

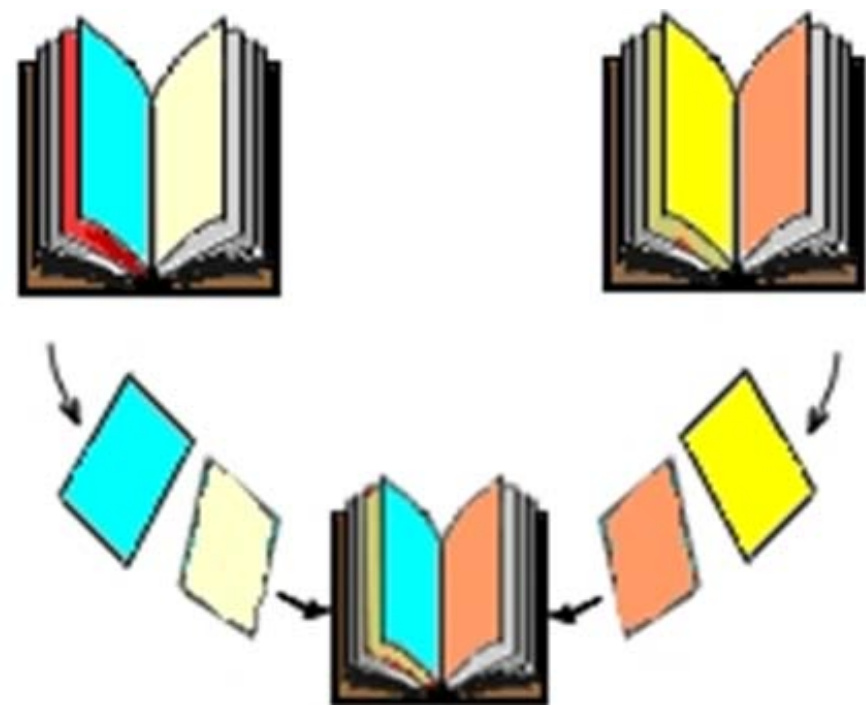
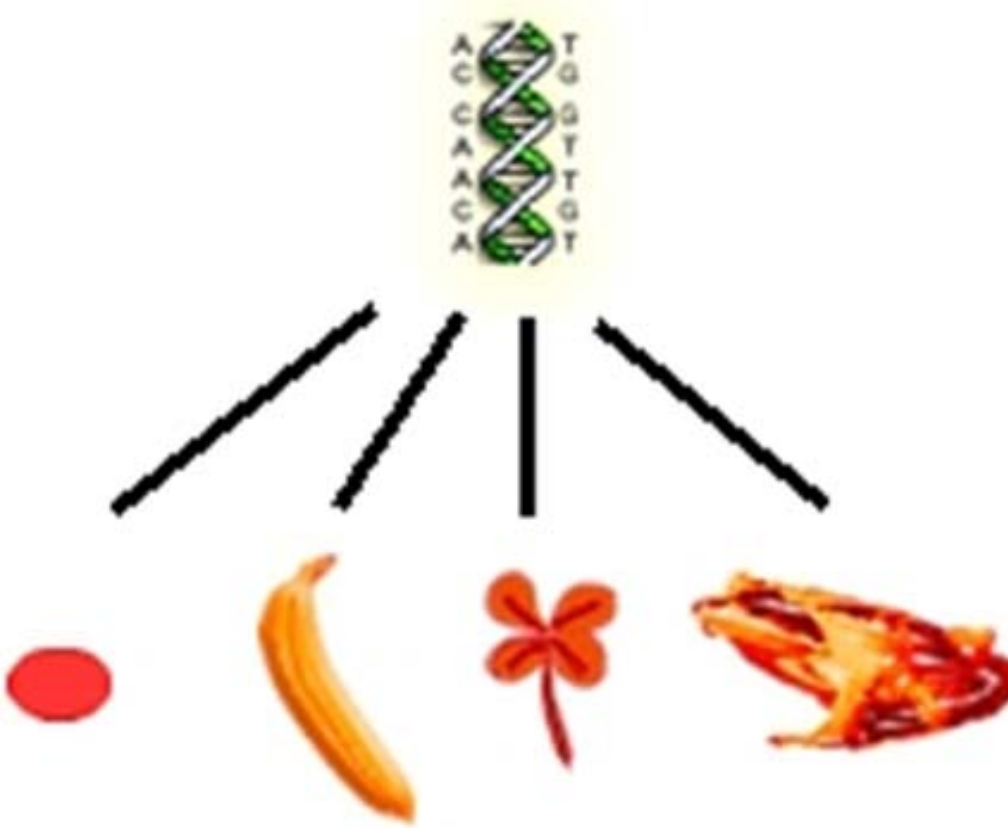
GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

DOÇ. DR. MEHMET KARACA

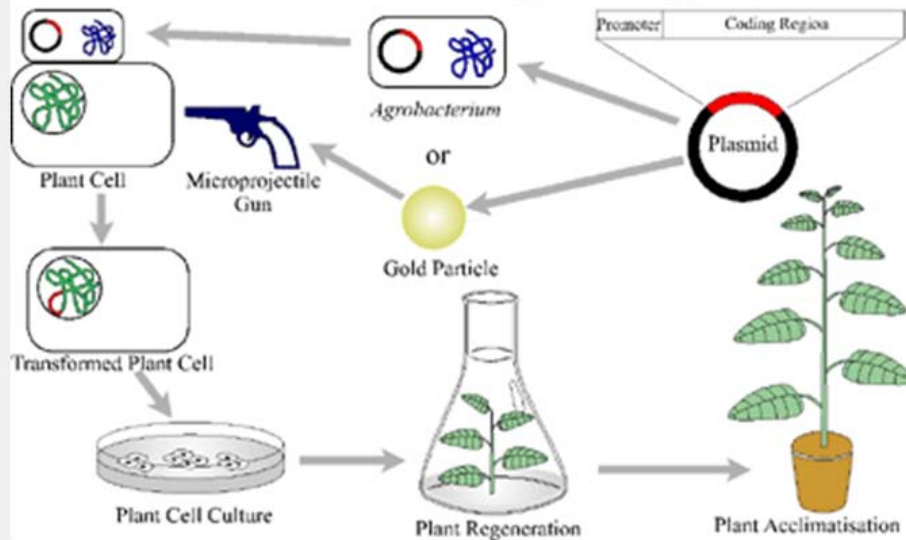
Genetik Mühendisliği bir organizmanın (hayvan, bitki veya mikroorganizma) genomunda (hücreSEL DNA ve nüklear kromozom) bulunan gen veya genlerin kontrollü bir şekilde belirli amaçlar doğrultusunda yerinde değiştirilmesi, veya başka bir organizmadan yeni gen veya genlerin transfer edilmesi işlemleri bütünüdür.

GM: 1. Genlerin tespiti, 2. İzolasyonu, 3. Çoğaltılması, 4. Rekombinasyonu, 5. Transferi

GM: “Rekombinant DNA Teknolojisi”, “Gen Klonlaması”, “DNA Klonlaması”, “Genetik Manüplasyon” veya “Gen Transferi” eş anlamlıdır.



Plant Genetic Engineering



TOTIPOTENT HÜCRE



Agrobacterium tumefaciens

Bitki Genetik Mühendisliğinde Başlıca Aşamaları

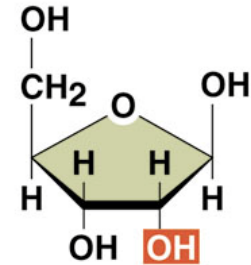
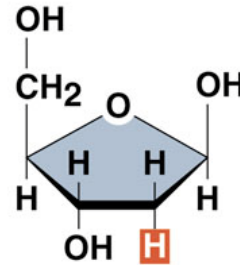
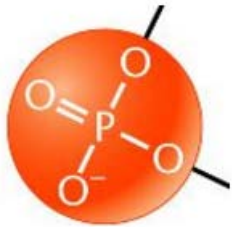
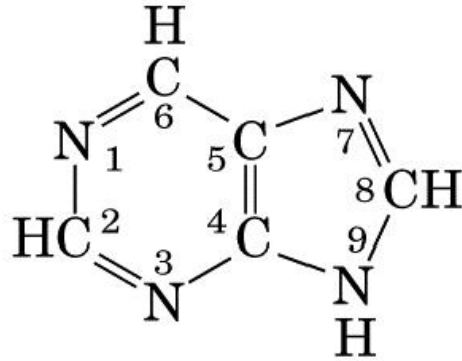
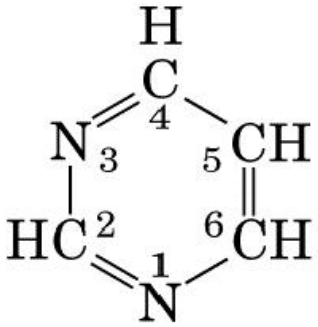
- (1) İstenilen özelliği kontrol eden gen veya genlerin belirlenmesi.
- (2) Bu gen veya genlerin transformasyon ekspresyon vektörüne yüklenmesi. Promotor, terminator ve diğer regülatör genlerle birlikte kurulumu (Rekombinant DNA Teknolojisi)
- (3) Vektörün uygun bir transformasyon yöntemiyle bitki hücrelerine transfer edilmesi (Transformasyon)
- (4) Transfer edilen bitki hücrelerinden bitkiciklerin elde edilmesi (Transgenik bitkilerin yetiştirilmesi)
- (5) Transgen ifadesinin teyidi
- (6) Transgenin uygun bir elit bitkiye geleneksel ıslah yöntemleriyle aktarılması
- (7) Tohumluk Üretimi


- **Genom**: Bir organizmanın bütün bir genetik materyali, “kromozom seti + kloroplast + mitokondri”
- **Gen**: DNA veya RNA’dan oluşmuş, kromozom veya diğer kalıtım materyali üzerinde bulunan ve kalıtım bilgisini taşıyan nükleik asit dizisidir.
- **Genotip**: Bir organizmanın genetik özellikleridir.
- **Fenotip**: Bir özelliğin ölçülebilir/görünebilir yansımasıdır.
- **Ekson**: Transkripsiyona-Translasyona giren gen dizisi.
- **Intron**: Transkripsiyona giren ancak translasyona uğramayan gen dizisi.
- **DNA Replikasyon**: DNA’nın kendi eşini sentezlemesi.
- **Transkripsiyon**: DNA’dan RNA’nın sentezlenmesi
- **Translasyon**: RNA’dan amino asitlerin sentezlenmesi.
- **Mutasyon**: Kromozom yapısı ve sayısındaki kalıtsal değişikliklerdir.
- **Evrim**: Biyolojik ve organik değişimler olup organizmaların atalarından farklılığıdır.

DNA Strüktürü ve Özellikleri:

Monomer Üniteler [dA, dT, dG, dC, ve P₂O₅]

DNA yapı itibariyle monomerlerden (nükleotit) oluşan bir polimeridir. Nükleotidler ise organik bazların -purinlerin 9 nolu N, ve pirimidinlerin 1 nolu N- deoksiribozun bir üssü karbonuna eklenmiş ve deoksiribozun beş üssü karbonunda bir adet fosforil grubu bulunan nükleotid dizisidir.



- 
1. Bazlar aromatik karakterli olup suda kolay çözülmezler.
 2. Her bir baz birkaç fonksiyonel gruptan oluşmuş olup fonksiyonel gruplar hidrojen İYONU vericisi veya alıcısı olarak görev yapar.
 3. Şeker hidroksil grupları taşır ve suda kolayca çözülür.
 4. Fizyolojik pH'da fosfat grubu negatif yüke sahiptir. Fosfat grubu nükleotidin çözünürlüğünü artırarak membranlararsı geçişini engeller ve ayrıca pozitif yüklü iyonlara bağlanmayı artırır.

■ B. Birincil Yapı (Primer Yapı)

1. DNA bir polinükleotit olup her bir monomeri fosfodiester bağıyla birbirine bağlanmıştır. Her bir fosfodiester bağı şekerin 3 üssü ucu (3') ile diğer bir şekerin beş üssü ucunu birleştirir (3'-OH ile 5'-OH arası).
2. DNA'nın omurgası biri diğerini izleyen şeker ve fosfat'dan oluşur. Bazlar ise omurgadan dışarı sarkar.
3. Genetik bilgi bazlarda depolanır. Tek bir kodon 3 bazdan oluşur.
4. DNA'nın polaritesi (yönü) şekerin asimetrisinden kaynaklanır. Bir sarmalı diğerinden ayırtmak veya bir sarmalın yönünü anlamak için sarmalı teşkil eden şekerin 5' ve 3' nün bağlanma yönüne bakmalısınız.

Bir sarmalın yönü yazılmamışsa bunun 5'→3' yönünde olduğu anlaşılmalıdır. Her zaman DNA sarmalı yada dizisi soldan sağ yöne doğru yazılır. DNA ve RNA sentezi her zaman 5'→3' yönündedir.

Polarite nedeniyle birincil yapısı 5'-GATC olan bir DNA ile birincil yapısı 5'-CTAG olan DNA aynı değildir.

C. İkincil Yapı (Sekoner Yapı)

Yaklaşık olarak doğal olan bütün DNA'lar çift sarmalıdır, sağ döngülü olup, her iki sarmalının birbirine spiral oluşturmasıyla bir heliks yapı göstermektedir. Helikte bazlar iç kısımda (sudan uzak tutulmak için) ve suyu seven şeker-fosfat iskelesi dışarıda, iki sarmal birbirine zıt yönde (antiparalel) yapıdadır.

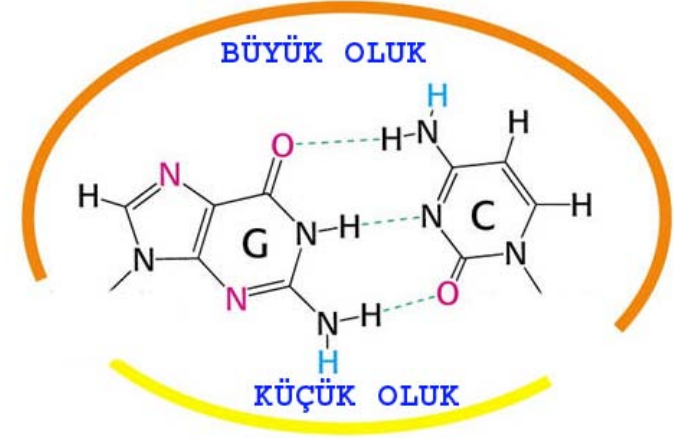
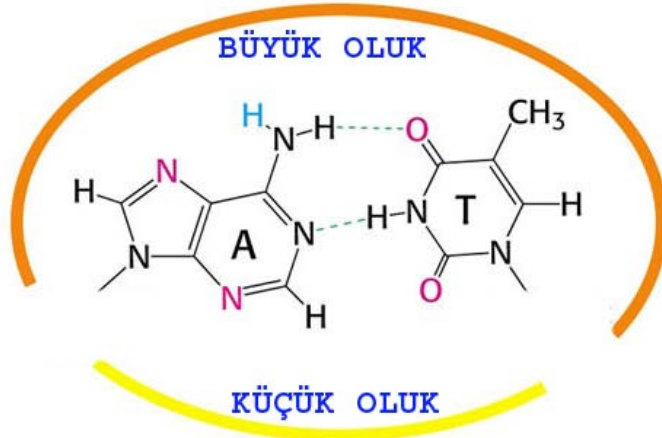
Çift sarmallı heliks yapının temeli bazlar arasındaki hidrojen bağlarıdır. Bazlar şeker glikozit bağla ("glycosidic bonds") bağlıdır (bağlantı N-C arasında şekerin 1' karbonunda (C1) pürin bazlarının 9 nolu azotunda ve pirimidin bazlarının 1 nolu azotundadır).

Bazlar helikse dikey konumda dizilidir. Bazların aromatik yüzleri birbirlerine bakar. Bazlarda bulunan ama hidrojen bağı oluşturmayan fonksiyonel gruplar ise heliksin olukları arasından iskelete yönelmiş konumdadırlar. Helikte bulunan oluklar farklı büyüklüktedir.

Büyük Oluk geniş yapıda bir oluk olup bazların şekere bağlandıkları düzlemin tersinde bulunurlar. Bu olukta diğer oluğa oranla bazların daha fazla fonksiyonel grupları bulunur.

Küçük Oluk küçük ancak küçük moleküllerin bağlanabilecekleri oluklardır.

DNA'ya bağlanan proteinler bazlarla, şeker ve fosfatla interaksiyona girerler. Sıklıkla bu interaksiyon büyük ve küçük oluklardan sekans spesifik olarak gerçekleşmektedir.



Fizyolojik DNA B-formludur.

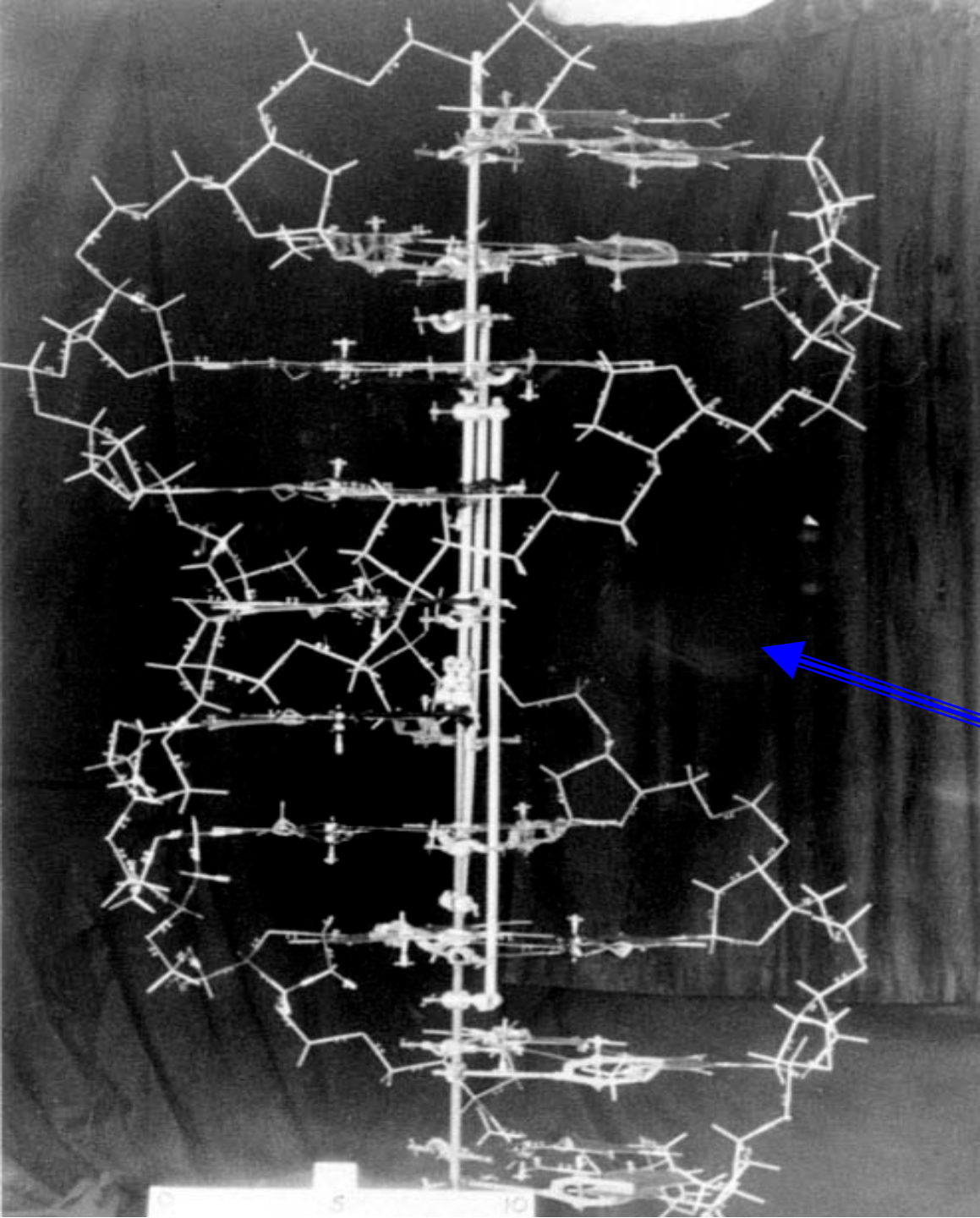
Bazlar arası uzaklık 3.4 Å olup, bir döngüde tam olarak 10.5 baz çifti bulunur. Bir döngü uzaklığı ise 34 Å dir.

DNA'nın A-formu da vardır. Bu form B formunun suyunun uzaklaştırılmasıyla oluşabileceği gibi çift sarmallı RNA'da da görülmektedir. Eğer DNA-RNA hibriti yaparsanız A formunu elde edebilirsiniz. A formu DNA'nın her bir kıvrımında 11 bp vardır.

Diğer bir DNA formu ise Z-formudur. Kıvrım sola doğrudur, her bir döngüde 12 bp vardır. Z formu DNA'nın heliksi zik-zak görünüşlüdür. Z-formu yüksek tuz konsantrasyonlarında oluşur ve genellikle purin ve pirimidin bazlarının tekrarlı dizilerini içerir.

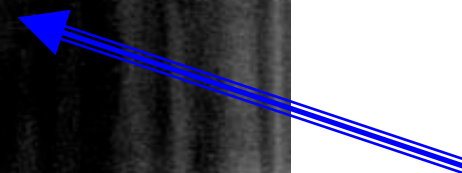
Eğer sarmal saat yönünde dönüyorsa heliksin sağ döngülü, saat yönünün tersine dönüyorsa sol döngülü olduğunu unutmayınız.

1 Angström (Å) = 10^{-10} metre = 0.1 nanometre (nm= veya 100 pikometre (pm)

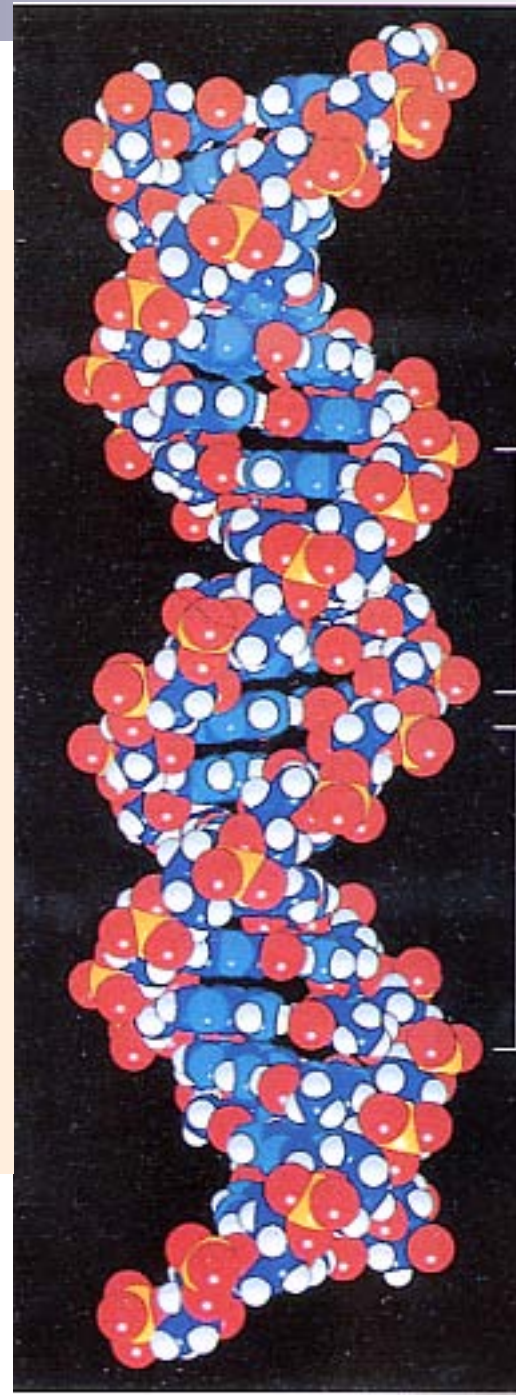
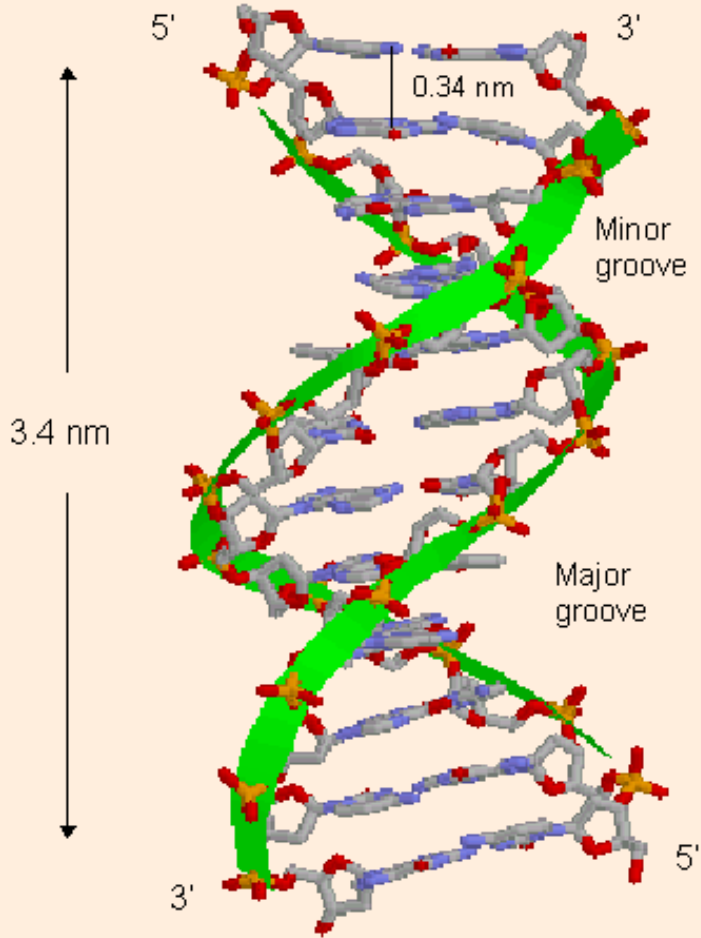


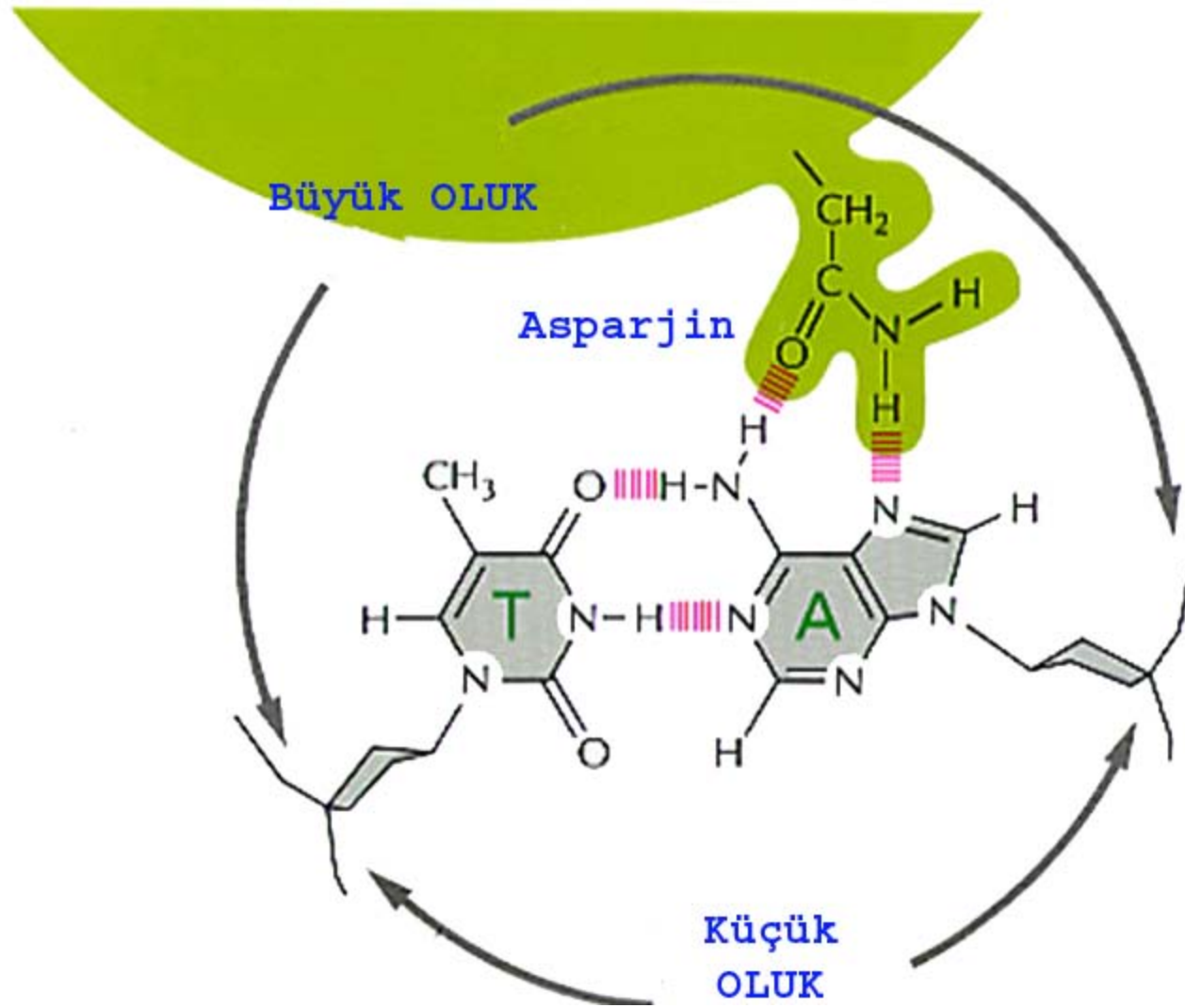
Watson and Crick walk along the Backs. Cold Spring Harbor Laboratory Archives

Crick ve Watson



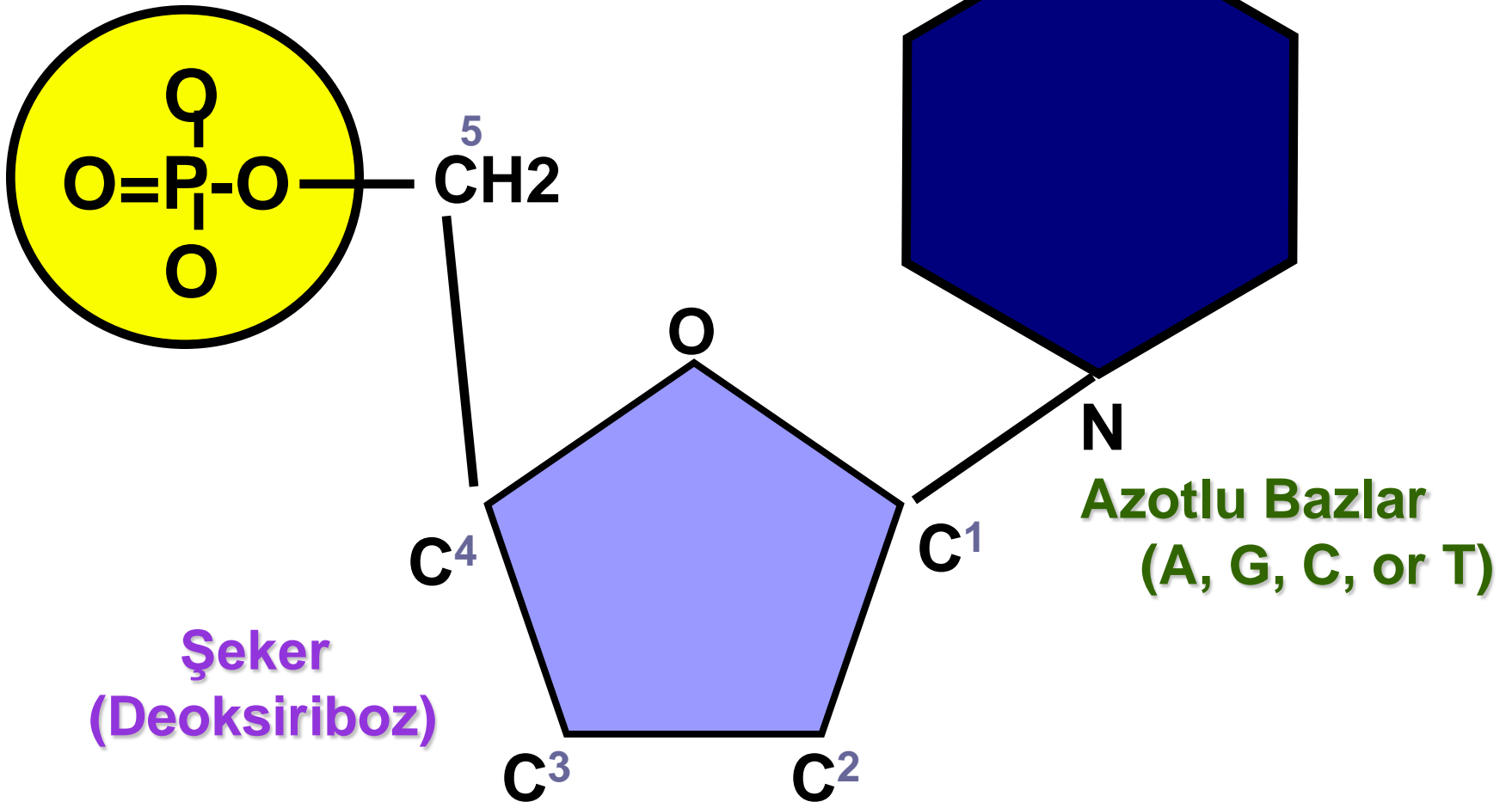
THINKTOY (Düşünce Oyuncağı)

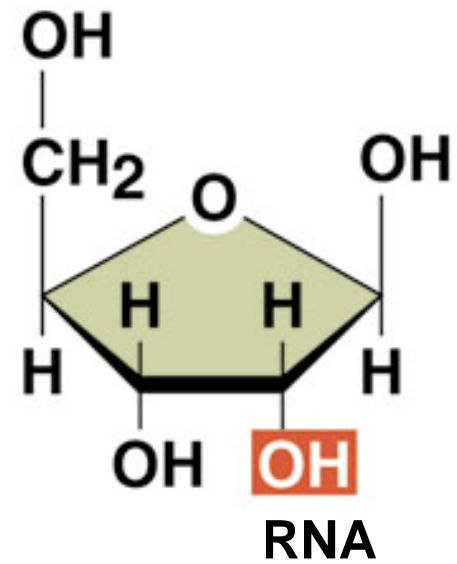
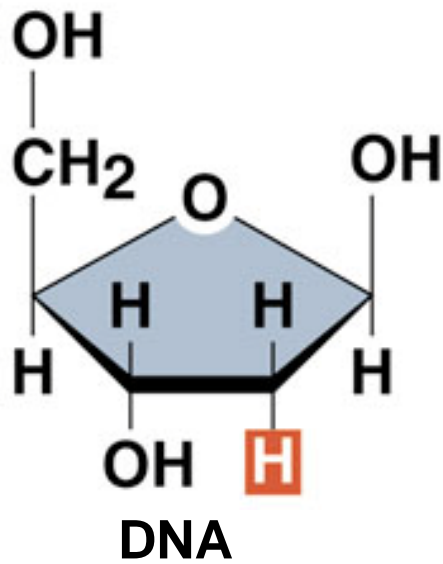
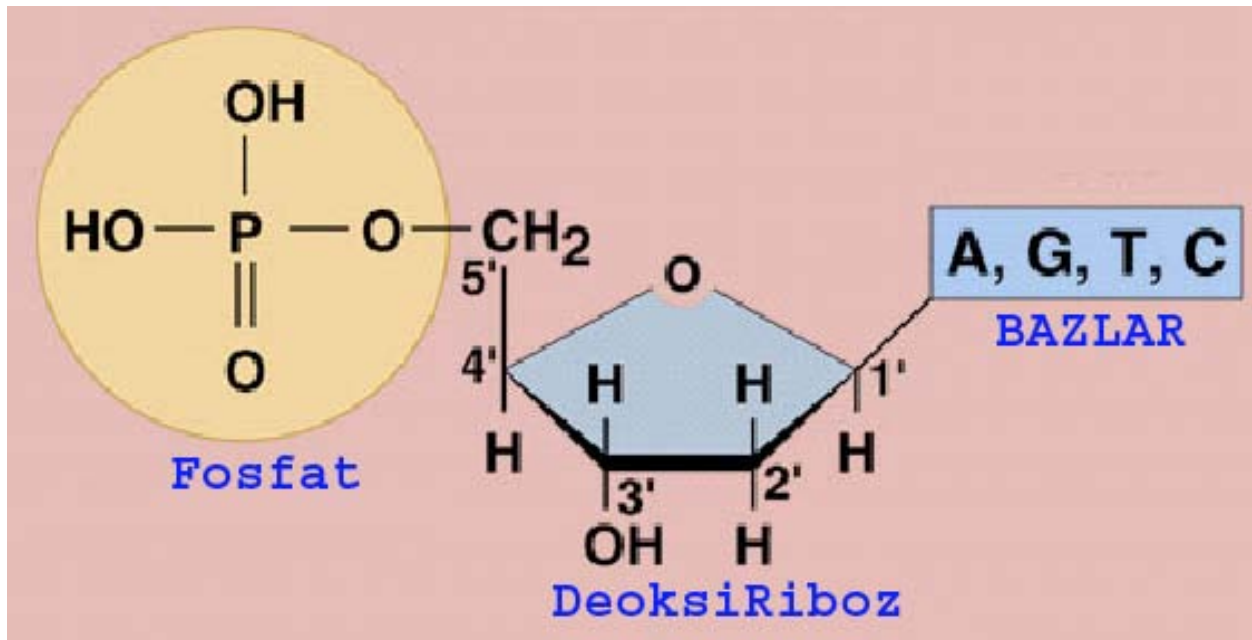




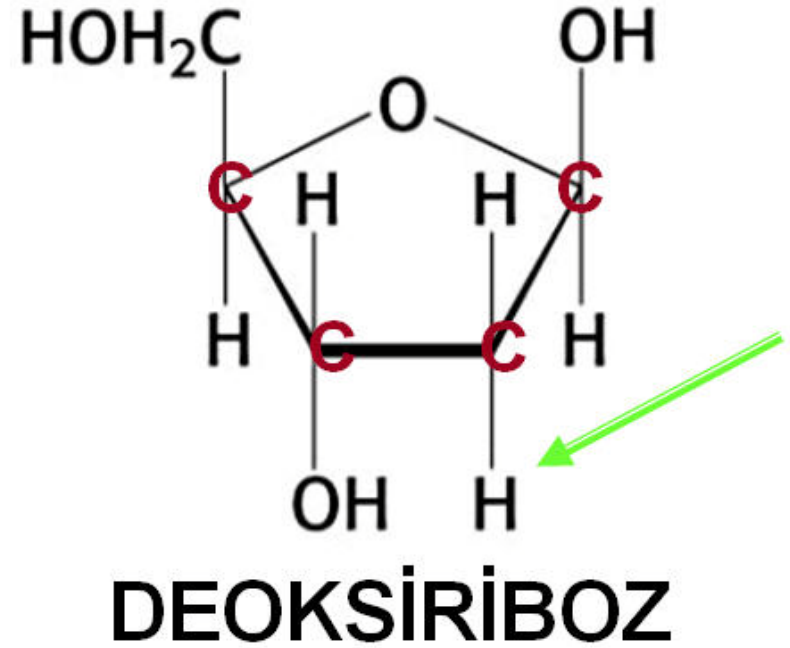
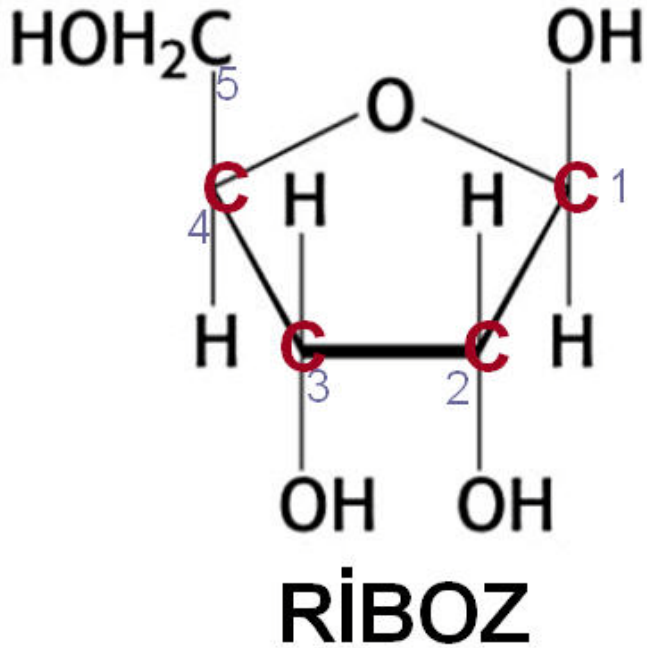
DNA'NIN YAPISINDA

Fosfat Grubu





DNA'NIN VE RNA'NIN YAPINDAKI ŞEKER



5 KARBONLU ŞEKLERLER: RİBOZ

BAZLAR

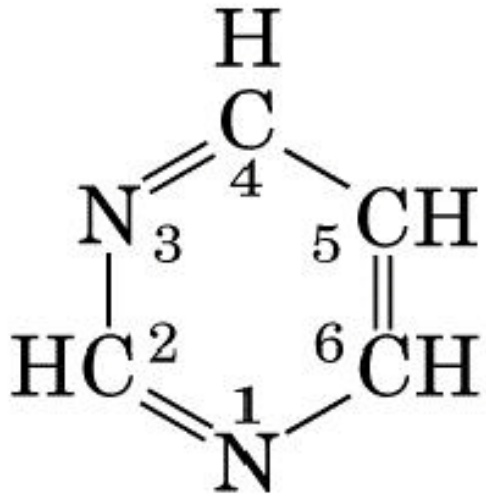
- İki farklı baz vardır

- Pürin

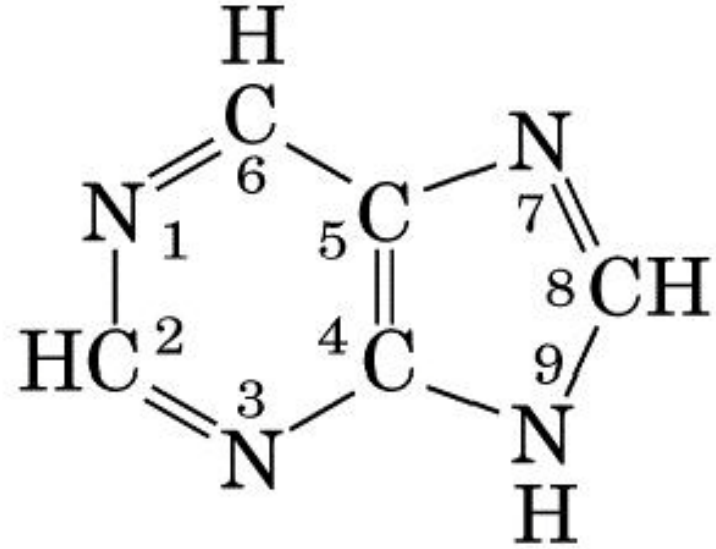
■ Adenin	A	DNA	RNA
■ Guanin	G	DNA	RNA

- Pirimidin

■ Sitozin	C	DNA	RNA
■ Timin	T	DNA	-
■ Urasil	U	-	RNA

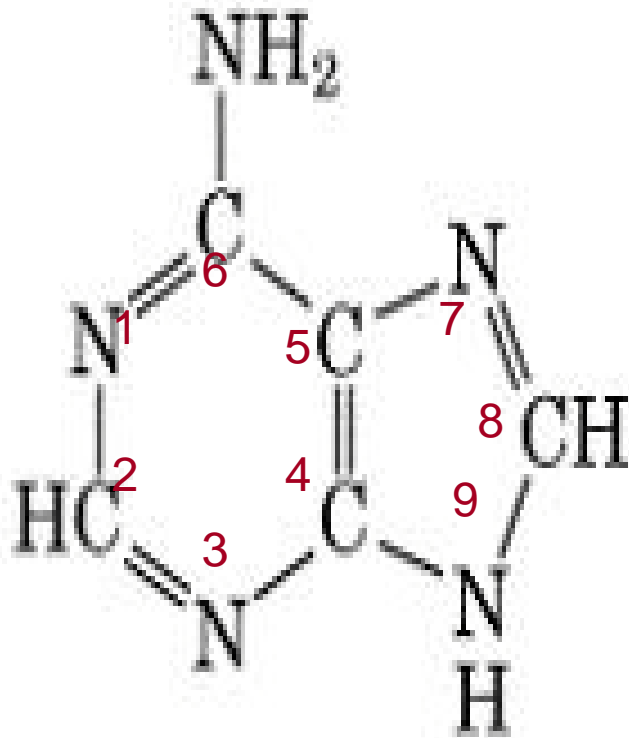


PRİMİDİN

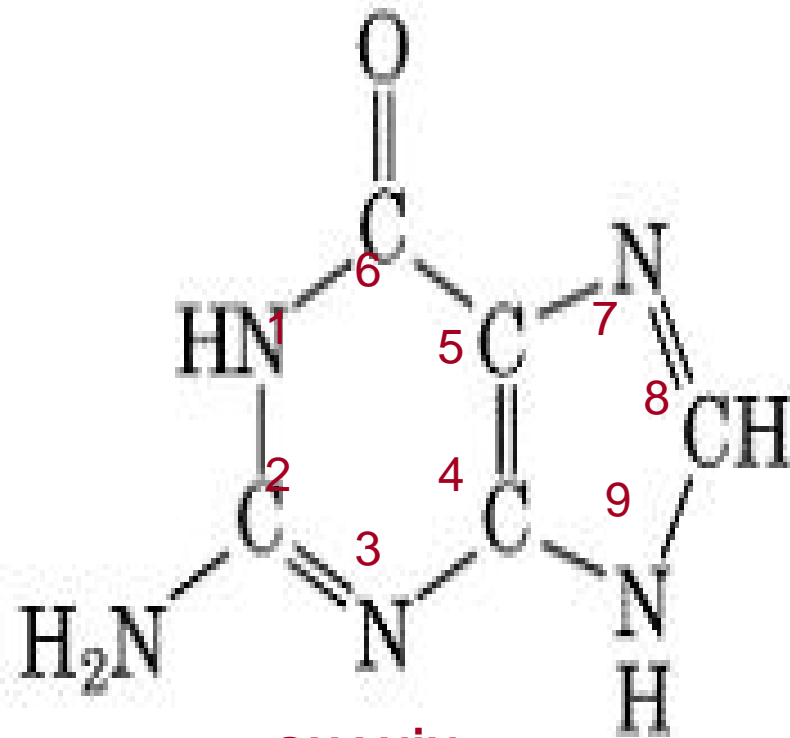


PURİN

PURİN VE PRİMİDİN BAZLARININ NUMARALANDIRILMASI

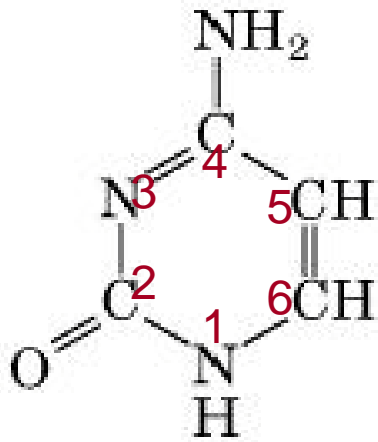


ADENİN

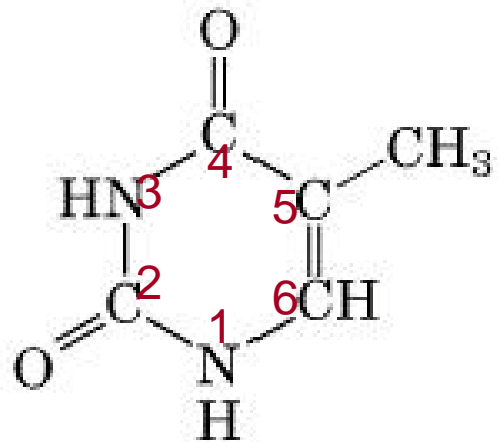


GUANİN

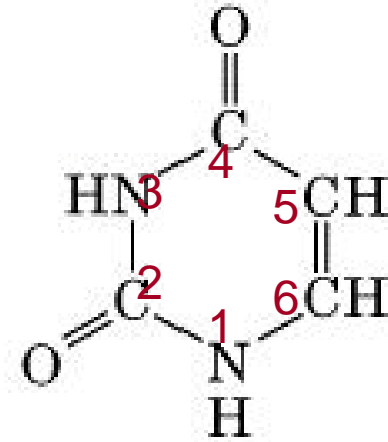
PURİN BAZLARI



SİTOZİN



TİMİN



URASİL

PRİMİDİN BAZLARI

- Çift sarmallı bir DNA' her bir sarmalda bulunan pürin ve pirimidin bazları birbirlerine yüz-yüze bakar
- Çift sarmalın her bir sarmalı üzerinde bulunan bir pürin diğer sarmaldaki pirimidinle veya bir sarmaldaki pirimidin diğer sarmaldaki pürinle hidrojen bağlarıyla bağlıdır.
- Watson-Crick baz çifti kuralına göre
- $A = T$
- $G \equiv C$ sarmallar H BAĞLARI ile birbirlerine bağlanır
- GC baz çiftleri (bps) AT baz çiftlerine oranla daha fazla sağlamdır.
- Adenin-Timinle, Guaninin-Sitozinle eşleşmesi kuralı, bir sarmalın diğer sarmala komplementar olmasını sağlar ve komplementari kavramına göre bir sarmaldan diğer bir sarmal oluşturulabilir.

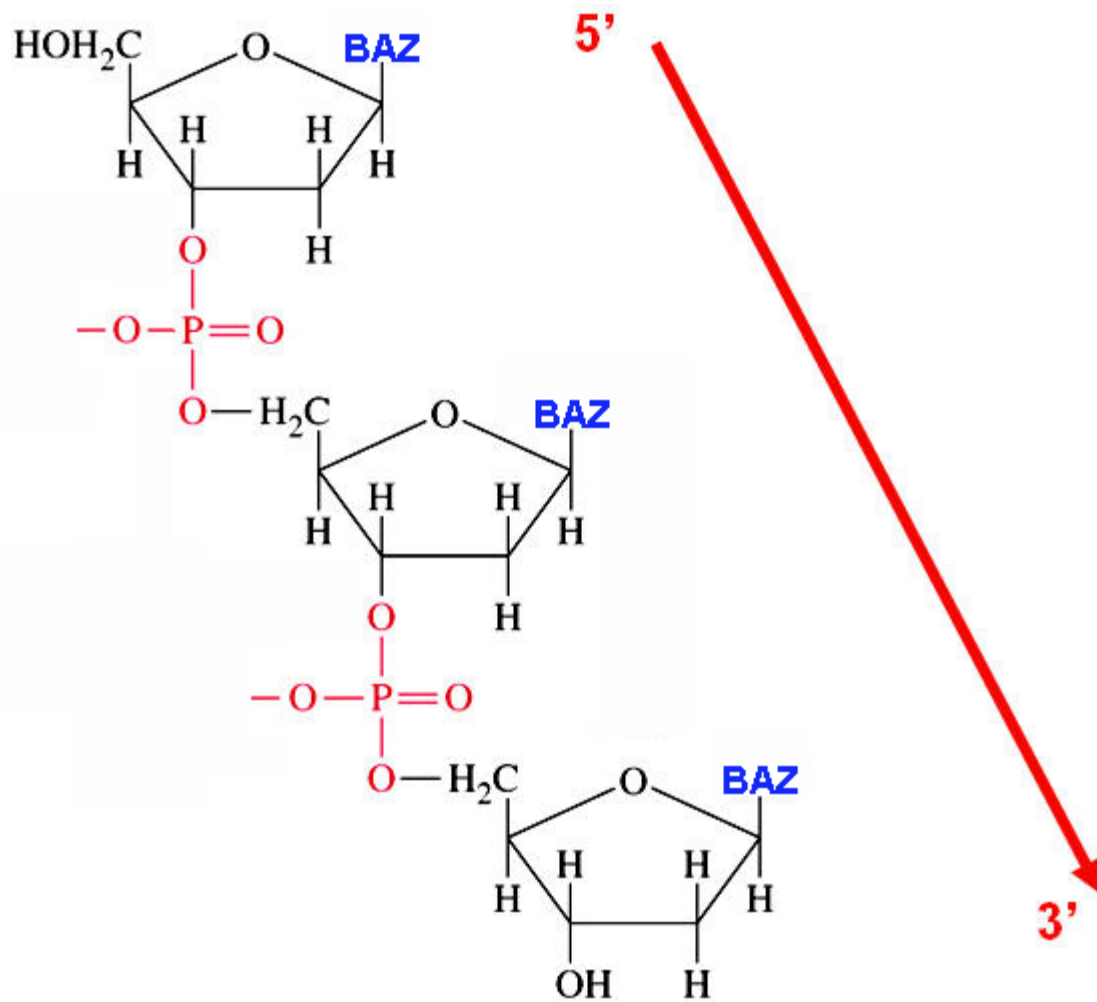
ANTİPARALELLİK



Çift sarmallı bir DNA'nın her bir sarmalı birbirlerine zıt yöndedir buna **antiparallelik** denir ve aynı zamanda sarmallar birbirlerine **komplementardır.**

BAZ ÇİFTİ OLUŞUMU

- Kovalent bağlara orana daha zayıf bağlar olan **hidrojen bağları** pürin ve pirimidin bazları arasında oluşarak iki nükleik asit sarmalını birbirlerine bağlarlar.
- Watson-Crick baz çifti kuralına göre
 - A ve T arasında çift hidrojen bağı
 - G ve C arasında üç hidrojen bağı



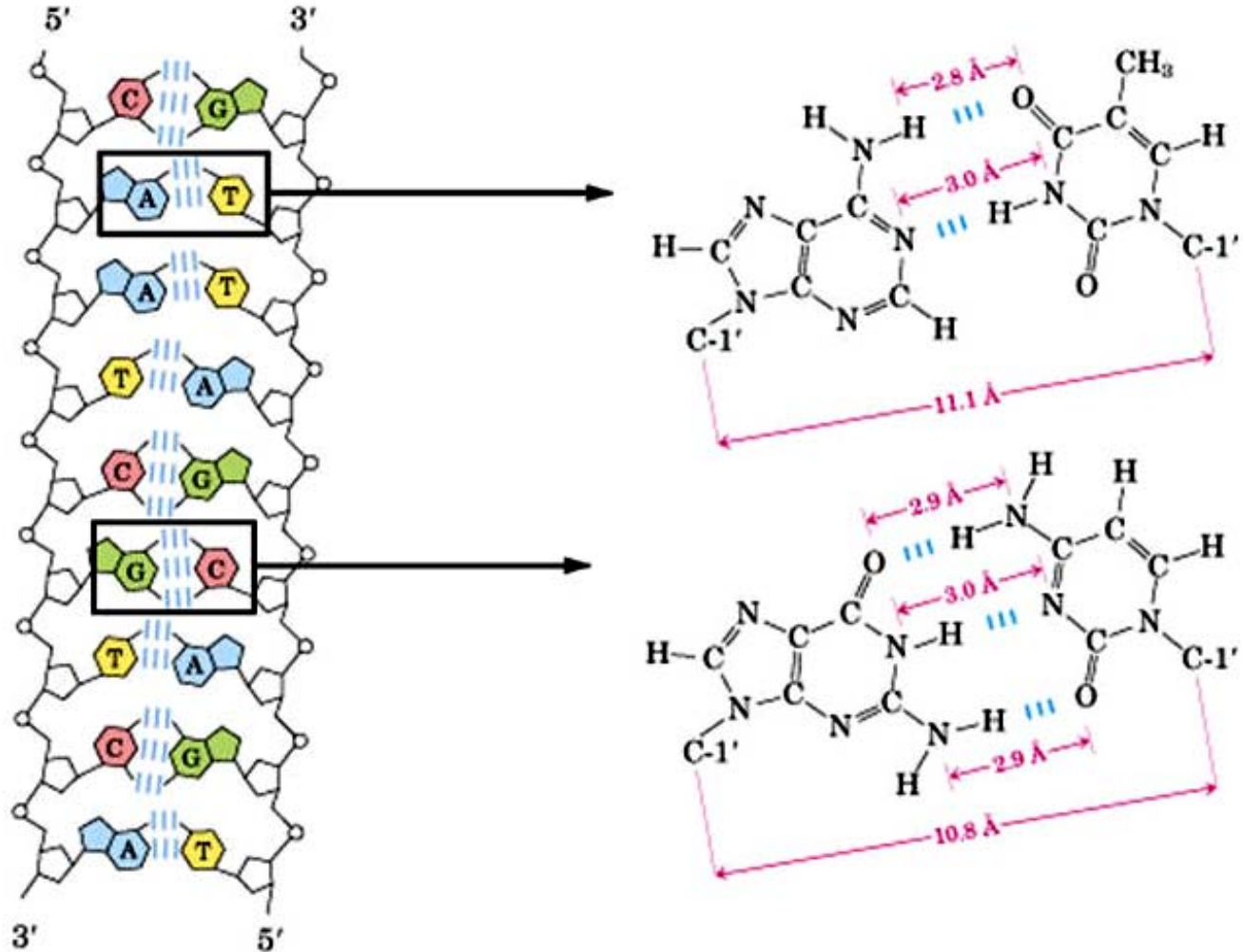
A: ADENİN
C: SİTOZİN
G: GUANİN
T: TİMİN
U: URASİL
I: İYONOSİN
N: A, C, G VEYA T

M: A VEYA C
R: A VEYA G
W: A VEYA T
S: C VEYA G
Y: C VEYA T

K: G VEYA T
V: A VEYA C VEYA G; T DEĞİL
H: A VEYA C VEYA T; G DEĞİL
D: A VEYA G VEYA T; C DEĞİL
B: C VEYA G VEYA T; A DEĞİL

ÇİFT SARMALI BİRARADA TUTAN BAĞLAR

1. Bazlar arası HİDROJEN BAĞLARI



2. DNA sarmallarında bulunan bazların muntazam istiflenmesi ve baz çiftleri arasındaki Van der Waals interaksionu.

Delil:

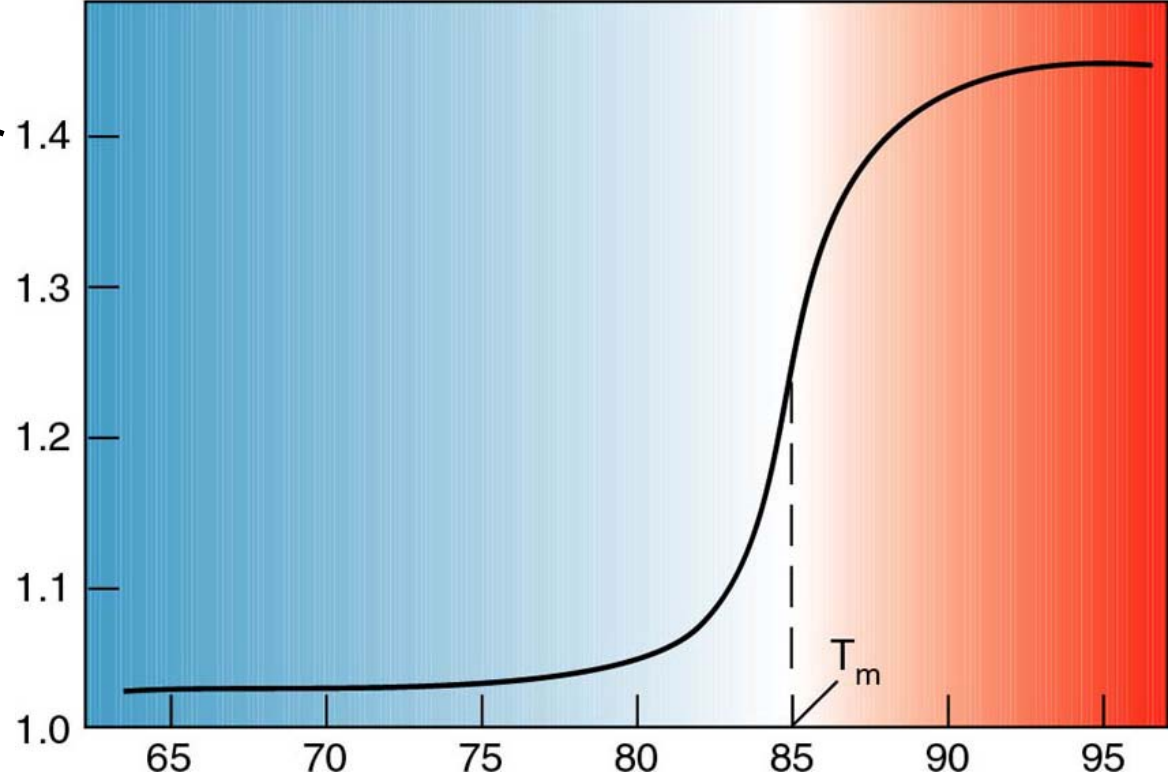
Ure ve formamit hidrojen bağını koparmasına rağmen sarmallar birbirlerinden ayrılmazlar, ayrılma için sıcaklığa ihtiyaç duyulur.

3. Çift sarmallı DNA'nın dış kısmında bulunan fosfodiester bağlarının su [H₂O] ve karşıt iyonların (K⁺, Mg²⁺, vb.) interaksiyonu çift sarmalı korur

DNA'nın Erime Eğrisi

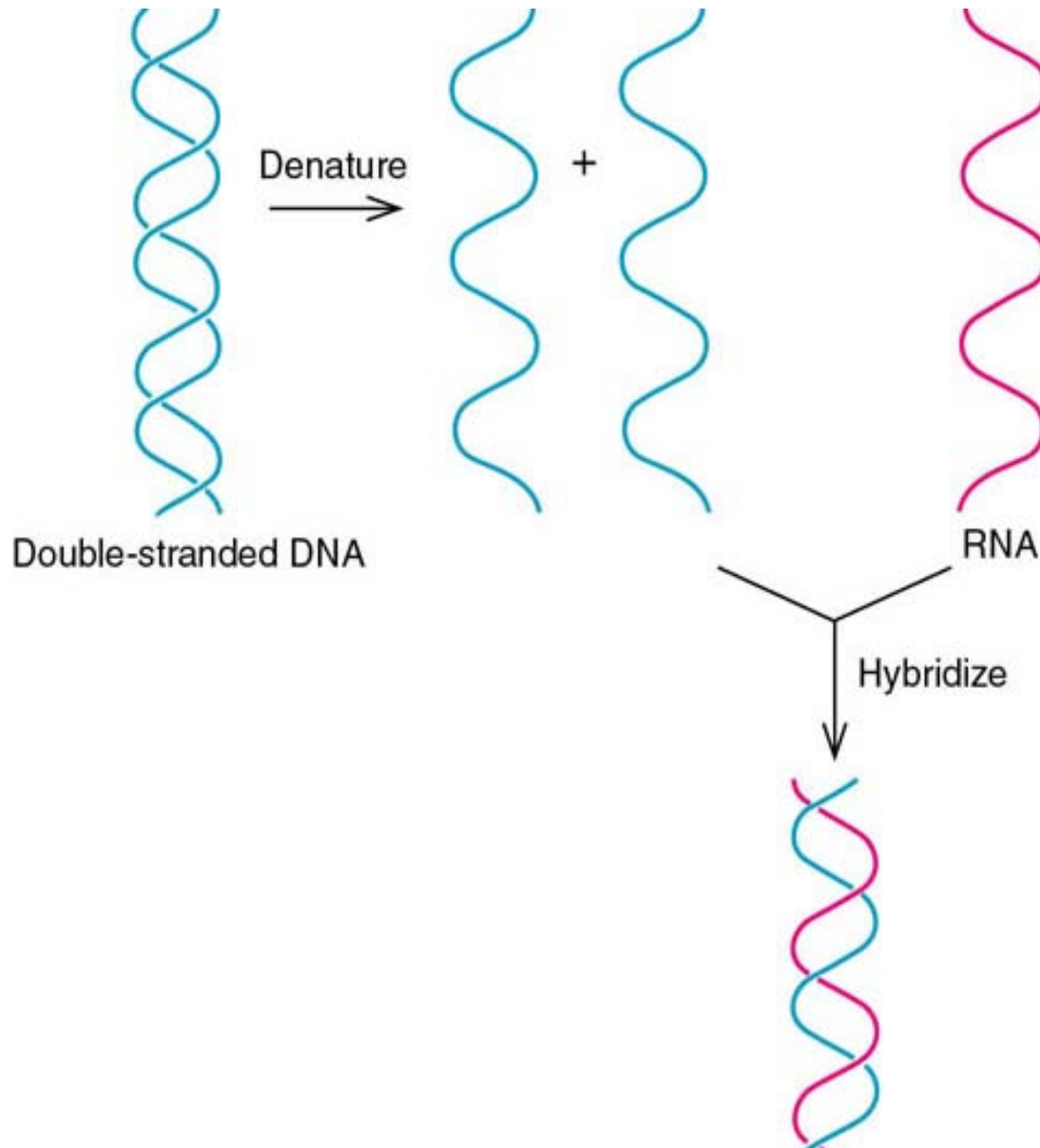
HİPERKROMATİK KAYMA
HİPOKROMATİK KAYMA

DNA eridiği (denatüre) olduğu zaman diğer bir söylemle çift sarmallı tek sarmallar haline dönüştüğü zaman UV bölgesindeki soğurganlığı artar.



$T_m = \text{DNA'nın \%50'sinin denatüre olduğu sıcaklıktır}$

Denatürasyon, Renatürasyon, Hibridizasyon



- DNA - DNA
- DNA - RNA
- RNA - RNA

■ Denatürasyon:

- Fizyolojik şartlarda çifte heliks yapısında durağan yada stabil olan DNA, çifte heliksi bir arada tutan kovalent olmayan bağlar çözülerek, çifte heliks iki tek helikse dönüştürülebilir.
- Çift heliksin çözülebilmesi oldukça önemli bir bulgudur. Çünkü çift sarmalın çözünürlüğü DNA replikasyonu (DNA ikileşmesi), transkripsiyon ve DNA lezyonlarının (hatalarının) düzeltiminde oldukça gereklidir.
- Çifte sarmallı heliksin tek sarmallı helikslere dönüşümü DENATÜRASYON olarak bilinmektedir.

Denatürasyonu Etkileyen Faktörler

- a. Sıcaklığın 90°C'ın üzerine çıkartılması.
- b. pH'nın 12 veya daha üste veya pH'nın 3 veya daha altına çekilmesi ile DNA üzerinde bulunan bazlardaki fonksiyonel grupların etkilenmesi sağlanarak DNA'nın denatürasyonu sağlanabilmektedir.
- c. Suda çözünür olmayan çözücülerin örneğin **formamit, guanidin, sodyum salisilat, dimetil sülfoksit (DMSO), propilen glikol ve üre** gibi çözücüler DNA bazlarının bu tür çözeltilerde dağılımlarının artırılmasıyla çifte sarmallı heliksi tutan hidrofobik bağlantının kopması sağlanabilmektedir.

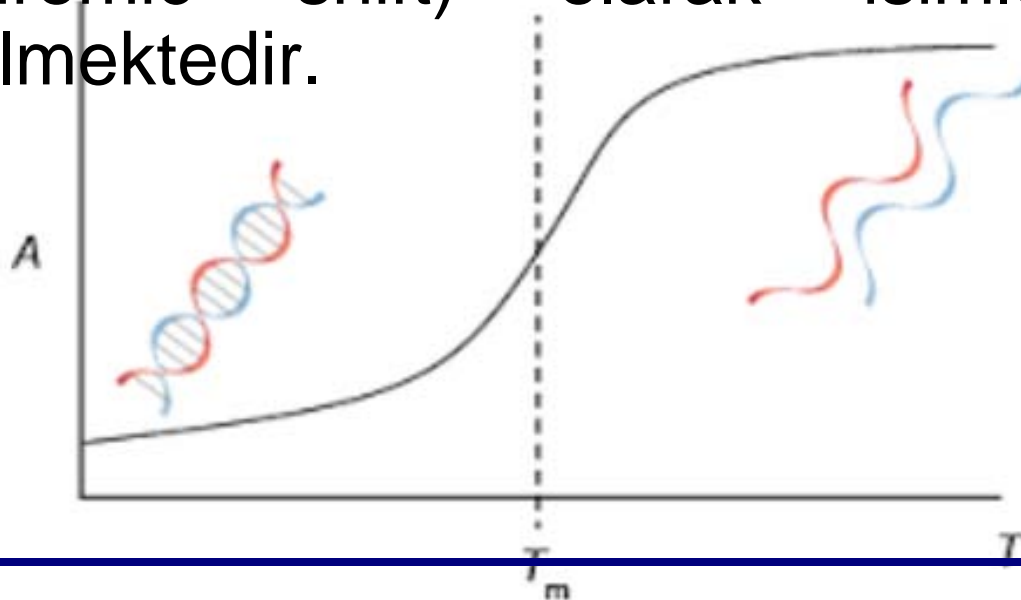
d. DNA'nın içinde bulunduğu solüsyonun iyonik gücünün azaltılmasıyla denatürasyon sağlanabilmektedir. Çift sarmallı heliksin her birinde iskelet yapıyı oluşturan negatif yüklü fosfat normal şartlarda her iki heliksi birbirinden itmektedir. Bu nedenle bu negatif itimin pozitif yüklerle dengelenmesi gerçekleştirilir. İşte bu pozitif yükü sağlayan karşıt iyonlar DNA'nın bulunduğu ortamdan uzaklaştırılırsa DNA denatüre olur. Ancak tam bunun tersine DNA'nın bulunduğu ortama tuz eklenirse pozitif yük DNA'nın çifte heliks yapısını korur.

e. Denaturasyon baz içeriğiyle de ilgilidir. Dizisinde çok sayıda G-C baz çifti bulunduran DNA'lar AT bulunduranlara oranla Denatürasyona daha dayanıklıdırlar. DNA'nın baz içeriğini bilirsek denatürasyonu hakkında tahminde bulunabilir.

Denatürasyon Ultra Viyole (UV) Işık Absorbasyonu İle İzlenebilir.

a. DNA'nın yapısında bulunan 4 baz ortalama 260 nm'de maksimum absorpsiyona sahiptir.

b. Çift sarmallı helikste UV absorpsiyonu tek sarmallı helikslere göre daha azdır. UV absorpsiyonundaki değişim HIPOKROMİK KAYMA (hypochromic shift) olarak isimlendirilir ve izlenebilmektedir.



c. Tam denatürasyon veya erime (melting) profülü, bir çözeltide bulunan DNA'nın yarısının çift sarmallı yapıdan tek sarmallı yapıya dönüştüğü sıcaklığa erime sıcaklığı, denatürasyon sıcaklığı veya T_m , olarak bilinir.

d. T_m birkaç faktör tarafından etkilenmektedir. Bunlar 1) DNA dizisindeki G+C içeriği; 2) DNA'nın bulunduğu solüsyonun iyonik içerik ve gücü; 3) DNA'nın içerisinde bulunduğu çözeltideki suda çözülmemeyen solventin varlığı ve konsantrasyonu ve 4) çifte sarmala bağlanan özgün proteinlerin varlığı ve konsantrasyonu.

■ Renatürasyon

■ Çifte heliks ayrıştırıldığında uygun şartlar tekrar uygulandığında çift sarmalı heliks tekrar oluşur.

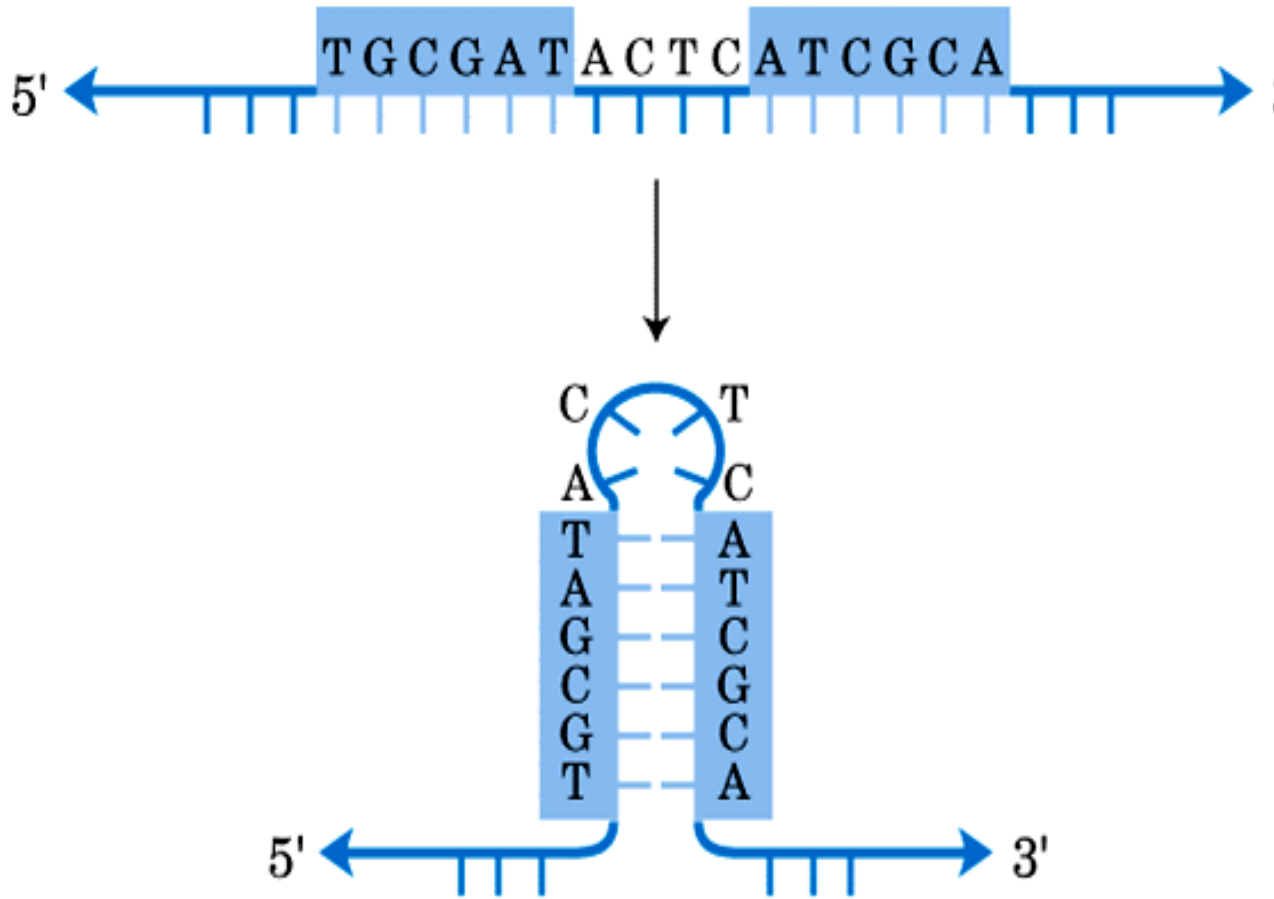
a. Ayrışmış tek sarmalı iki DNA'nın çift sarmalı bir DNA heliksi oluşturmaya renatürasyon denir. Renatürasyon 260 nm de UV ışığı altında izlenebilir.

b. Renatürasyonda bir sarmal komplementeri olan diğer bir sarmalla çift heliksli bir DNA oluşturur ancak bu oluşumda baz eşlemeleri arasında uyumsuzluk olabilir örneğin A ile C, eşleşebilir. Buna uyumsuz eşleşme denir. Uyumsuz eşleşme derecesi etkilenebilir. Örneğin düşük sıcaklıklarda renatürasyon veya yüksek iyon konsantrasyonları gibi.

c. Tekrar oluşum yada renatürasyon komplementer olan sarmalların konsantrasyonlarıyla da ilgilidir. Yüksek konsantrasyonda sarmallar komplementerlerini daha kısa bir sürede bulabilir.

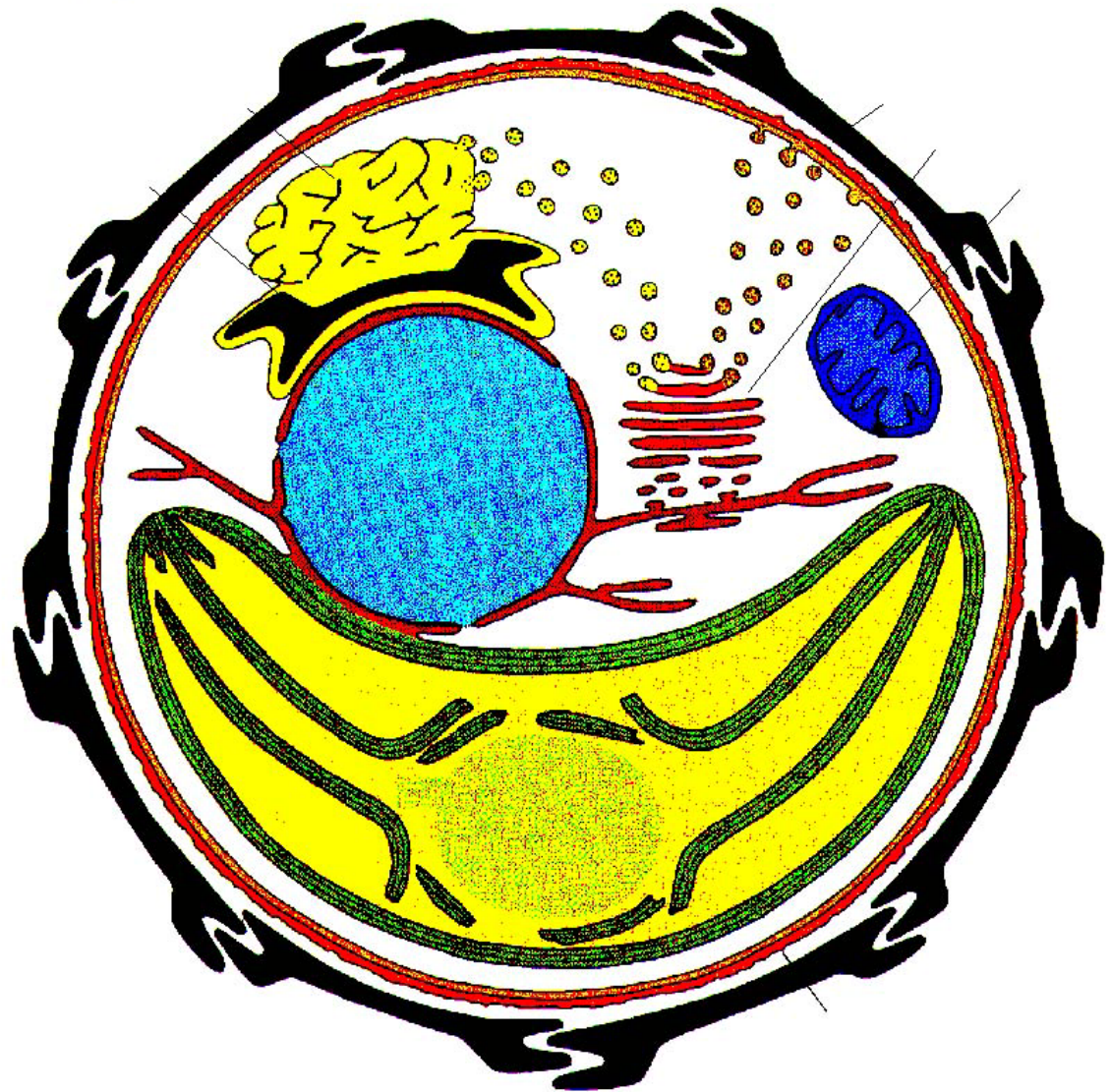
d. Çatışma yada uyumsuzluk komplementer DNA sarmalları arasında az orandadır. Uyumunun fazlalığı iki farklı sarmalın kısa sürede fermuar şeklinde kısa sürede birleşmesiyle sonuçlanırken uyumsuzluğun fazla olduğu renatürasyonlar fazla stabil olmazlar.

- Renatürasyon nükleik asit hibridizasyonunun temelini teşkil etmektedir. Bu yöntemle DNA-DNA yada DNA-RNA, yada RNA-RNA hibritleri oluşturulabilmektedir.
- Tek sarmala dönüştürülen DNA yada RNA radyoaktif maddelerle etiketlenerek prob yapılabilenkte daha sonra nükleik asitler arasındaki dizi benzerliklerinin belirlenmesinde kullanılabilir.

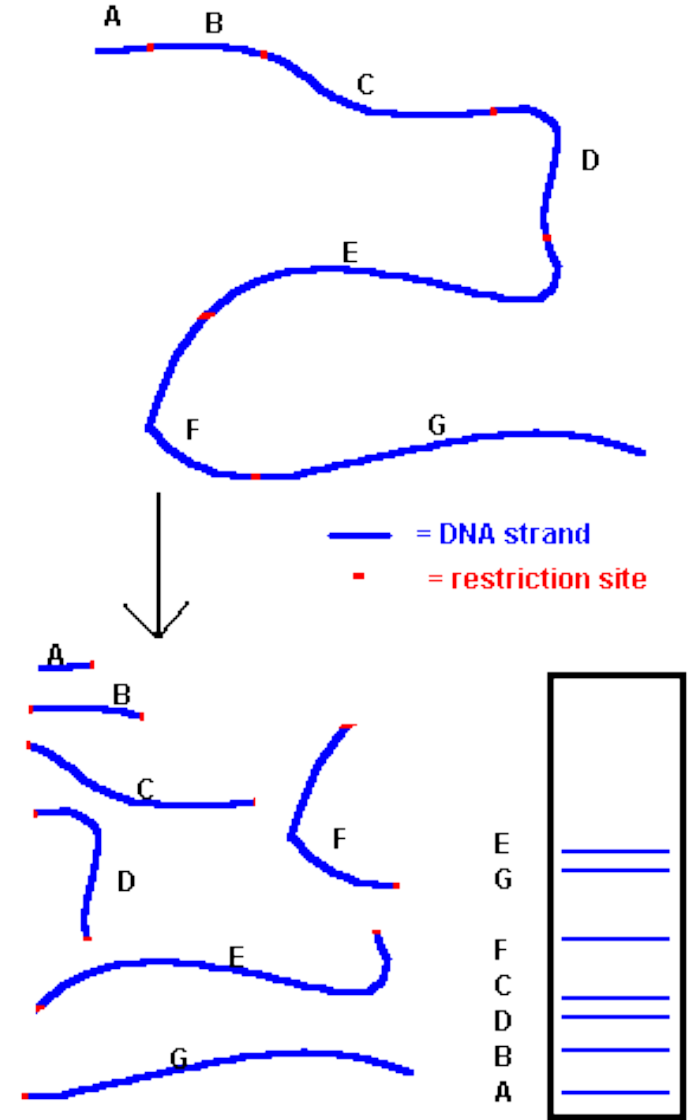


DNA/RNA'DA FİRKETE (HAIRPIN) OLUŞUMU

KROMATİN
KROMATİD
KROMOZOM



- **1970** Howard Temin ve David Baltimore birbirlerinden habersiz ilk restriksiyon enzimini izole etmişlerdir.
- DNA'ları özel sekans dizilerinden kesilebilmektedir. Bu tip enzimler restriksiyon endonükleazlar olarak bilinir.
- Kesilmiş DNA başka DNA uçlarına eklenebilmektedir.
- Gen klonlamasına önemli düzeyde katkı sağlamıştır.



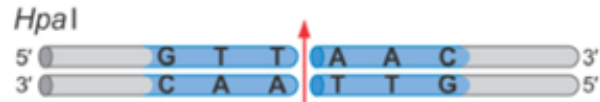


Şekil 14.1. Palindromik dizi örneği

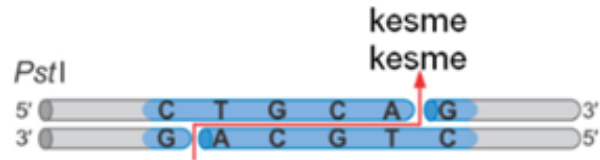
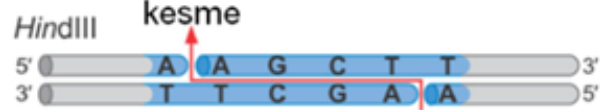
→ Şekil 14.1'de verilen palindromik dizi 14 baz çifti uzunluğundadır. Bu diziyi tanıyan restriksiyon enzimlerine 14'lü kesici restriksiyon enzimi adı da verilir. Diğer taraftan 5'-GAATTC-3'/3'-CTTAAG-5' gibi altı diziyi tanıyanlara 6'lı kesici, 5'-CCGG-3'/3'-GGCC-5' tanıyanlara ise 4'lü kesici restriksiyon enzimleri adı verilmektedir. Bir enzimin herhangi bir DNA'yı tanıyıp kesme olasılığı kabaca $1/4^{TU}$ ile hesaplanabilir.

→ Burada TU : enzimin DNA üzerindeki tanıma baz çifti uzunluğudur. Örneğin tanıma sekans uzunluğu 4 ise bu enzim her 256 baz uzunluğunda bir DNA'da tek bir kesim yapabilme özelliğindedir denilebilir, $TU=6$ ise bu enzim 4096 baz çiftinde bir kesim yapabilme olasılığına sahiptir.

Düz uç



Yapışkan uç



Kesme

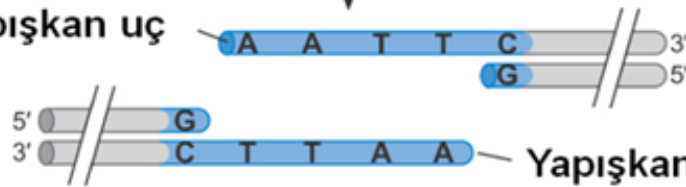


Kesim



kesim

Yapışkan uç



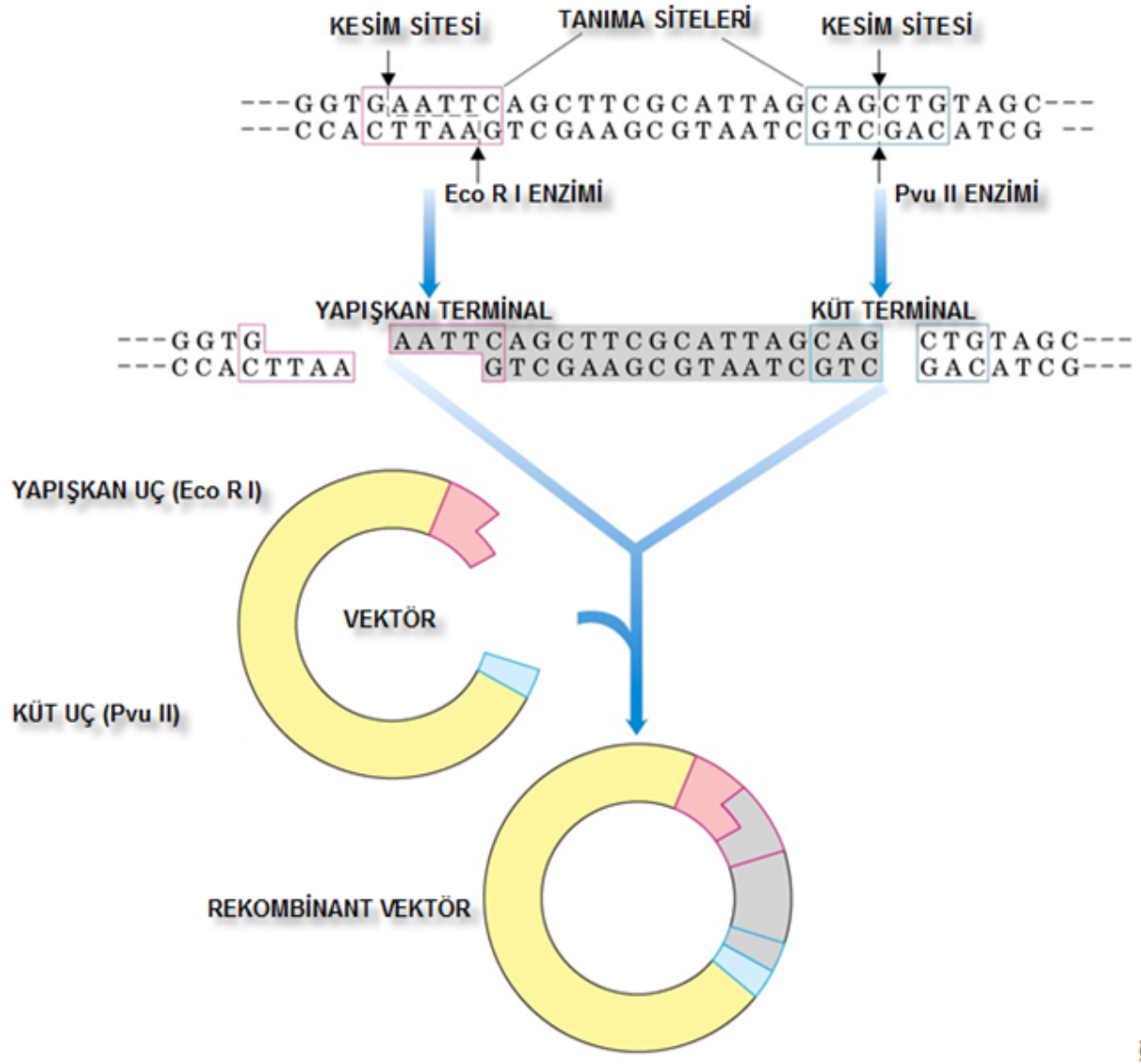
Yapışkan uç



Şekil 14.2. Düz ve yapışkan uç oluşturan restriksiyon enzimleri

Some restriction enzymes

Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>	<p>5' —G—A—A—T—T—C— —C—T—T—A—A—G— 5'</p>	<p>—G 5' A—A—T—T—C— —C—T—T—A—A— 5' G— 5' overhang</p>
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>	<p>5' —C—T—G—C—A—G— —G—A—C—G—T—C— 5'</p>	<p>—C—T—G—C—A 3' G— —G 3' A—C—G—T—C— 3' overhang</p>
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<p>5' —C—C—C—G—G—G— —G—G—G—C—C—C— 5'</p>	<p>—C—C—C G—G—G— —G—G—G C—C—C— Blunt ends</p>
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>	<p>5' —G—G—C—C— —C—C—G—G— 5'</p>	<p>—G—G 5' C—C— —C—C 5' G—G— Blunt ends</p>
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	<p>5' —C—C—G—G— —G—G—C—C— 5'</p>	<p>—C C—G—G— —G—G—C 5' C— 5' overhang</p>



□

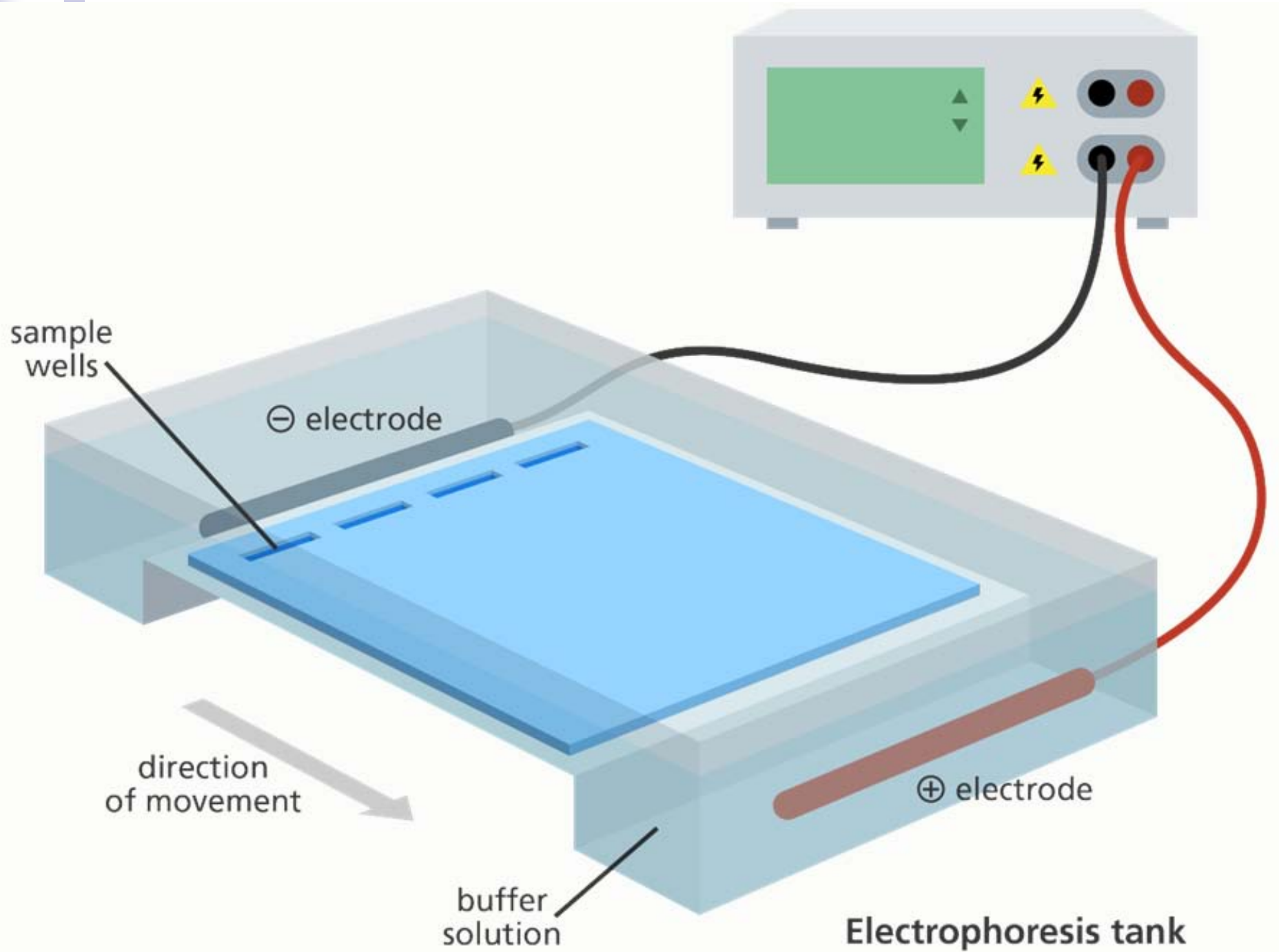
Şekil 14.3. Çift restriksiyon enzim kullanımı ile pozisyonel alt klonlama □

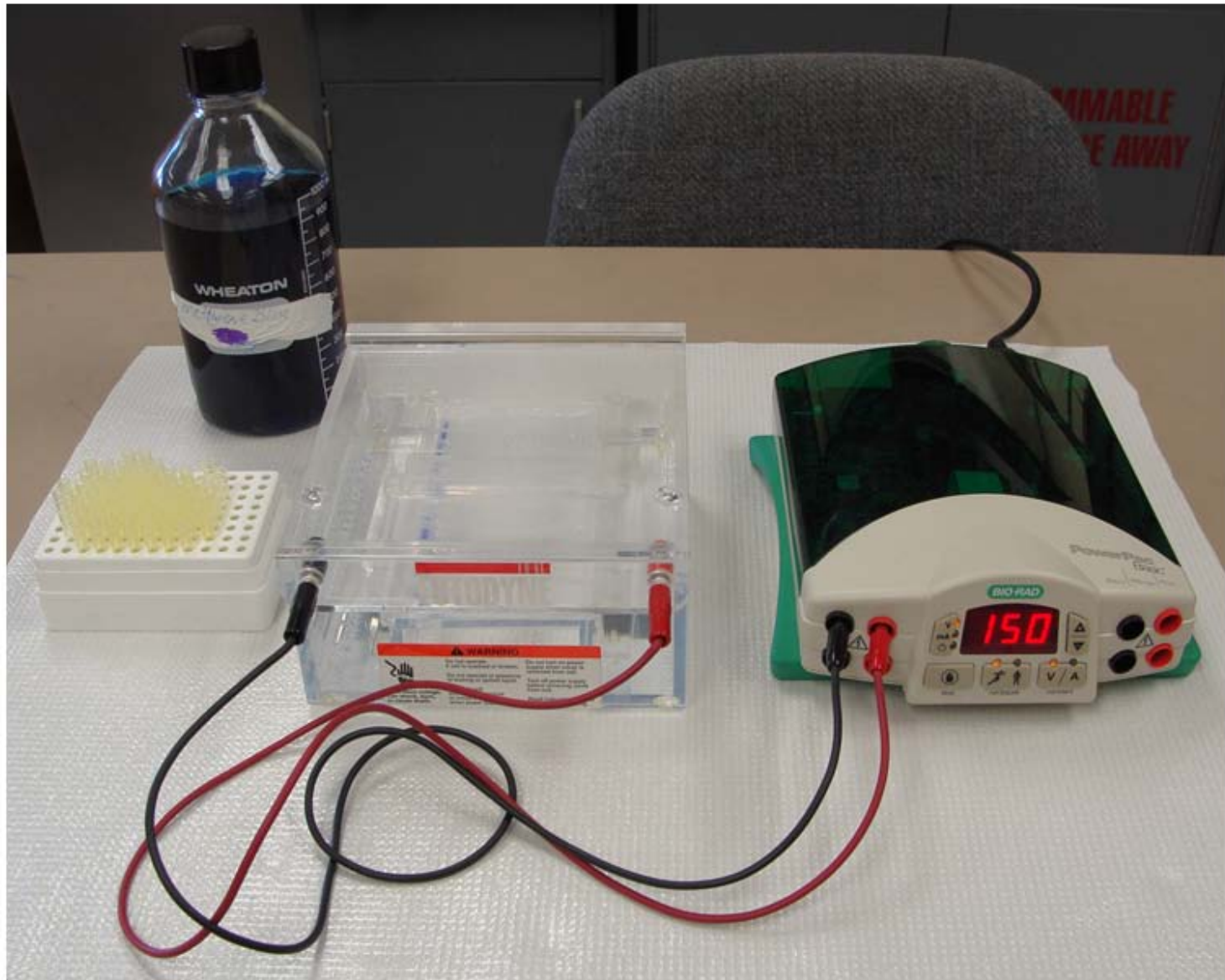
4.4.5. ELEKTROFOREZ¶

¶
En basit tanımlama ile elektroforez elektrolitlerin (iyonların ve iyonik bileşiklerin) bir elektriksel alanda hareketidir. Elektroforez işlemi ile kromatografi işlemi arasındaki temel farklılık kromatografide hareketli fazda bulunan solut kapılar hareketle ilerlerken elektroforez işleminde iyonlar elektriksel akıyla hareket etmektedir.¶

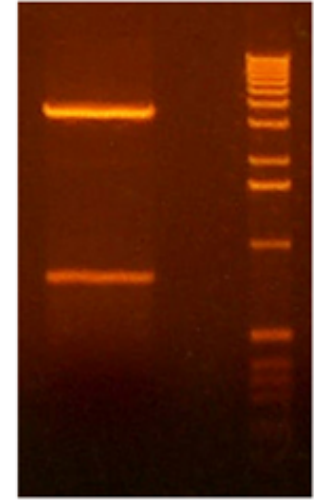
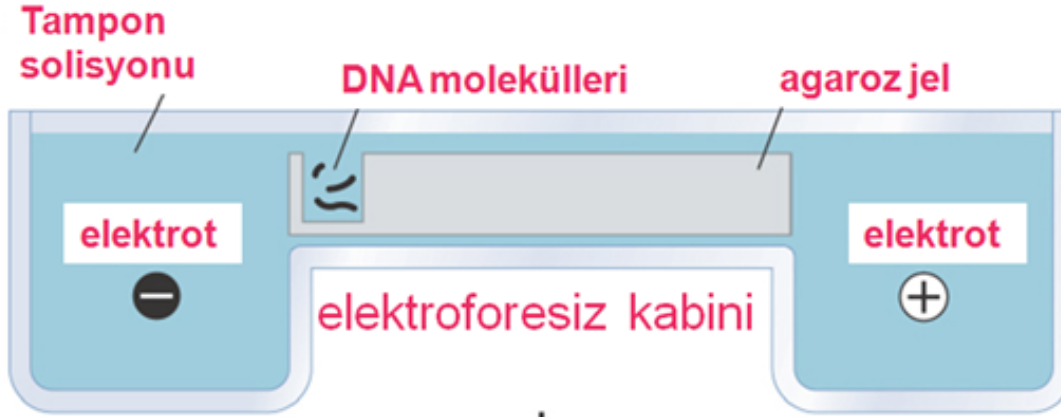
¶
→ Elektroforez işlemimde bir destek matriksi (kağıt, jel) uygun bir tampon içerisine yerleştirilir. Yatay olarak yerleştirilen matriksin üst yüzeyi 1-2 mm tampon solisyonu ile örtülüdür. Dikey olarak yerleştirilenlerde örneğin poliakrilamid jellerde matriks iki cam plaka ile kapatılmıştır. İster yatay isterse de dikey olsun her iki sistemde de matriks uç kısımları solisyonun içersindedir.¶

¶
→ Şekil 4.3'de yatay elektroforez sisteminde destek matriksi agaroz ve ayrışımı düşünülen molekül DNA olarak gösterilmektedir. Elektroforez sisteminde kullanılan matriks (örneğin agaroz, poliakrilamid vb) gözenekli olup bu gözeneklerden yüklü moleküller büyüklüklerine göre hareket ederler. Büyük moleküller küçük moleküllere göre daha yavaş ilerler.¶





Lab set-up for agarose gel electrophoresis



Ethidium bromit boyaması



Şekil 4.3. Elektroforez cihazı ve ayırma prensibi

samples

Marker

A

B

C

1,200 bp

1,000 bp

900 bp

800 bp

700 bp

600 bp

500 bp

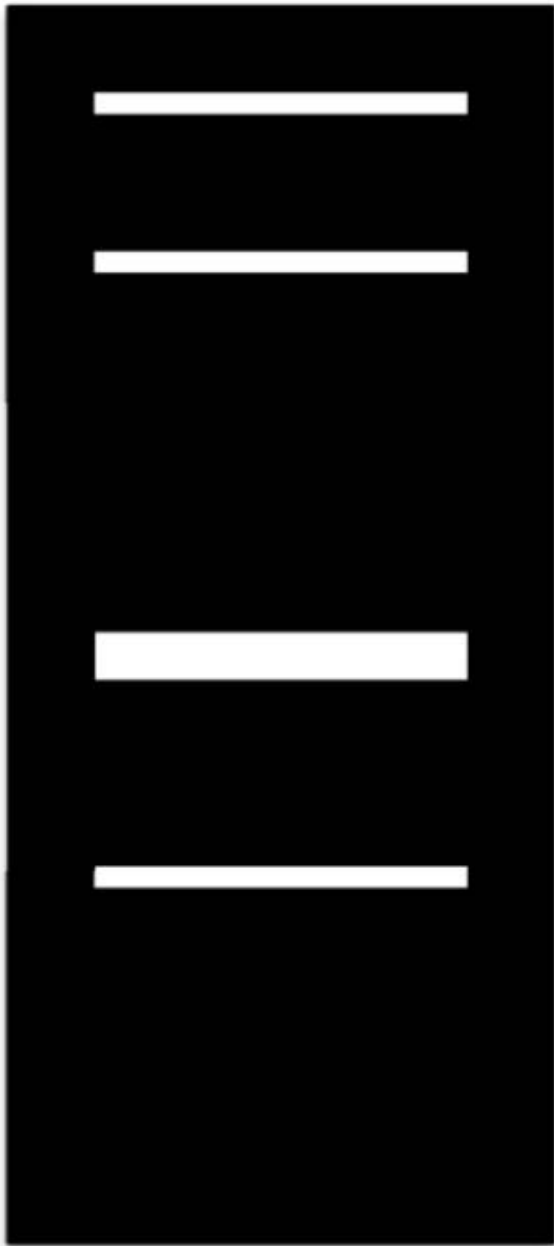
400 bp

300 bp

200 bp

100 bp



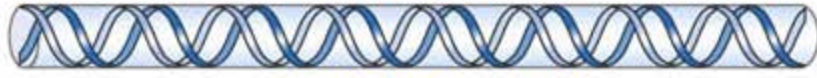


Nicked

Linear

Supercoiled

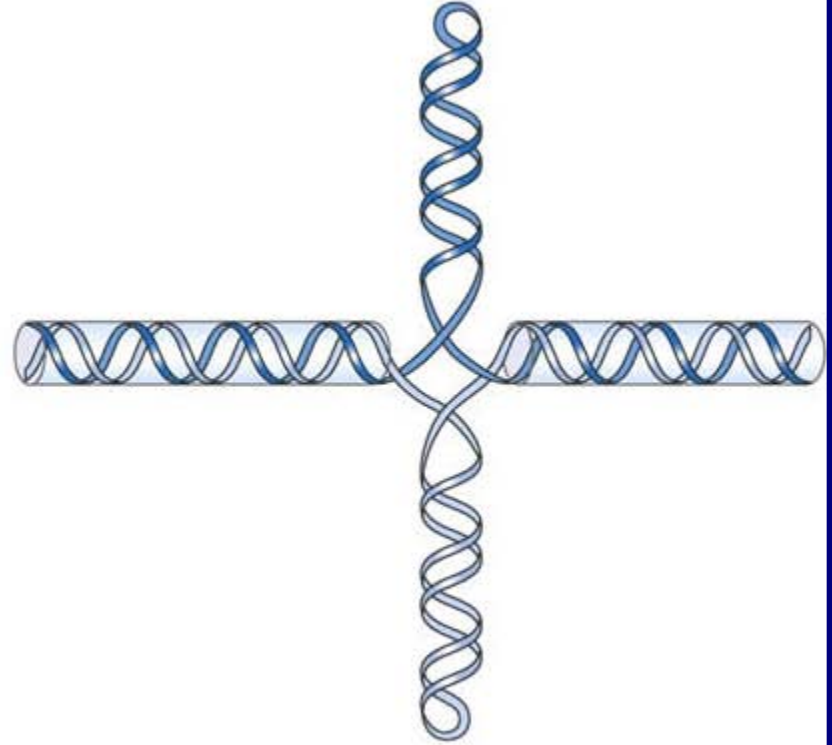
Circular, single-stranded



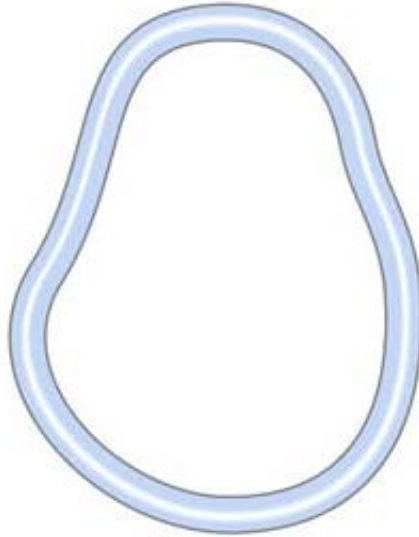
HELİKS DNA



AÇIK DNA



ARTI DNA



Heliks DNA

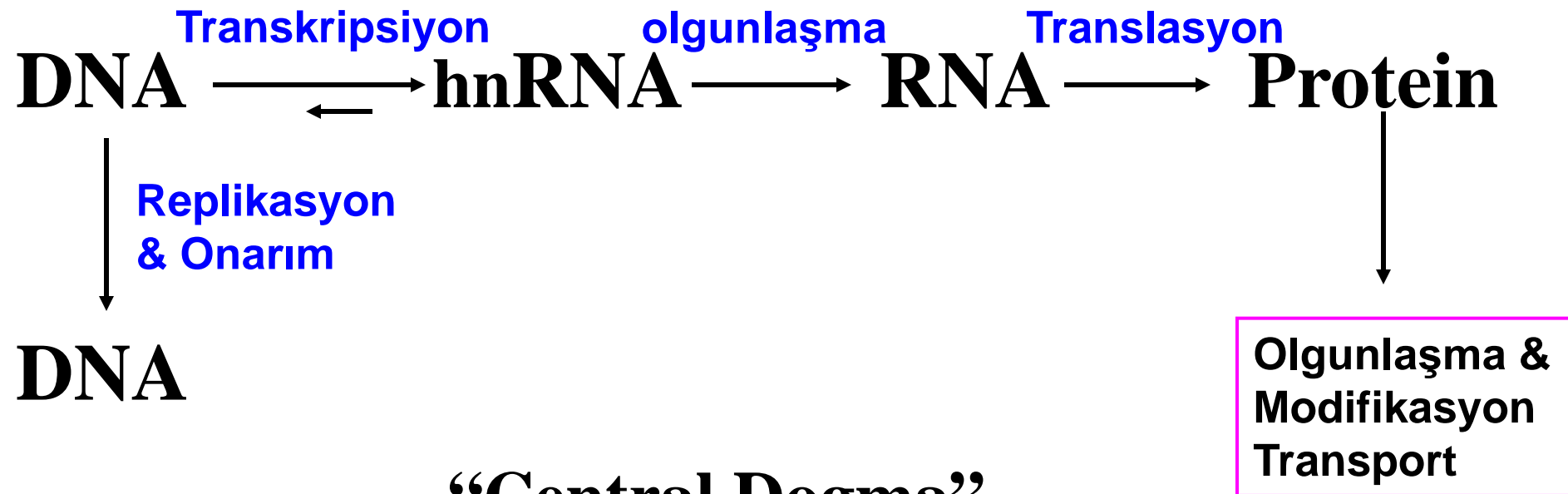


Pozitif Süper KIVRIM



Negatif Süper KIVRIM





“Central Dogma”

Moleküler Biyolojinin Ana Kuralı