 1. R-M enzim grupları ve özellikleri(11)

R-M Enzim Tipleri	Özellikler
Tip I	Tanıma, kesim ve metilasyon işlemlerini farklı alt ünitelerin yaptığı bir tek enzimdir. Tanıma bölgesi ve metilleme bölgesi tektir. Ancak kesim bölgesi tanıma bölgesinden 1000 baza kadar uzak olabilir
Tip II	Aynı simetrik sekans bölgesini yani palindromik dizileri tanıyan iki farklı enzimden oluşur. Bu enzimlerden biri kesim işlemini yaparken diğeri ise modifikasyonla görevlidir. Kesim bölgesi tanıma bölgesinin içerisinde yer almaktadır.
Tip III	Tanıma ve metilasyon işlemlerini yapan bir alt ünite ve kesim işlemini yapan bir alt ünite olmak üzere iki alt ünitesi bulunan tek bir enzimdir. Tanıma ve modifikasyon bölgesi aynıdır ancak kesim bölgesi 26 baza kadar uzak olabilir
Tip IIs	İki farklı enzimden oluşur. Bu enzimlerden biri kesim işlemini yaparken diğeri ise modifikasyonla görevlidir. Tanıma bölgesi asimettir ve kesim bölgesi tanıma bölgesinden 20 baza kadar uzak olabilir

Bu enzim gruplarından en sık kullanılanı Tip II'dir çünkü diğer gruplara karşı bazı avantajları bulunmaktadır. Öncelikle iki farklı enzimden oluşması modifikasyon olmadan sadece kesim yapabilmeyi mümkün kılar. Buna ek olarak bu grup enzimlerin kesim aktiviteleri ATP veya diğer kofaktörlere gereksinim duymadığından kullanım kolaylığı sağlar. En önemli avantajı ise bu tip enzimlerin kesim yerinin tanıma bölgesinin içerisinde olmasıdır. Ayrıca tanıma bölgeleri palindromik olduğundan çapraz şekilde yapışkan uçlu denilen kesim ürünleri ortaya çıkar ve bu da DNA'ların birleştirilmesi aşamasında kolaylık sağlar(11) (Şekil 1).



Şekil 1. Kesim enzimlerinin çapraz kesim sonucu oluşan yapışkan uçlu DNA ürünleri

Tip II kesim enzimleri genellikle 4, 6 veya 8 bazlık simetrik bölgeleri tanırlar ve bu bölgelerde kesimi gerçekleştirirler. Kesilecek olan DNA'nın baş ve son kısımları için uygun kesim enzimleri seçilerek izole edilmek istenen DNA genomun kalan kısmından ayrılabilir(11).

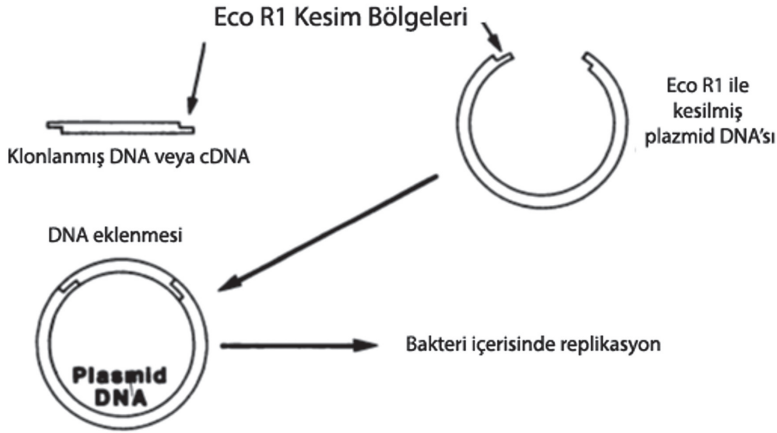
Günümüzde kesim enzimlerine ek olarak istenen DNA parçalarının eldesi için mekanik cihazlarla parçalama, cDNA'dan istenilen DNA'nın elde edilmesi, direk olarak kimyasal yollarla istenilen DNA'nın sentezlenmesi gibi metotlar da gerekli olduğunda kullanılmaktadır ancak bunlar kesim enzimlerine göre gerek maliyet olarak gerekse daha çok teknik bilgi istemesinden dolayı ikinci plandadır(11).

İstenilen DNA parçalarının bakterilerden eldesi için kesim enzimleriyle uygulanan prosedürler yeterli olurken ökaryotlardan istenilen DNA parçalarının eldesi için cDNA'ların kullanılması gerekebilir. Bilindiği üzere ökaryot DNA'lar bakterilerden farklı olarak intron bölgeleri içerir. Gerekli prosedürler uygulanarak elde edilen rDNA'ların protein ürünlerinin son olarak genellikle bakterilerden elde edildiği düşünüldüğünde bu intron bölgelerinin oluşturulacak yeni rDNA'da bulunması istenmeyen bir durumdur. Bu sorunun önüne geçmek için ökaryotların genetik materyalinden oluşturulacak rDNA'lar için cDNA'lar kullanılır. cDNA'lar te-

mel olarak intron bölgesi içermeyen, genin translasyona yani son protein üretimine hazır hali olan mRNA'ların reverse-transkriptaz enzimiyle çoğaltılmasıyla elde edilirler. Günümüzde birçok genin cDNA dizilerinin bulunabileceği cDNA kütüphaneleri oluşturulmuştur(11).

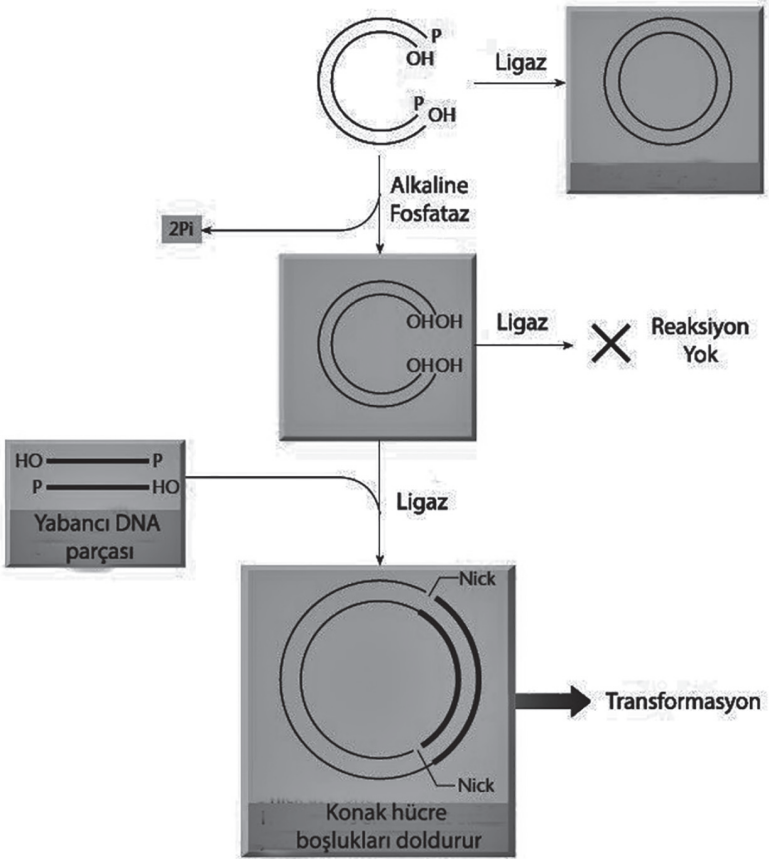
DNA Parçalarının Birleştirilmesi ve Vektörlere Aktarılması

İstenilen DNA parçaları elde edildikten sonra, bu parçaların son ürünü vereceği hücrede translasyon mekanizmasına dahil olabilecek şekilde birleştirilmesi gerekir. Elde edilen DNA parçaları bu aşamada genel olarak vektör adı verilen plazmid DNA'sı veya virüs DNA'sıyla birleştirilir. Birleştirme işlemi için birçok farklı durumda uygulanabilecek farklı metotlar geliştirilmiştir. En basit yöntem olarak istenilen genin aktarılacağı vektörün de çoğaltılacak DNA ile aynı R-M enzimiyle kesilmesi sonucu vektör ve çoğaltılacak DNA'da ortaya çıkan ve birbirlerinin komplementeri olan çapraz kesim bölgelerinden yararlanılmaktadır(11) (Şekil 2).



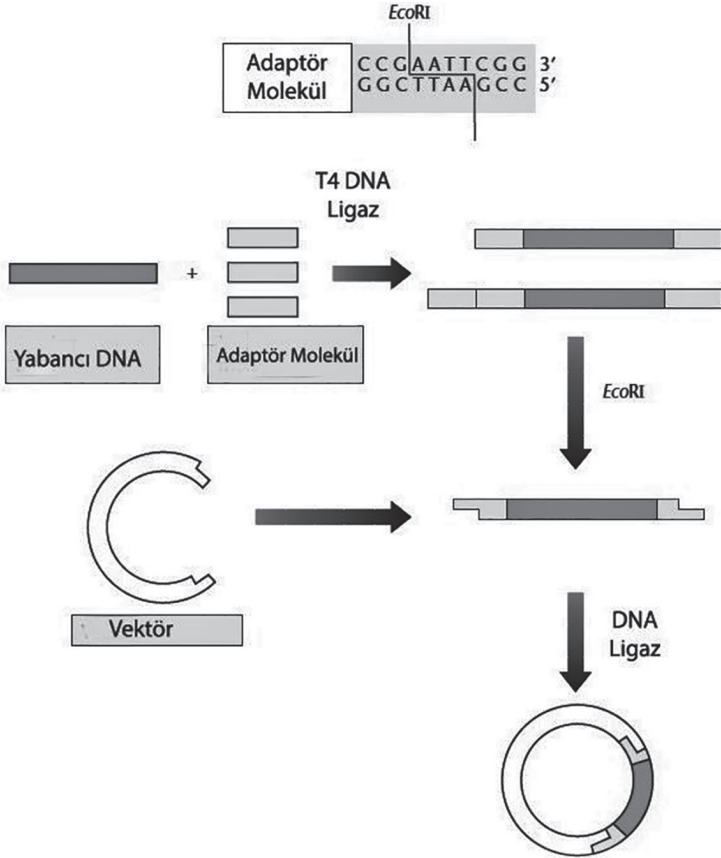
Şekil 2. Çapraz kesim ürünlerinin birbirini tanınması ve birleşmesi

Kesim işlemleri sonucu ortaya çıkan çapraz uçlu DNA'lar birbirleriyle birleşebileceği gibi tekrar eski hallerine de dönebilirler. Genel olarak bu rekombinasyonun verimini düşüren istenmeyen bir durumdur. Klonlanacak DNA miktarını artırarak verim artırılabilir gibi vektör DNA'sı kesildikten sonra alkaline fosfataz uygulanarak da kendi üzerine katlanması engellenebilir ve verim artırılabilir(11) (Şekil 3).



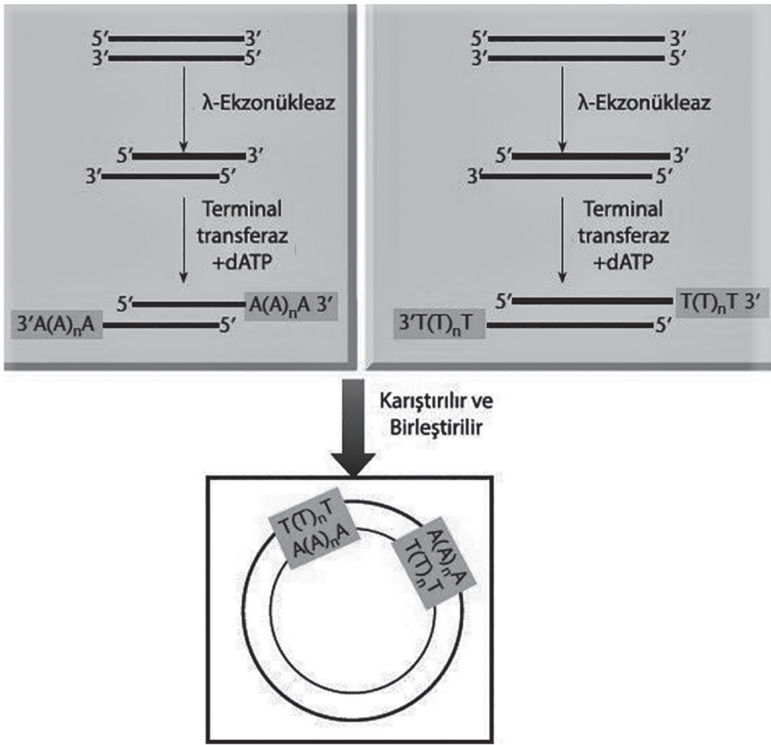
Şekil 3. DNA'nın kendi üzerine katlanmasını engellemek için uygulanan alkaline fosfataz metodu

Birleştirme işlemi yaparken ortaya çıkabilecek diğer bir durum ise klonlanacak DNA'nın ve vektör DNA'sının aynı enzim ile kesilmeye uygun olmadığı durumlardır. Özellikle büyük DNA dizileri klonlanırken ortaya çıkan bu durumda vektör DNA'sının kesimi için uygun olan R-M enzimi klonlanacak DNA'yı uygun bölgelerinden kesmiyor veya iç bölgelerinden de kesiyor olabilir. Bu duruma ise adaptör DNA'lar ile çözüm getirilmiştir. Eğer klonlanacak DNA istenilen R-M enzimi kesim bölgesini taşımıyorsa adaptör moleküller vasıtasıyla bu bölgeler klonlanacak DNA'ya eklenir (Şekil 4).



Şekil 4. Adaptör moleküller vasıtasıyla kesim bölgeleri eklenmesi

Bu yöntemlere ek olarak kullanılan diğer bir birleştirme metodu ise homopolimer kuyruk ekleme metodudur. Bu yöntem genellikle kesilen DNA ürünlerinin yapışkan uçlu olmayıp küt uçlu olduğu durumlarda kullanılır. Bu yöntemde klonlanacak DNA'ya ve vektör DNA'ya birbirini tamamlayan (adenin-timin gibi) homopolimer kuyruklar eklenir ve bu sayede birleşebilen açık uçlar oluşturulur. Bunun için klonlanacak DNA'ya ve vektör DNA'ya λ -ekzonukleaz uygulanarak nükleotidlerin eklenebileceği açık uçlar oluşturulur. Daha sonra bu DNA'lara terminal deoksinükleotid transferaz enzimi kullanılarak homopolimer kuyruklar eklenir ve DNA'lar birleşmeye uygun hale getirilir(11) (Şekil 5).



Şekil 5. Homopolimer kuyruk eklenmesi

rDNA'nın Konak Hücreye Yerleştirilmesi

Konak hücre seçiminde iki önemli kriter vardır. Bunlardan birincisi, konak hücrenin yabancı DNA'ya karşı dirençli olmaması gereklidir. Bilindiği üzere hücreler yabancı DNA'yı karşı tepki gösterirler ve yabancı DNA'ları yıkmak için enzimleri mevcuttur. Seçilecek konak hücrenin aktarılabilecek DNA'yı yıkacak enzimlerden yoksun mutantlar olması gen aktarımının başarısını artırır. Eğer bu durum sağlanamıyorsa, transdüksiyon gibi aktarılan DNA'nın yıkımına karşı dirençli aktarım metodlarının kullanılması gen aktarımının başarısını artırmanın diğer bir yoludur. Bunlara ek olarak konak hücrelerin aktarım enzimlerini inaktive eden kimyasal veya fiziksel koşullara tabi tutularak da gen aktarımının başarısı artırılabilir. Konak hücre seçiminde ikinci önemli nokta ise konak hücrelerine gen aktarımı tamamlandıktan sonra rekombinant hücrelerinin kolay seçimine olanak sağlamasıdır. Bunun için aktarılan genin içerisine çeşitli markerlar (bir antibiyotiğe direnç gibi) eklenebileceği gibi konak hücrenin benzer hücrelerin yaşamadığı ortamda yaşayabilen hücrelerden seçilmesi ile de gen aktarımının başarısı artırılabilir(10).

Elde edilen rDNA yerleştirileceği konak hücrenin tipine göre farklı prosedürlere tabi tutulmaktadır. Eğer kullanılacak konak hücre bakteri ise sıklıkla kullanılan yöntemler transformasyon, transdüksiyondur ve elektroporasyondur. Transformasyon bakterinin yabancı DNA'yı içeri almasıdır. Kimi bakteriler transformasyonu çeşitlilik için bir araç olarak kullanılır ve konak olarak bu bakterilerin seçilmesi durumunda bu yöntem kullanılabilir. Transformasyon yapmayan bakteriler ise kimyasal işlemlerle (kalsiyum klorid uygulaması gibi) transformasyona uygun hale getirilip yabancı DNA'yı hücre içine almaları sağlanabilir(15). Kullanılan diğer bir yöntem olan elektroporasyonda ise bakteri hücrelerine uygun voltajda elektrik akımı uygulanarak hücre çeperi ve hücre zarının açılması sağlanır ve bu sayede yabancı DNA'yı hücre içeri-

sine almaları beklenir(16). Yabancı DNA'ya karşı dirençli (yabancı DNA'yı yıkıma uğratan) konaklarda ve diğer yöntemlerin uygun olmadığı durumlarda kullanılan yöntem ise transdüksiyondur. Transdüksiyon bilindiği üzere virüs DNA'sının hücre içerisine girdikten sonra konak hücrenin genetik materyali ile birleşmesidir. Bu yöntemde elde edilen rDNA ya bir virüs kılıf proteininin içerisine konarak veya vektör olarak virüs DNA'sı kullanılarak bakteri hücresine tanıtılır ve virüs DNA'sının rDNA ile birlikte bakteri hücre sine entegre olması beklenir(17).

Eğer konak olarak kullanılacak hücre bitki veya hayvan hücresi ise bakteri hücreleri için uygulanan tekniklere ek olarak mikro-enjeksiyon ve biyolistik yöntemi kullanılabilir. Mikroenjeksiyon yönteminde rDNA konak hücreye bir iğne yardımı ile yerleştirilir ve hücrenin yabancı DNA'yı kabul etmesi beklenir. Biyolistik yöntemde ise rDNA parçaları altın veya platin parçacıklarına sarılarak gen tabancası adı verilen bir cihazla hücreye atışlanır(18).

Rekombinant Hücrelerin Seçilmesi

rDNA vektör aracılığıyla konak hücrelere aktarıldığında tüm hücrelerin bu rDNA'yı kabul etmesi veya protokolün yüzde yüz başarılı olması tabii ki beklenmemektedir. Uygulanan işlemler sonucunda bazı hücreler vektörü hücre içerisine hiç alamayacak, bazı hücreler vektörü hücre içerisine aldıktan sonra yabancı rDNA'yı parçalayacak, bazı hücrelerde ise rDNA hücreye yerleşmesine rağmen son ürün vermeyecektir. Bu sebeplerden dolayı başarılı şekilde aktarımı tamamlanan ve son ürün verebilen hücrelerin aktarım işleminden sonra seçilmesi gereklidir. Bu seçimi yapmak için daha öncede bahsettiğimiz gibi aktarım aşamasında vektöre eklenen markerlar seçim için kullanılabilir. Örneğin rDNA'ya ek olarak vektöre bağlanmış bir antibiyotik direnç geni rDNA'yı kabul etmiş bakterileri diğerlerinden ayırmakta kullanılabilir. Diğer bir yöntem olarak hem rekombinant hücrelerin seçilmesini sağlayan

hem de son ürün miktarını kontrol etmeyi sağlayabilen metabolizma markerları vektöre eklenebilir. Bu yöntemde konak hücreye diğer hücrelerin metabolize edemediği besinleri metabolize etmesini sağlayan markerlar eklenir. Bu sayede sadece marker besinin bulunduğu ortamda rekombinant hücreler yaşamına devam ederken diğer hücrelerin elenmesi sağlanır. Aynı zamanda marker besinin miktarı kontrol edilerek rekombinant hücrelerin metabolizma hızları ve dolayısıyla son ürün miktarı kontrol edilebilir(11).

REKOMBİNANT DNA TEKNOLOJİLERİNİN TIPTA KULLANIM ALANLARI

Rekombinant DNA teknolojileri günümüzde başta araştırma, ziraat ve tıp olmak üzere sanayi, madencilik, gıda, atık arıtımı, savunma sanayi gibi birçok farklı alanda kullanılmaktadır. Transgenik hayvanların eldesi, daha verimli ve zararlı organizmalara karşı dirençli bitkilerin üretilmesi, katı atıkların kullanılabilir atıklar haline getirilmesi, besleyici gıda ürünlerinin hazırlanması, hastalıkların teşhis ve tedavisi gibi pek çok uygulama alanı bulunmaktadır. Şüphesiz ki bu kullanım alanlarından en önemlilerinden bir tanesi rDNA teknolojilerinin tıptaki uygulama alanlarıdır.

Günümüzde rDNA uygulamaları kullanılarak tedavi için gerekli birçok protein üretilmektedir. Örnek olarak diyabet tedavisinde kullanılan insülin eskiden hayvanlardan elde edilirken bugün neredeyse tamamen bakterilerden elde edilen insülin kullanılmaktadır. Buna ek olarak çeşitli tedavilerde kullanılan HGH, sekretin, kalsitonin, β -endorfin, gastrin, relaxin, EGF, somatostatin gibi birçok peptid hormon eskiden hayvanlardan veya kadavralardan elde edilirken günümüzde bakterilerden elde edilebilmektedir. Hayvan kaynaklarına veya kavadraya göre bu hormonları bakterilerden elde etmenin, maliyetinin çok daha düşük olması, bulaşıcı hastalık riskini minimuma indirmesi, alerjik reaksiyon olasılığını azaltması gibi birçok avantajı bulunmaktadır(10). Bunların yanın-

da, hemofili hastalarının tedavisinde kullanılan ve eskiden birçok farklı donörden alınan çok miktarda insan kanından elde edilen kan pıhtılaştırıcı faktörler (faktör VII, faktör VIII vb.) günümüzde bakterilerden elde edilebilmektedir.

rDNA teknolojileri sayesinde daha önceden tedavi edilemeyen birçok hastalık içinde tedavi geliştirilmiştir. Örnek olarak 4000 de 1 kişide görülen $\alpha 1$ -antitripsin eksikliğine (ephysema hastalığı) tedavi geliştirilmiştir. $\alpha 1$ -antitripsin normalde akciğerlerde çalışan ve görevi akciğerlere giren yabancı maddeleri metabolize etmek olan tripsin enziminin etkisini durdurmak olan bir enzimdir. Karaciğerde üretilir ve kan yoluyla akciğerlere taşınır. $\alpha 1$ -antitripsin enzimini kodlayan geninde bozukluk olan kişilerde bu enzim yeterince sentezlenemez ve bunun sonucunda akciğerlerdeki tripsin enzimi akciğer dokusuna zarar verir. Günümüzde rDNA kullanılarak $\alpha 1$ -antitripsin maya hücreleri içersinde sentezlenip hastalara verilebilmekte ve akciğer dokusundaki hasar oluşumu minimuma indirilebilmektedir(10). Ek olarak Hepatit-B, rahim ağzı kanseri gibi birçok hastalık için üretilen aşılarda rDNA teknolojisi kullanılarak elde edilmiş, mycobakterium, rickettsiae gibi tedavisi zor enfeksiyon hastalıklarına neden olan birçok bakterinin tedavisi için metodlar geliştirilmiş ve laboratuvar ortamında denenmeye başlanmıştır(11).

rDNA teknolojisinin günümüzde tıp alanının en sık uygulanan, kullanılan ve ilgi çeken alanlarından biride hibridoma uygulamaları, monoklonal ve tri-fonksiyonel antikorların üretimidir. Hibridoma uygulaması temel olarak antijene maruz bırakılıp antikor üretmesi sağlanan B-lenfositlerinin, kültür ortamında üreyebilen ve sonsuz bölünme gerçekleştirebilen myeloma hücreleriyle birleştirilmesi sonucu kültür ortamında istenen miktarda monoklonal antikor üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bu monoklonal antikorlar daha sonra tanıdıkları antijen tipine göre birçok hastalık teşhisinde (HPRT eksikliği, AIDS, kanser vs.) kullanılmaktadır. Ayrıca

monoklonal antikorlar kullanılarak hedefe özgü kemoterapi adı verilen, kanser ilaçlarının sadece belirli hedef dokuları etkilemesi için yapılan çalışmalar sürmektedir. Tri-fonksiyonel antikorlar ise yine kanser tedavisinde denenilen ve rDNA teknolojileri kullanılarak üretilen antikorlardır. Temel olarak monoklonal antikorların bir tipi olan trifonksiyonel antikorlar, monoklonal antikorlardan farklı olarak iki farklı antijen içinde bağlanma bölgesi içerirler. Bu sayede bir yandan tümör hücrelerini tanıyabilirken diğer yandan T-hücrelerine ve makrofajlara aynı anda bağlanabilmekte, bu sayede tümör hücrelerini immün yanıt için işaretleyebilmektedir(19).

KAYNAKLAR

1. Sauls CD, Caskey CT. Applications of Recombinant DNA to Pathologic Diagnosis. *Clinical Chemistry*. 1985;31(6):804-811.
2. Chao W. Recombinant DNA: Genes and genomes - A short course. *Scientist*. 2007;21(4):65-65.
3. Oliver S. Principles of Gene Manipulation - an Introduction to Genetic-Engineering. *Nature*. 1986;319(6056):803-803.
4. Lear J. *Recombinant DNA: The Untold Story*. 1 ed. New York: Crown Publishers; 1978. p. 43.
5. 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):2904-2909.
6. Cohen SN, Chang AC, Boyer HW, et al. Construction of biologically functional bacterial plasmids in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1973;70(11):3240-3244.
7. Lobban PE, Kaiser AD. Enzymatic end-to end joining of DNA molecules. *J Mol Biol*. 1973;78(3):453-471.
8. Hughes SS. Making dollars out of DNA. The first major patent in biotechnology and the commercialization of molecular biology, 1974-1980. *Isis*. 2001;92(3):541-575.
9. Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*. 1983;219(4585):632-637.
10. Cederbaum SD, Fareed GC, Lovett MA, et al. Recombinant DNA in medicine. *West J Med*. 1984;141(2):210-222.

11. Primrose SB, Twyman RM, Old RW. *Principles of gene manipulation*. 6th ed. Oxford ; Malden, MA: Blackwell Science; 2001. vi, 390 p. p.
12. Arber W. Promotion and limitation of genetic exchange. *Science*. 1979;205(4404):361-365.
13. Smith HO, Wilcox KW. A restriction enzyme from *Haemophilus influenzae*. I. Purification and general properties. *J Mol Biol*. 1970;51(2):379-391.
14. Roberts RJ, Vincze T, Posfai J, et al. REBASE--enzymes and genes for DNA restriction and modification. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(Database issue):D269-270.
15. Sisco KL, Smith HO. Sequence-specific DNA uptake in *Haemophilus* transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(2):972-976.
16. Melikov KC, Frolov VA, Shcherbakov A, et al. Voltage-induced nonconductive pre-pores and metastable single pores in unmodified planar lipid bilayer. *Biophys J*. 2001;80(4):1829-1836.
17. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. *Cell*. 1976;9(4 PT 2):695-705.
18. Klein TM, Wolf ED, Wu R, et al. High-Velocity Microprojectiles for Delivering Nucleic-Acids into Living Cells. *Nature*. 1987;327(6117):70-73.
19. Muller D, Kontermann RE. Bispecific antibodies for cancer immunotherapy: Current perspectives. *BioDrugs*. 2010;24(2):89-98.

