

GENETİK MÜHENDİSLİĞİ

DENATÜRASYON-RENATÜRASYON

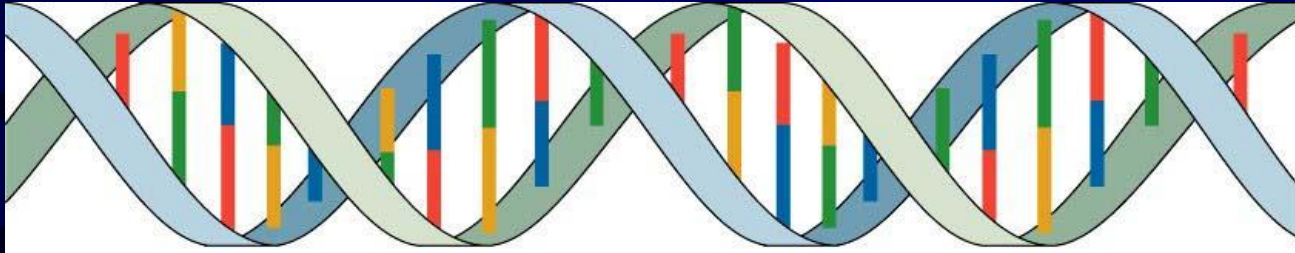
Bazlar arasındaki H bağları kopunca çift sarmalın zincirleri birbirinden ayrılır: **DENATÜRASYON**

H bağları

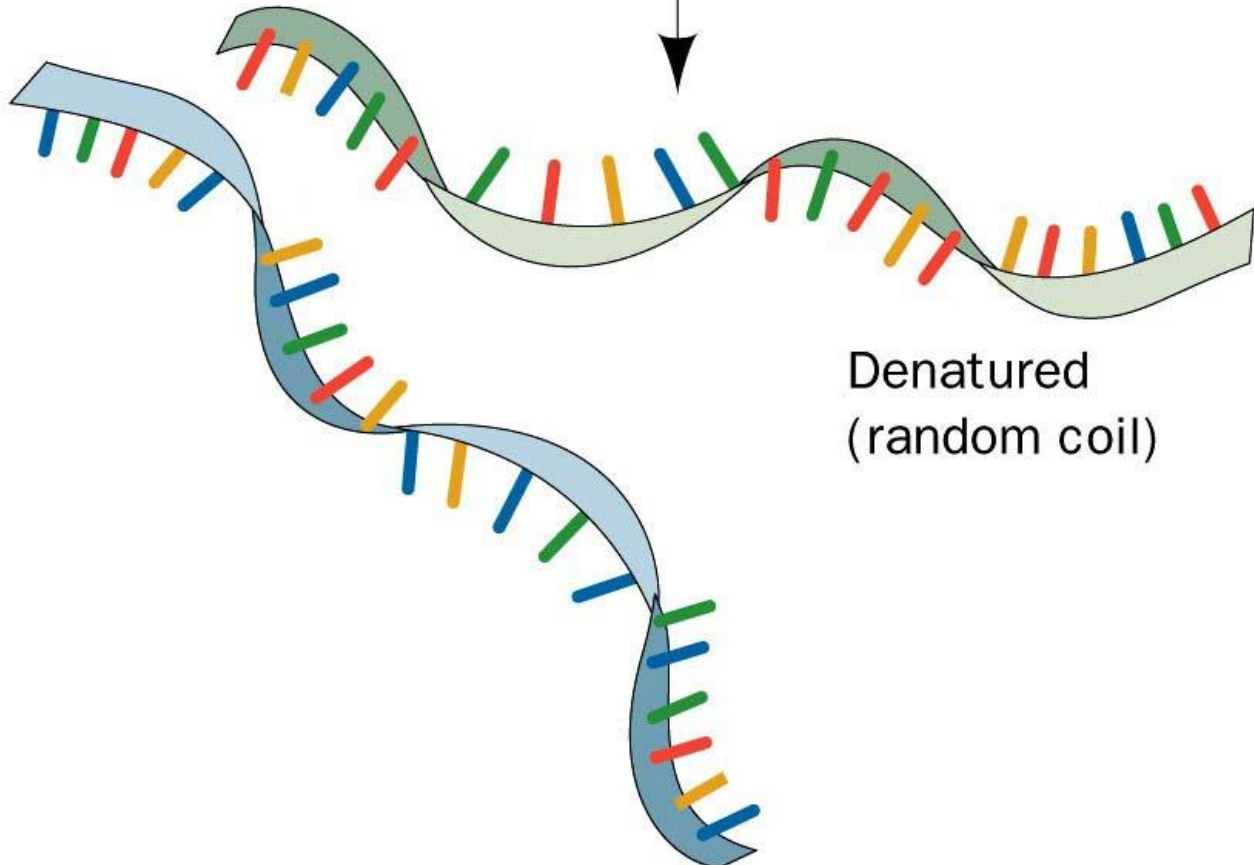
- 1) pH değişikliği ve/veya
- 2) Sıcaklık
- 3) Enzimler aracılığıyla kopar.

Ana omurgadaki fosfodiester bağları bu etkiye dayanıklıdır, kopmaz!

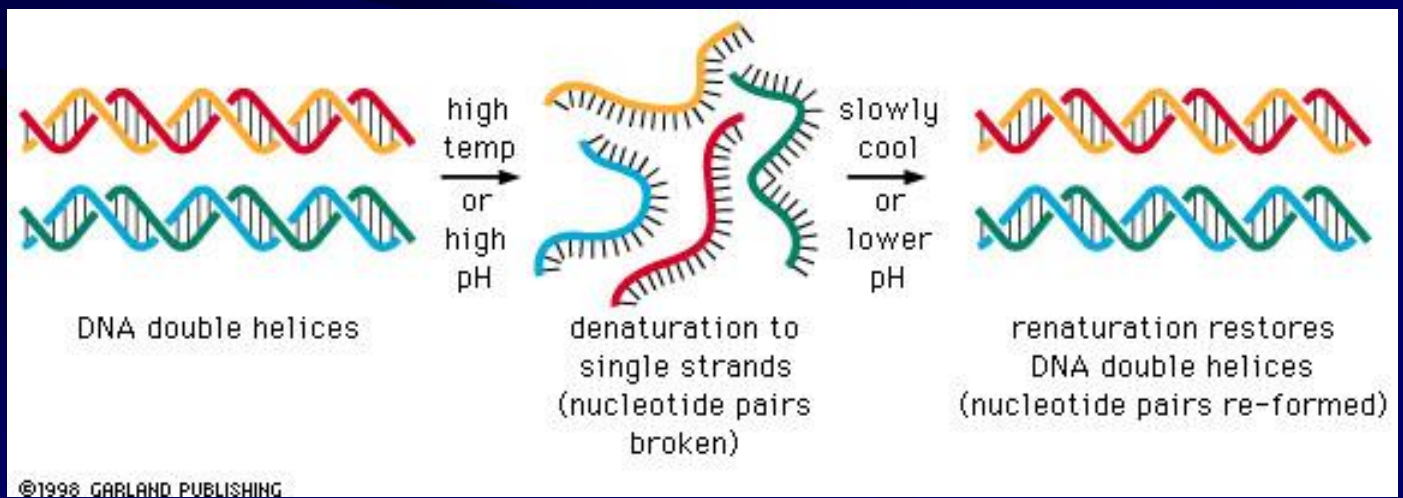
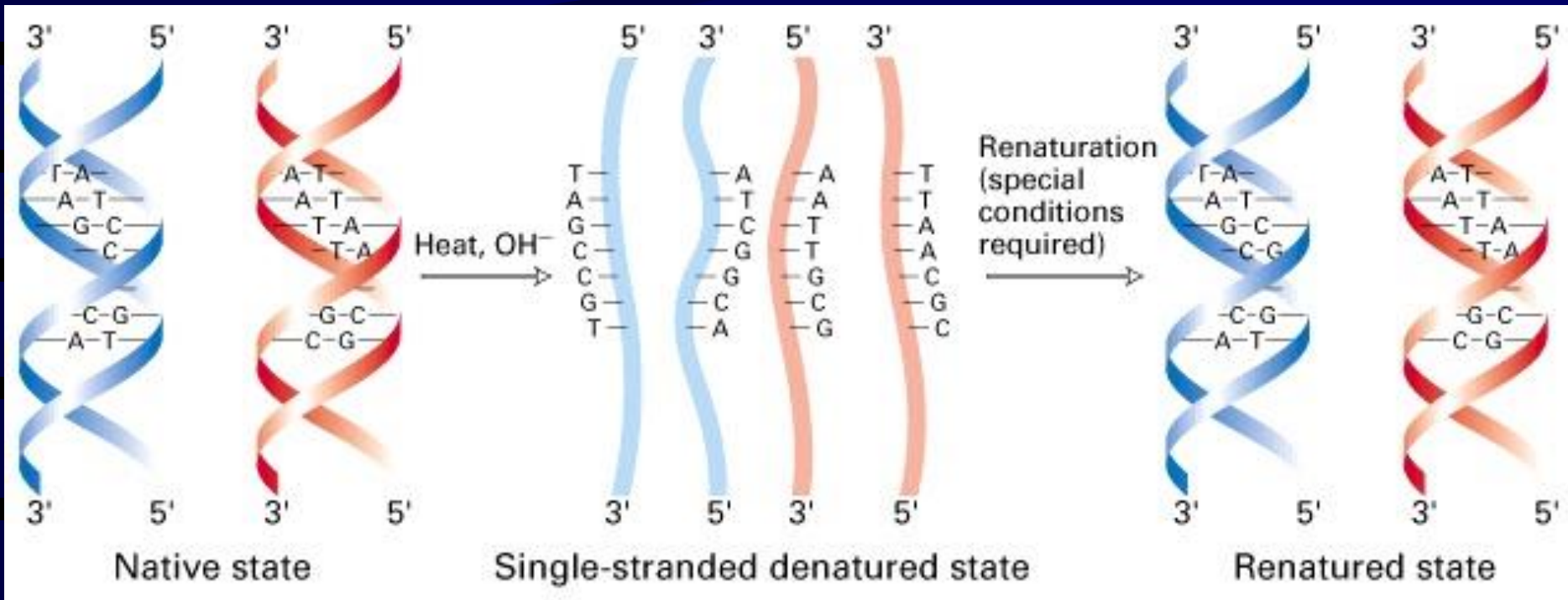
DNA'nın iki zinciri birbirinden tamamen ayrılrsa bile denatürasyon GERİ DÖNÜŞÜMLÜ bir olaydır. Sıcaklık düşürülüp, pH ayarlanınca iki zincir tekrar birleşir: **RENATÜRASYON**



Native (double helix)



Denatured
(random coil)

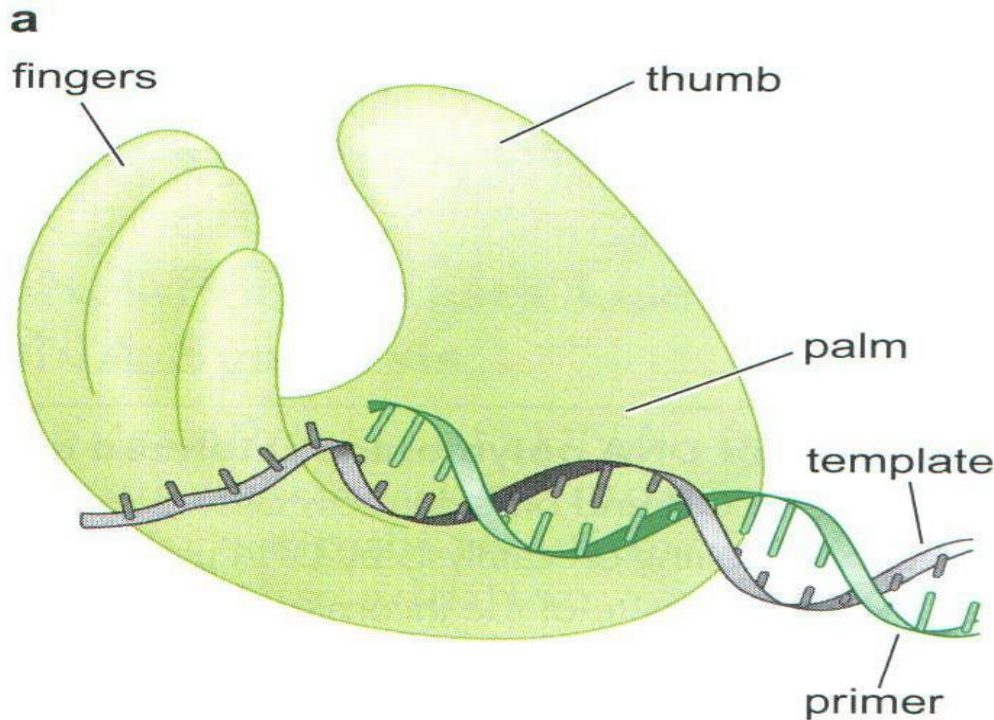


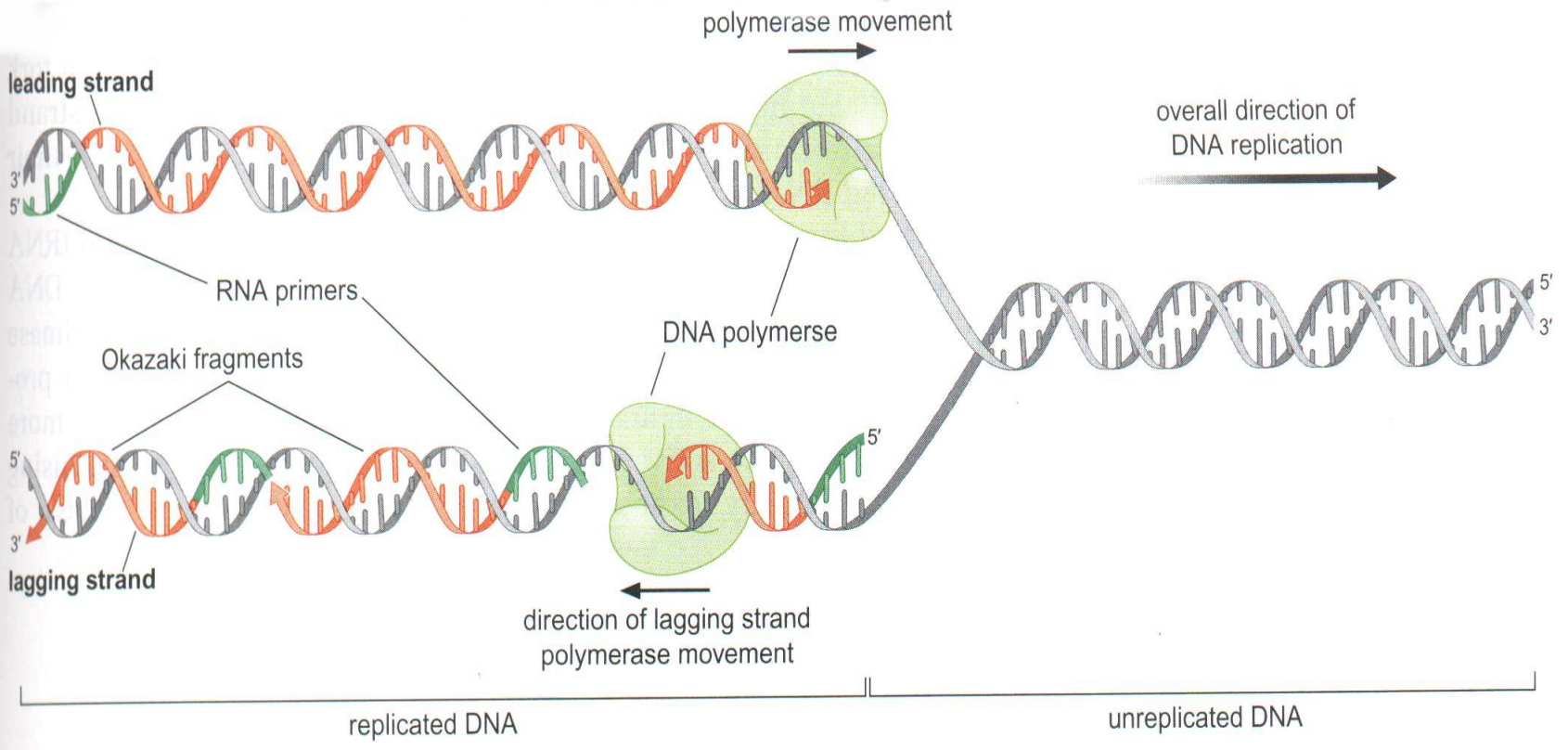
Aynı Türe ya da İki Farklı Türe ait DNA'lar birbiri ile Hibritleşebilir

- **İzole edilen DNA lar tamamen denature edildikten sonra tekrar birbirleri ile karıştırılacak olursa aynı türden DNA lar tamamen, farklı türden DNA lar ise kısmen hibritleşebilir.**
- **Farklı türden DNA ların birleşmesi ile oluşan yapıya hibrit dupleks yapı adı verilir.**
- **Eğer insan, maymun ve maya DNA sı denature edilip karıştırılacak olursa insan-maymun dupleks oranı, insan-maya dupleks oranından daha büyük olacaktır.**
- **DNA-DNA hibridizasyon testleri ile canlıların birbirine olan benzerlikleri belirlenebilmektedir.**
- **DNA-DNA ve DNA-RNA hibridizasyonu genetik mühendisliğinin önemli bir uygulama alanı olup bir canlıdan uygun vektörler ile bir başka canlıya genlerin aktarılması işlemi yapılmaktadır.**

DNA Polimerazın Yapısı

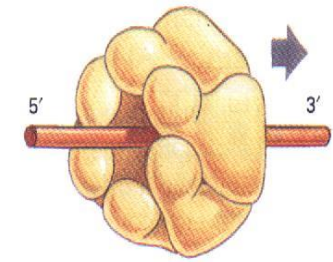
DNA polimerazın reaksiyon sırasındaki üç boyutlu yapısı, kalıp primeri kavrayan kısmen kapalı durumda bir sağ el şeklinde. Enzimin birimleri: baş parmak, parmaklar , aya. Yeni sentezlenen DNA aya ile ilişkili; kataliz yeri parmaklarla baş parmak arasındaki oyukta



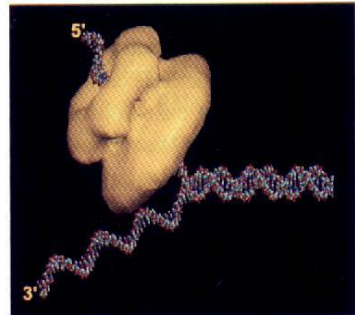


DNA Helikazlar

Replikasyon çatalının ilerlemesi için çift sarmalı çözen enzimler; halka biçiminde heksamerik proteinler
Tek zincirli DNA'ya bağlanıp, enerji olarak ATP hidrolizini kullanarak tek zincirli DNA boyunca hareket eder ve başka bir DNA zinciriyle bağlantısını yok ederler.



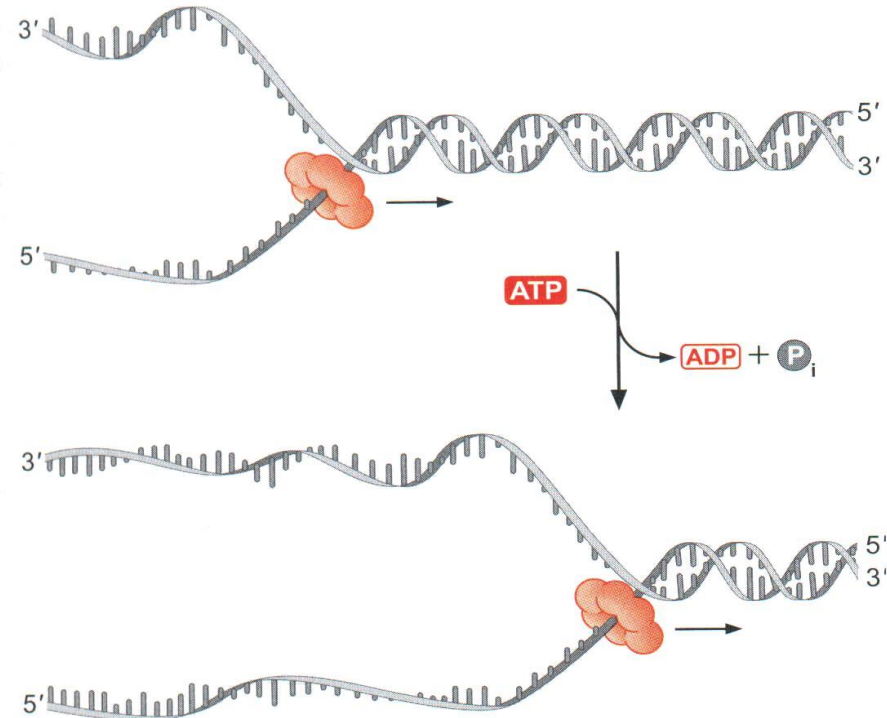
(A)



(B)



(C)



PLASMİDLER

- Prokaryotlar daire şeklinde büyük bir DNA molekülüne sahiptir.
- Bazı bakteriler nuklear bölgelerinde kendi DNA ları dışında sitoplazmalarında serbest olarak dolaşan küçük dairesel DNA molekülleri taşırlar. Bu ekstrakromozomal DNA lara PLAZMİD adı verilir.
- Bakterilerin binlerce gen taşımalarına karşılık plazmidleri birkaç gen bulundururlar.
- Bakterilerin çoğalması sırasında plazmidlerde kendi benzerlerini sentezlerler ve yeni bakterilere aynı şekilde geçerler.
- Plazmidler genetik mühendisliğinin önemli bir aracıdır. Bakterilerin içinde çoğalan plazmidlerin izole edilmeleri mümkündür.
- İzole edilen plazmid DNA ları bir yerinden kesilerek başka bir hücreden alınan veya mRNA dan sentezlenen gen bu bölgeye yerleştirilerek tekrar ait oldukları bakteriye nakledilirler.
- Bu geni alan bakteri yeni bir protein sentezlemeye başlar. Bu tekniğe **Rekombinant DNA Teknolojisi** adı verilmektedir.

- Çubuk şeklinde (basil)
- Gram negatif
- Flagella ile çevrili
- Hareketli
- Minimal besiyerinde yetişebilen
- Spor oluşturmayan
- Baklagillerde azot fiksasyonu yapan Rhizobiaceae familyasına ait bir Alpha proebacterium'dur.
- Dikotiledonların 140 türünden fazlasında Taç uru hastalığına (tümör oluşumu) neden olan bir ajandır.



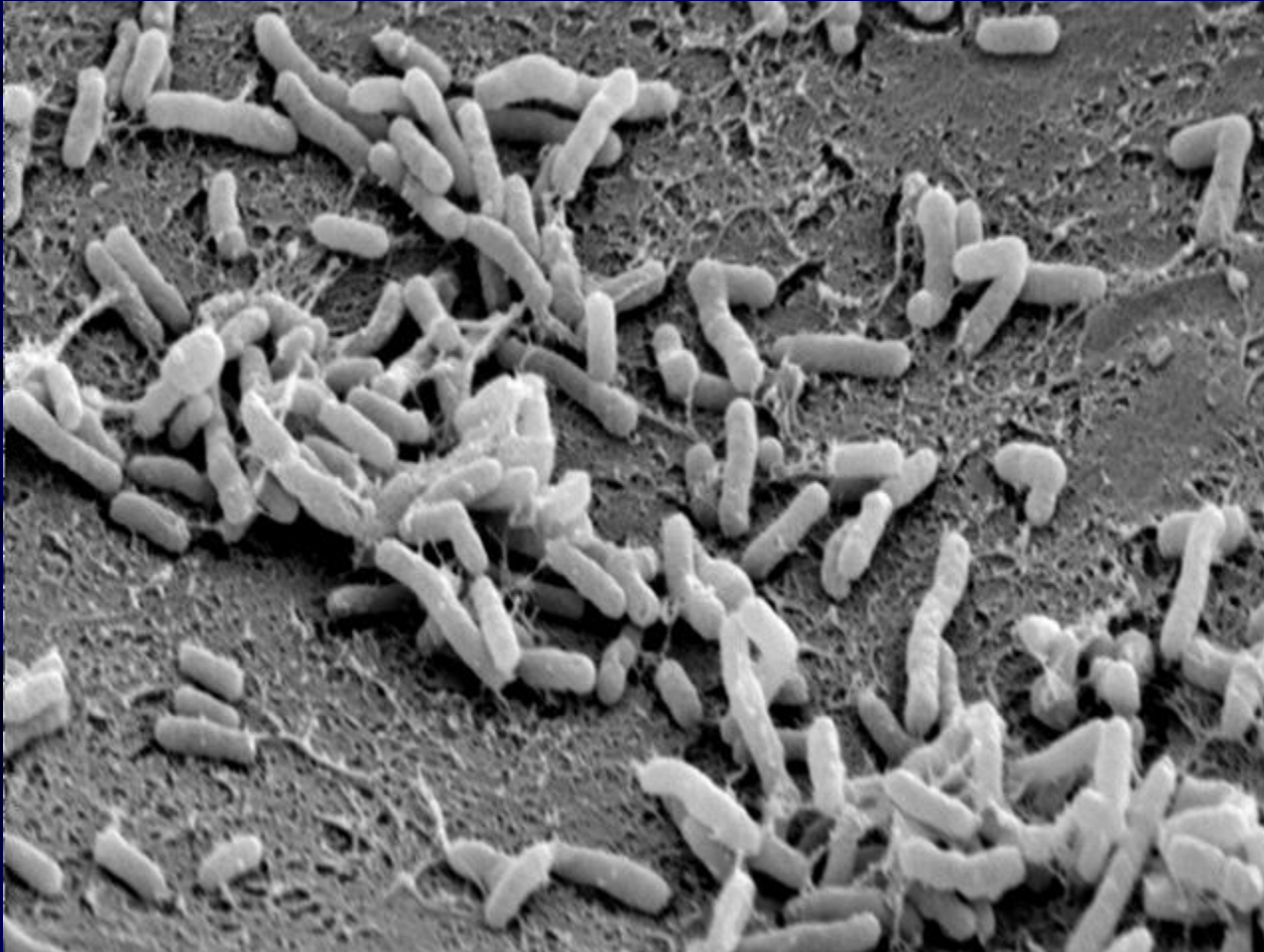
- Taç tümörleri başlarda küçük, beyaz, yumuşak çıkıntılar olarak gözlenir. Büyüdükçe yüzeyi kahverengileşir.

- Bakteriyle enfekte olan bitkide büyüme yavaşlar, bitki abiyotik şartlara daha duyarlı hale gelir.

- Tümörlü bölge diğer fitopatojen-lerle daha kolay enfekte olabilir.



Agrobacterium tumefaciens



KÖK KANSERİ

(*Agrobacterium tumefaciens*)

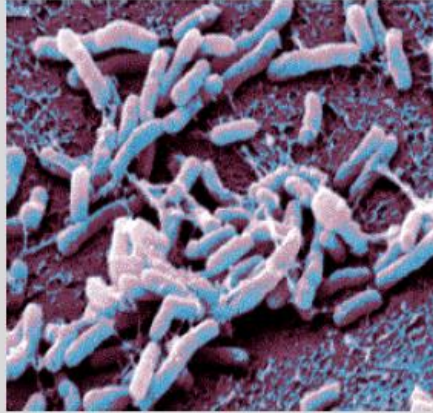


KÖK KANSERİ

(*Agrobacterium tumefaciens*)



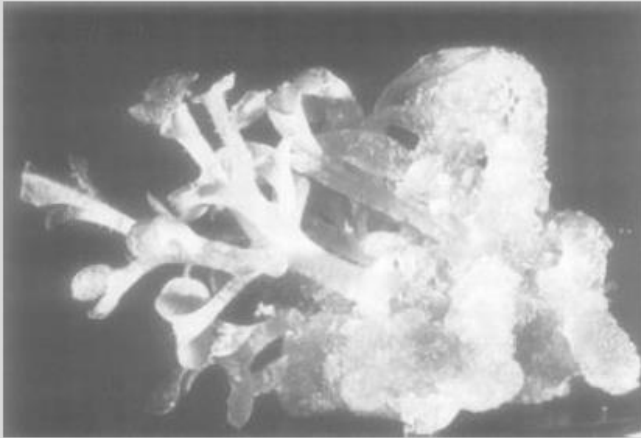
Agrobacterium tumefaciens





- 1983

Agrobacterium tumefaciens'in vektör olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilen ilk bitki transformasyonu



Agrobacterium'un biyoteknolojide kullanımı

- *Agrobacterium*'un bitkilere gen transfer edebilme yeteneği, biyoteknolojide özellikle bitki ıslahında çok kullanılmaktadır.
- Ti plazmidindeki tümör indükleyici genler çıkarılır ve istenilen gen, seçimi kolaylaştıracak bir marker genle beraber plazmide eklenir.

- Protoplast kültürleri, yaprak diskleri gibi bitki materyalleri, değiştirilmiş plazmide sahip bakteri ile enfekte edilir.
- Transformasyonun gerçekleştiği parçalar alınarak bitki doku kültüründe yetiştirilir. Daha iyi transformasyon için bitki de manipüle edilebilir.

- *A. tumefaciens*, doğada dikotil bitkilerde 90 aileden yüzlerce türü enfekte edebilir.
- Laboratuvar çalışmalarıyla bu sayı daha da arttırılmıştır. Sadece enfekte edilemeyen bitkiler değil; bakteriler, mantarlar ve insan hücrelerinde de başarılı çalışmalar yapılmıştır.

En genel anlamıyla bitkilere gen aktarımı;

gen protein ürününün işlevi bilinen doğal ya da sentetik nükleik asit dizilerinin bitki hücrelerine genetik mühendisliği teknikleri kullanılarak aktarılmasıdır.

Genetik transformasyon olarak tanımlanan bu süreç;

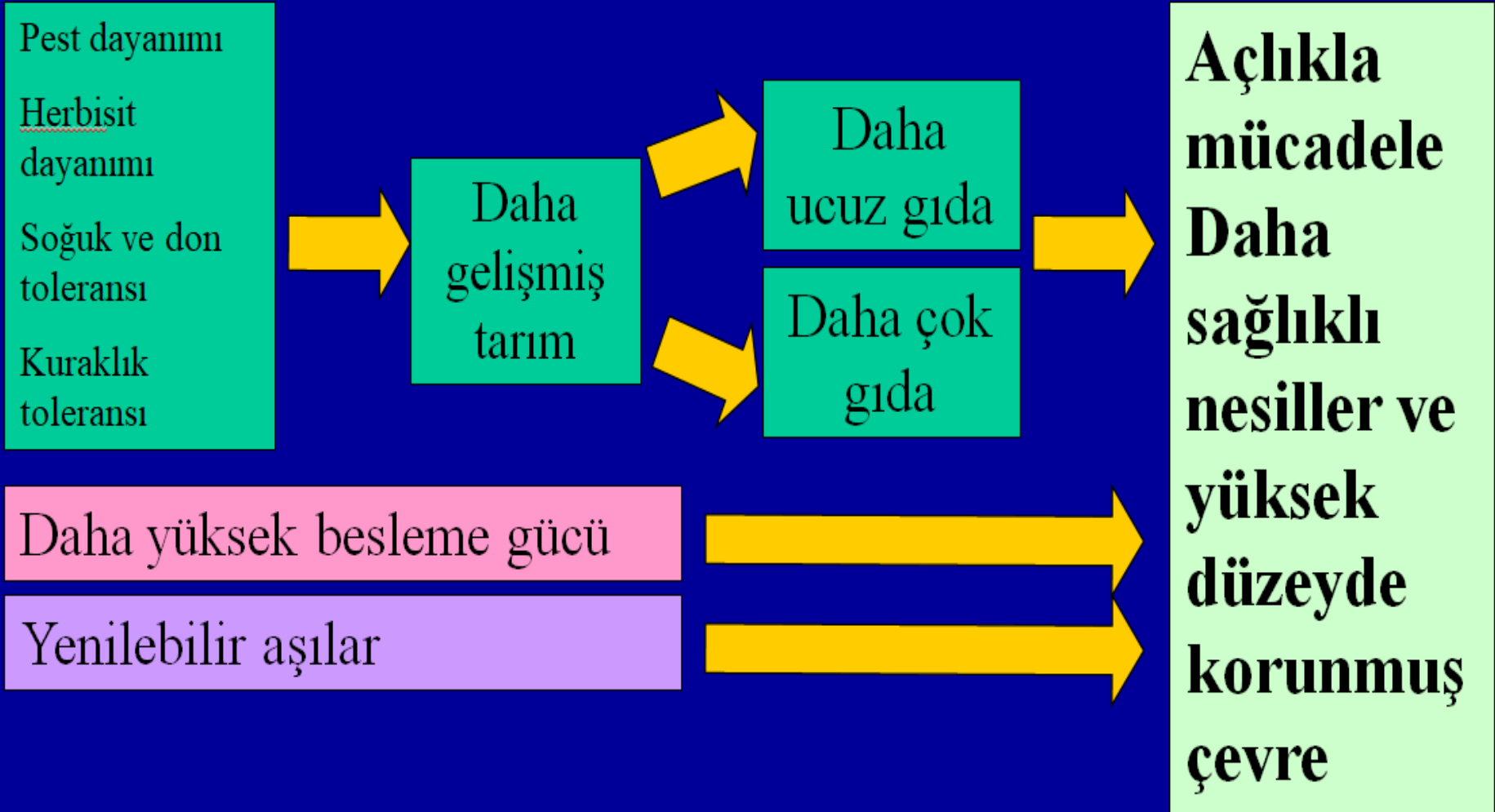
- Yabancı nükleik asit molekülünün hücreye girişi (insersiyon),
- Genoma bağlanması (entegrasyon),
- Genin anlatımının yapılması (ekspresyon) ve
- Genin/ kazanılan yeni özelliklerin yavru döllere aktarımı (transmisyon) aşamalarından oluşur.

Transgenik bitki nedir?

- Genomunda kendine ait olmayan farklı bir gen veya yabancı DNA taşıyan bitkilere denir.



GDO: Potansiyel Faydalar



Transgenik bitkilerin kullanım alanlarından örnekler

- Besin kalitesinin iyileştirilmesi
- Herbiside dayanıklılık
- Böceklerle dayanıklılık
- Hastalıklara Dayanıklılık
- Abiyotik stres şartlarına dayanıklılık
- Antisens RNA ve RNAi
- Biyo-ilaçlar (Moleküler Tarım)
- Transgenik bitkiler tarafından üretilen bazı proteinler
- Transgenik yenilebilir aşular

➤ Besin kalitesinin iyileştirilmesi

- Altın pirinç, Beta-karoten (Vitamin A prekürsörü)
- Yağ asitleri kompozisyonu değiştirilerek ürün kalitesinin artırılması

➤ Herbiside dayanıklılık

- Glifosat
- Fosfinotrisin (PPM)

➤ Böceklere dayanıklılık

- Zararlılar için toksik protein üretimi
- Çevre dostu, ekonomik

➤ Hastalıklara Dayanıklılık

- Virüslere dayanıklılık (Domates, patates vb.)
- Fungal hastalıklara dayanıklılık (Ayçiçeği, asma powdery mildew –çeltik chitinaseI geni)
- Erik pox virüsüne dayanıklı transgenik erik

➤ Abiyotik stres şartlarına dayanıklılık

- Tuza dayanıklılık (Tuza dayanıklı domates)
- Dona dayanıklılık
- Kuraklığa dayanıklılık

➤ Antisens RNA ve RNAi

- Domatesin Pazar ömrünün uzatılması
- Etilen üretimi durdurulması
- Virüslere dayanıklılık
- Süs bitkilerinde değişik çiçek rengi oluşumu

✓ Biyo-ilaçlar (Moleküler Tarım)

- Bakteriler tarafından üretilmeyen proteinler (Glikoproteinler)
- İstenildiği miktarda tarla şartlarında üretilebilir (Pahalı fermentasyona gerek yok)
- Memeli hücreleri veya dokularından kaynaklanan (bulaşıcı hastalık) bir tehlike yok
- Saflaştırma oldukça kolaydır

➤ Transgenik bitkiler tarafından üretilen bazı proteinler

- İnsan büyüme hormonları
- İnsanlar için kullanılan antikorlar
- HIV, RSV, HSV (soğuk algınlığı) vb.

➤ Transgenik yenilebilir aşılar

- Akut solunum hastalığı
- Kolera
- Bazı bakteriyel hastalıklar

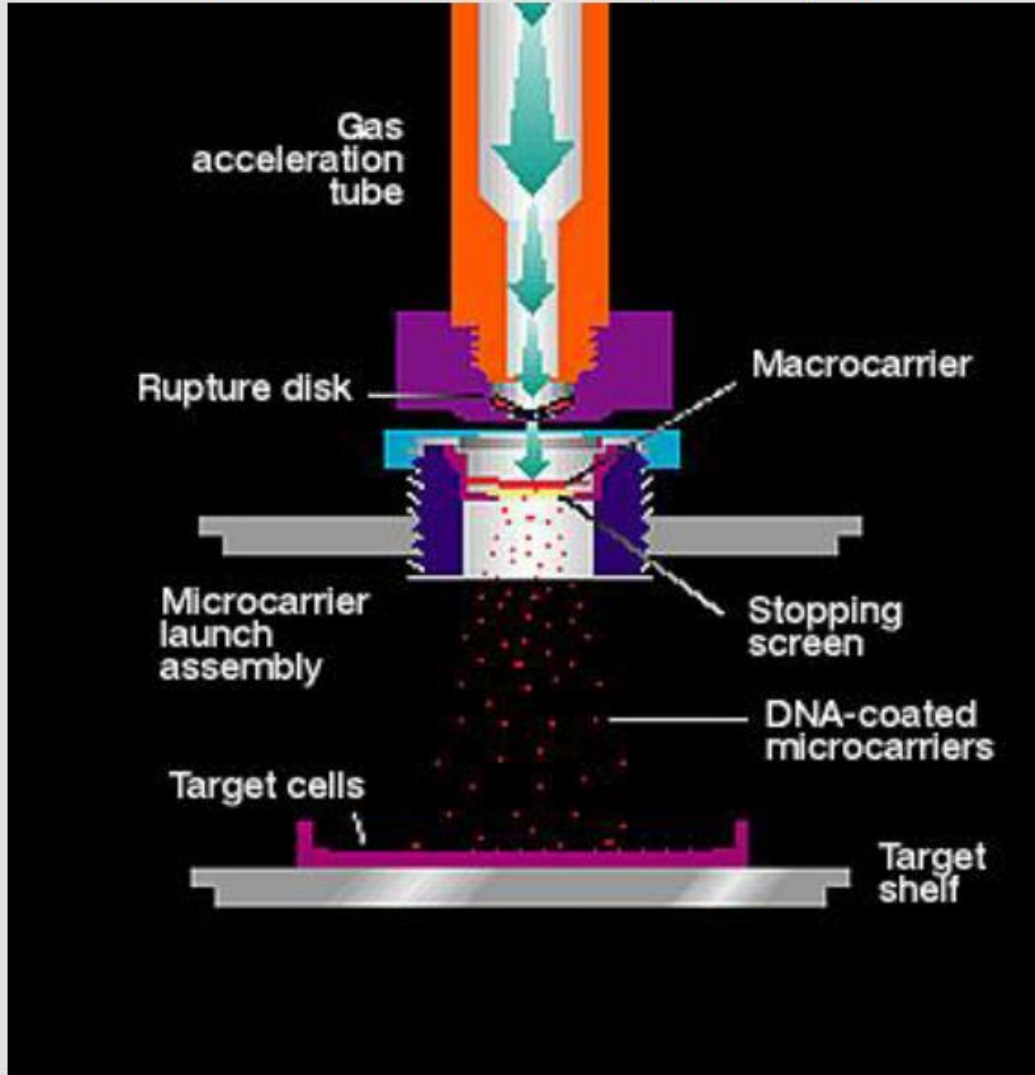
Transgenik bitkiler nasıl elde edilir?

- * Doğrudan gen aktarım sistemleri
 - Biyolistik (partikül tabancası veya bombardımanı)
 - Elektroporasyon
 - Kimyasal yöntemlerle protoplastlara gen aktarımı
 - Makroenjeksiyon
 - Mikroenjeksiyon
 - Polen transformasyonu
 - Zigotik embriyoya DNA emdirilmesi
 - Fiberler aracılığıyla DNA aktarımı
 - Sonikasyon
 - Desikasyon
 - Elektroforez ve mikrolazer

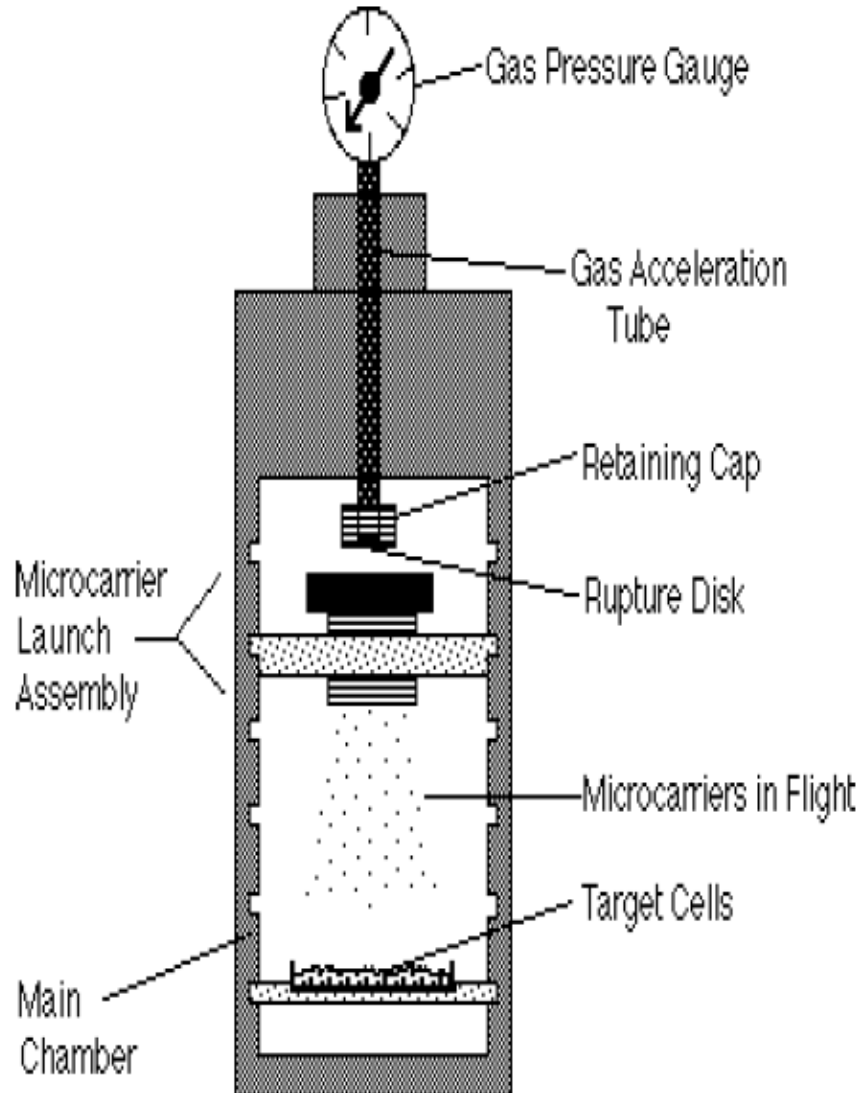
- Dolaylı gen aktarım yolları
 - * *Agrobacterium tumefaciens*
 - * *Agrobacterium rhizogenes*
 - * Viruslar

- Biyolistik

Biyolistik, biyolojik ve balistik kelimelerinin kısaltmalarının birleştirilmesiyle adlandırılan, hücrelerin DNA ile kaplı hızlandırılmış mikro taşıyıcılarla transfekte edilmesinde kullanılan bir yöntem/cihazdır.

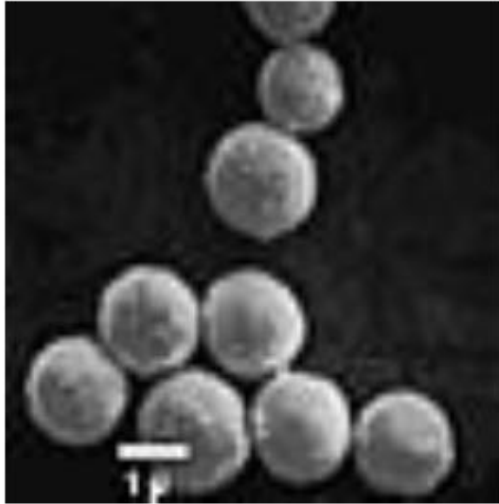


Biyolistik Aletinin Şeması

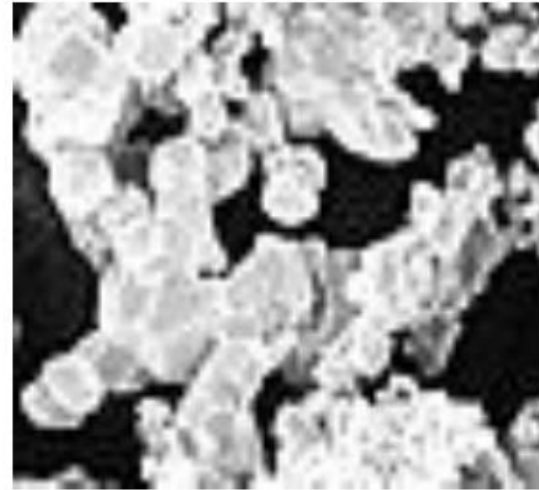


- Gaz basıncı göstergesi
- Gaz hızlanma tüpü
- Tutucu başlık
- Ayırıcı disk
- Ana bölüm

Metal partikülleri



Altın partikülleri



Tungsten partikülleri

Tungsten partiküllerinin ortalama çapları $0,5-2,0 \mu\text{m}$ 'dir. Ancak düzensiz şekilleri ve belli hücre tipleri için toksik etkili olmaları, DNA çökmesine neden olabilen yüzey oksidasyonuna neden olmaları nedeniyle tercih edilmezler. Bunun yerine daha pahalı olan ancak $1-3 \mu\text{m}$ çapta düzenli şekillere sahip olan altın partikülleri kullanılması tercih edilebilmektedir.

Partiküllerin Hazırlanması

1.Aşama: Partiküllerin sterilizasyonu ve birbirlerinden ayrılması:

- 30mg altın partikülü tartılır ve steril bir silikon santrifüj tüpüne yerleştirilir konur ve üstüne 0.5ml %100'lük etanol eklenir, yüksek hızda 1-2 dk vortexlenir. Ardından 10.000 rpm'de 10 sn döndürülür. İşlem üç kez tekrarlanır.
- Tüp 1 dk boyunca santrifüjlenir, ardından süpernatant alınır yerine 0.5 ml steril ve iki kere distile edilmiş su eklenir. Daha sonra vortexlenir ve santrifüje konur. İşlem bir kez daha tekrar edilir.
- Partiküller son kez 0.5 ml steril ve iki kere distile edilmiş suda çözünür ve 50 µl ayrılır diğer karışım 4° C'de saklanır.

Partiküllerin Hazırlanması

2.Aşama: Partiküllerin kaplanması:

- 50 µl altın partikülünün bulunduğu sıvıya yapılabiliirse vorteks sırasında 5 µl DNA (1 mg/ml), 50 µl 2.5 M CaCl₂, 20 µl 0.1 M taze spermidine eklenir.
 - Vortekslemeye 3 dk boyunca devam edildikten sonra en yüksek hızda 6 sn santrifüjlenir ve ardından tüpten mümkün olduğunca çok süpernatant uzaklaştırılır.
 - 250 µl %100'lük etanol eklenip, vorteks, santrifüj ve süpernatantın uzaklaştırılması sırası uygulanır.
 - Partiküller 100 µl %100'lük etanol içine konulup düşük hızda vortekslenirken her makro taşıyıcıya 15 µl'lik eşit miktarlarda aktarılırlar.

Neler aktarılabılır?

Uygun promoter bölge ile birlikte:

Reporter gen

Marker Gen

Genin kendisi

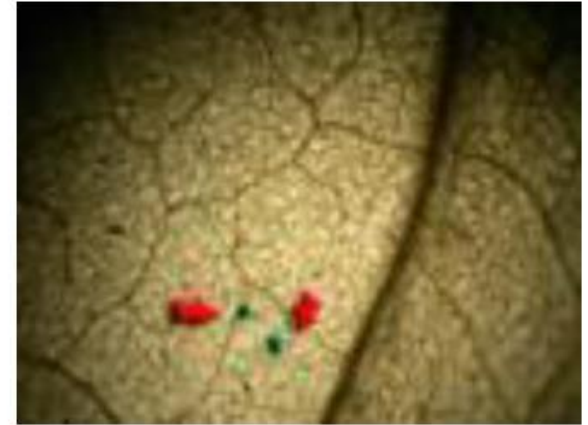
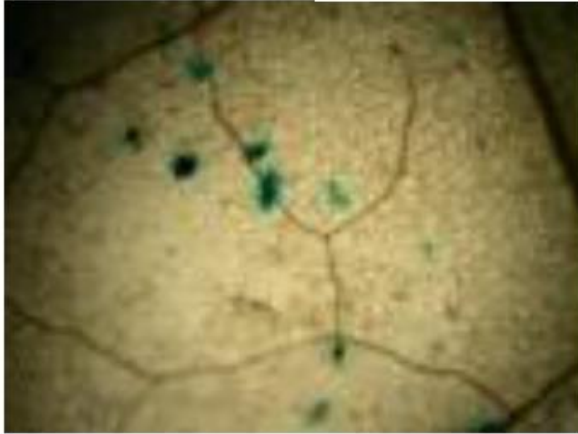
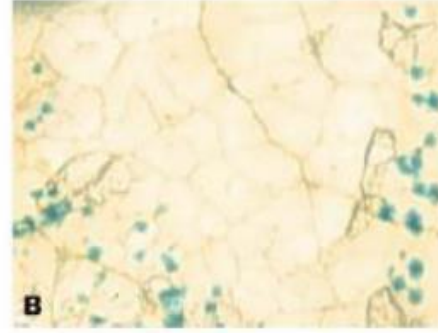
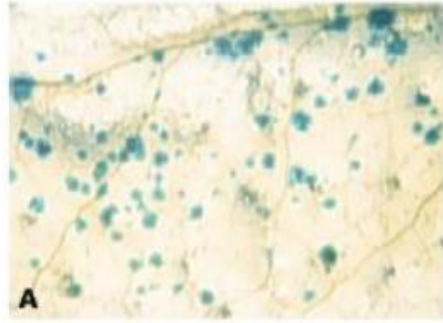
Faj

Bakteri

Maya hücreleri

Gene delivery by the Helios™ Gene Gun



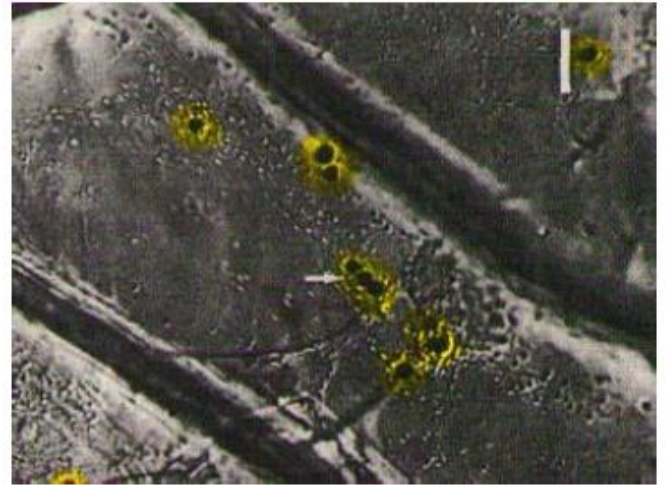
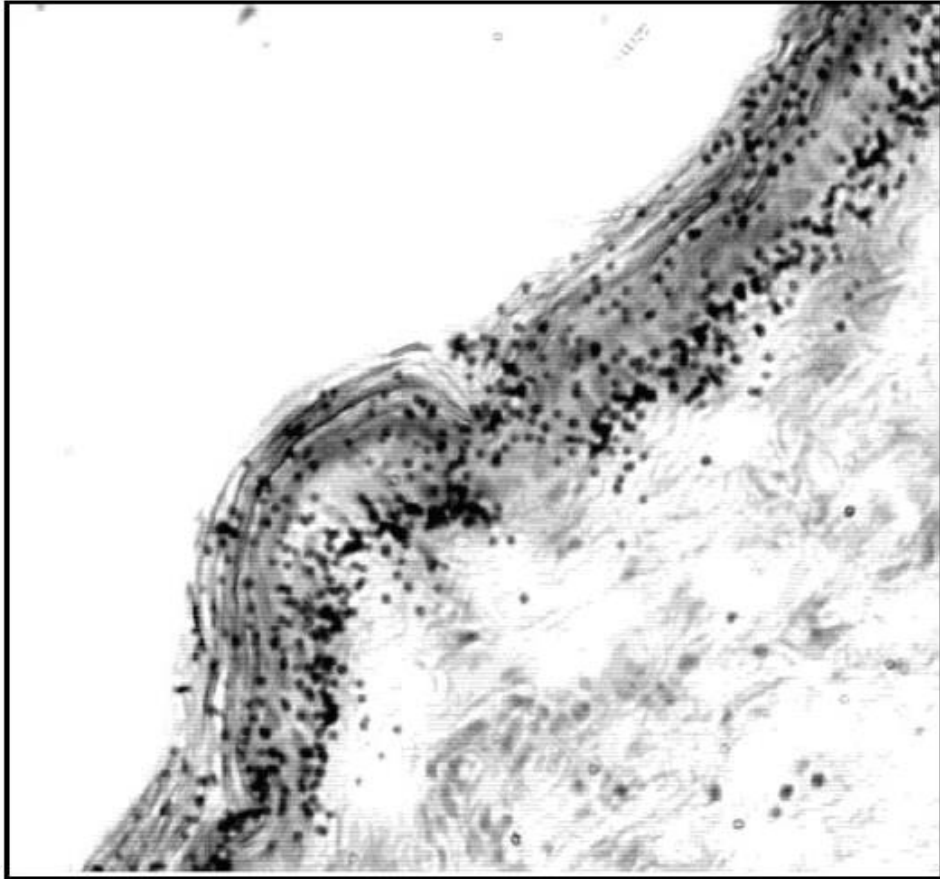


Biyolistik yöntemi başlangıçta maya ve kültüre alınan hayvan hücreleri ile kloroplastlar gibi bitki organellerine gen aktarımında kullanılmıştır.

Bu yöntemle polen, bitki organları, meristemler, kallus, olgunlaşmamış embriyo, olgun embriyo parçaları, yaprak parçaları, mikrosporlar gibi değişik dokulara gen aktarımı uygulanabilir.

Yöntemin avantajları/dezavantajları

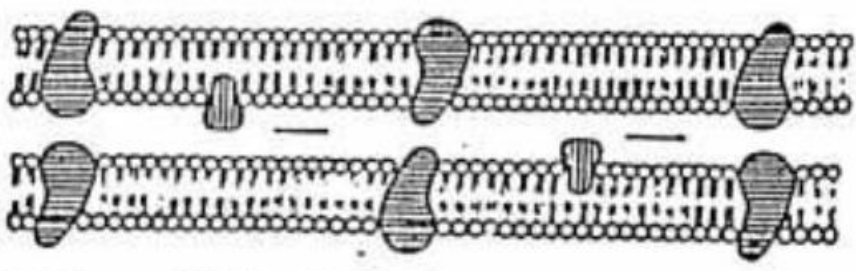
- Kullanım kolaylığı
- Her ateşlemede mikro taşıyıcıların birden fazla hücreye ulaşabilmesi
- Dokulara zarar verebilmesi
- Mikro taşıyıcılara bağlı genlerin biyolojik aktivitelerinin bozulmaması
- Bir çok doku, hücre ve canlı türüne uygulanabilmesi
- Başarılı yöntem için denemelerin gerekmesi
- Başarılı aktarımın sınırlı yüzdesi olması
- Kullanılan malzemeler bazı modellerde pahalı



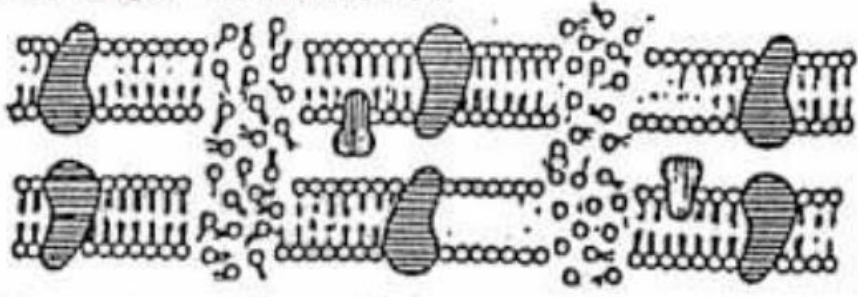
Elektroporasyon ile protoplastlara gen aktarımı

BioRad micropulser elektroporatör

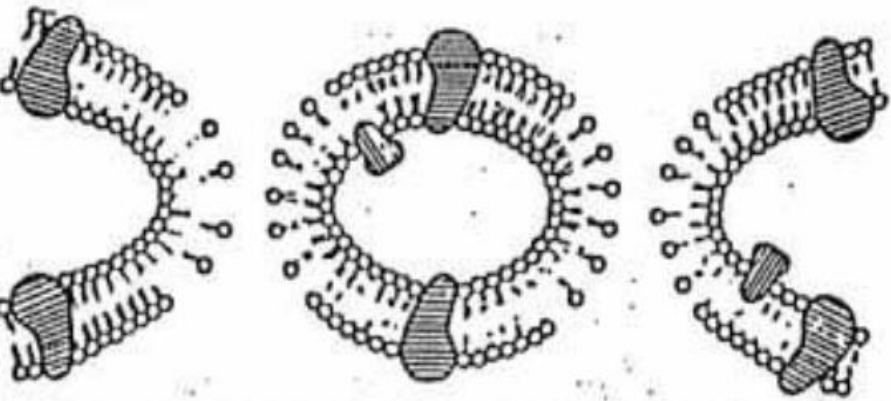
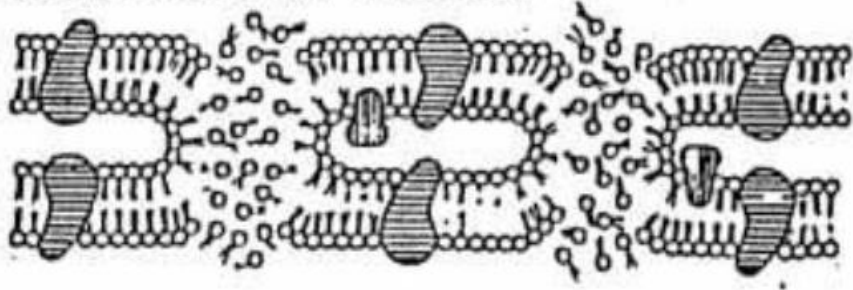




Voltage Stimulated



Reconstruction Process



Elektroporasyon, hücrelere veya dokulara kısa zamanlı çok kuvvetli elektrik akımı uygulayarak, hücre zarında nanometre boyutunda geçici porlar oluşturulması işlemidir.

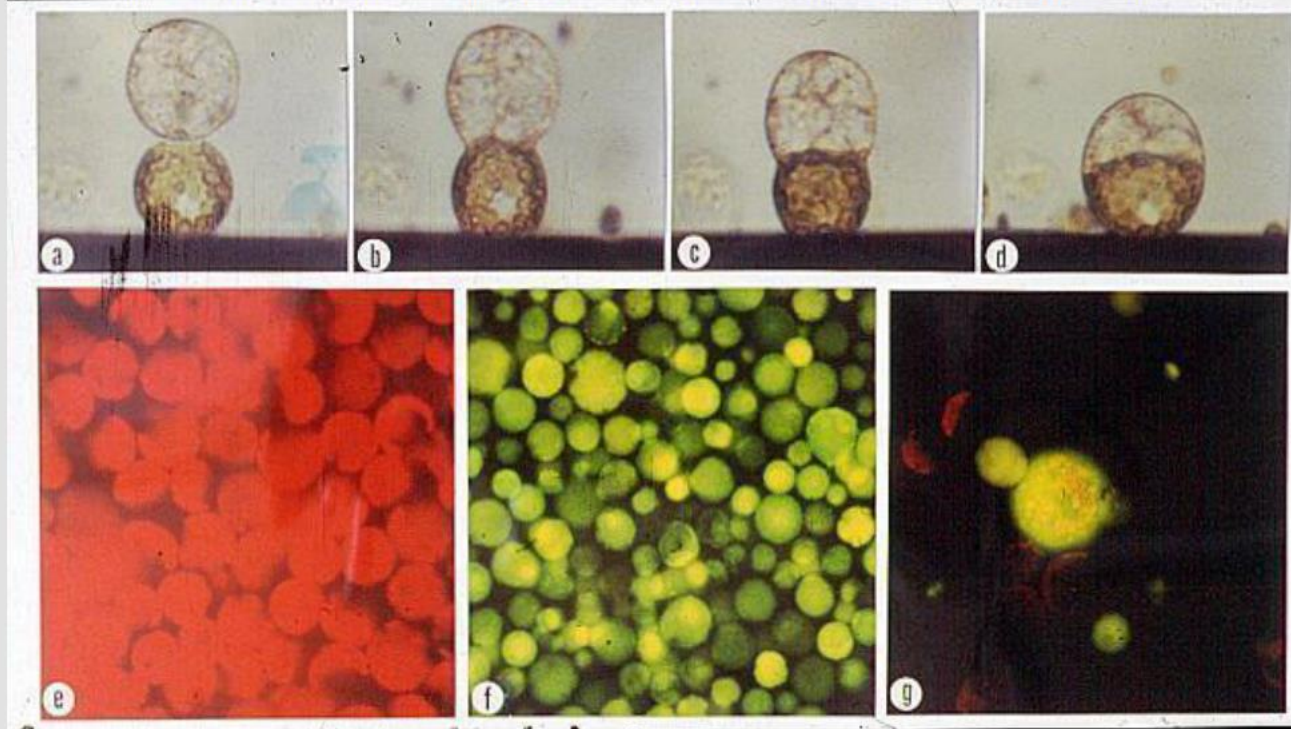
Bu geçici durumda zar, hücrelere DNA, enzim, antikor ve diğer makromolekül geçişine izin verir.

Elektroporasyonun avantajlari

- Hızlı bir yöntemdir.
- **Genis kullanım alanı** : Elektroporasyon neredeyse tüm hücre ve tür tiplerinde etkilidir.
- **Verimlilik**: Hücrelerin çoğu hedef DNA molekülünü içine alır.
- **Küçük ölçek**: Gerekli olan DNA miktarı diğer metodlardan daha düşüktür.
- Alıcı hücre için toksik etki göstermez.

Kimyasal yöntemlerle protoplastlara gen aktarımı

Electrofusion between mesophyll (*M. sativa*) and callus (*M. coerulea*) protoplasts.

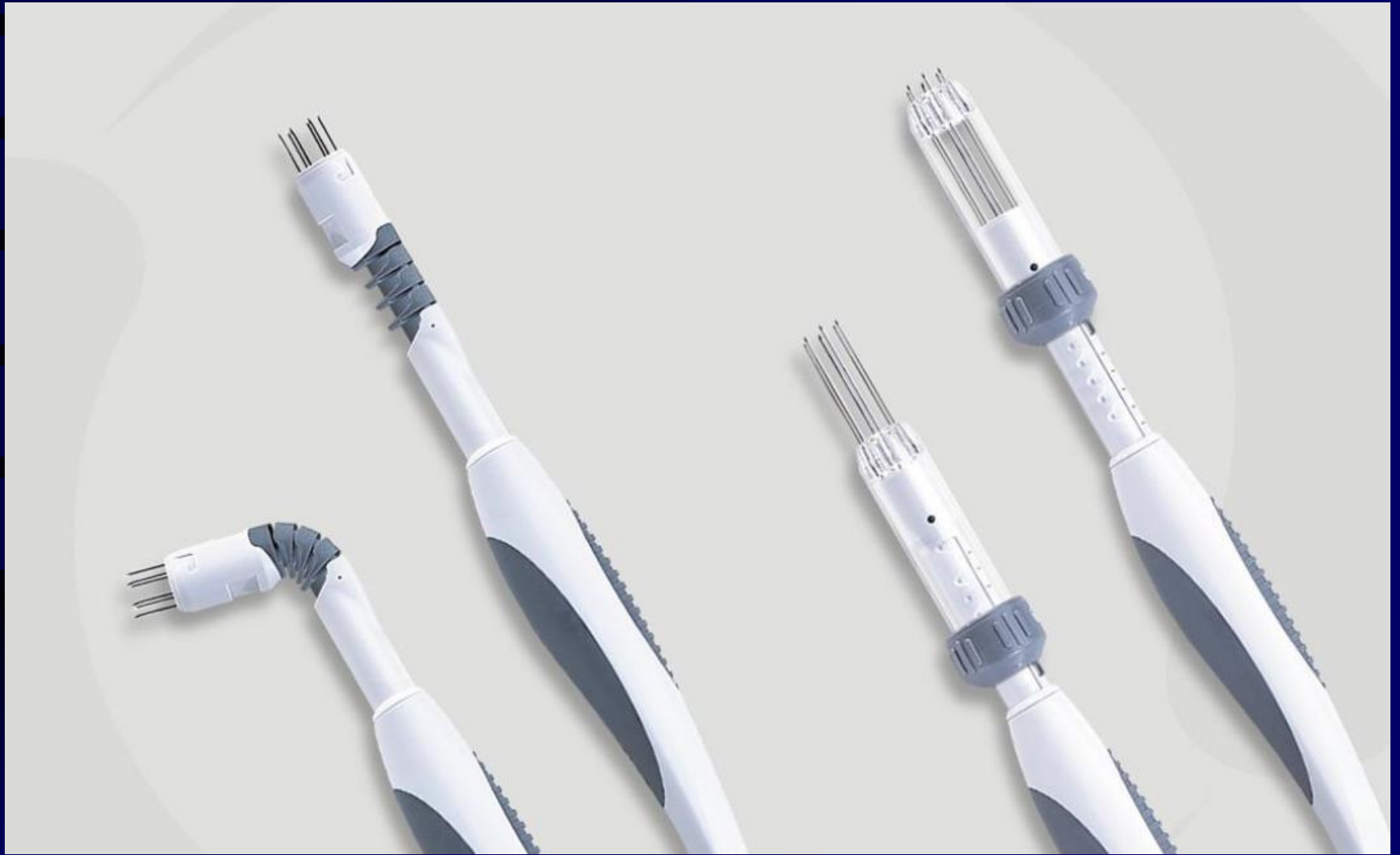


Elektroporasyonun dezavantajları

- Hücre zararı: Eger akımlar yanlış uzunlukta ve siddette ise bazı porlar çok büyüyebilir ya da zar desarjından sonra açık kalabilir ve hücre zararına yol açabilir.
- Belirgin olmayan iletim: Elektropermabilite süresince hücreye giren ve çıkan maddenin iletimi dengeli değildir. Bu da iyon dengesizliğine yol açabilir ve hücre fonksiyonunda bozukluklara ve hücre ölümüne yol açabilir.



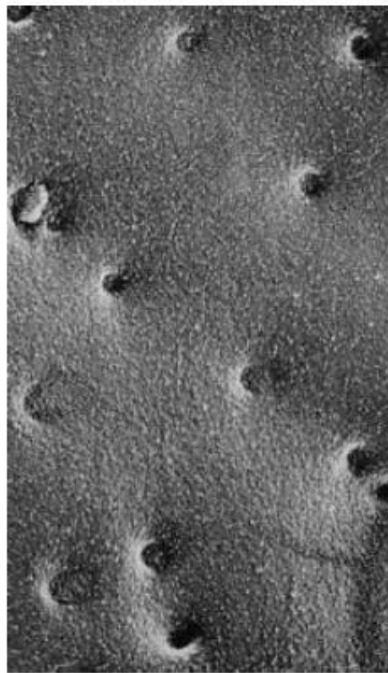




Electroporation



Cell Membrane
Before Pulse

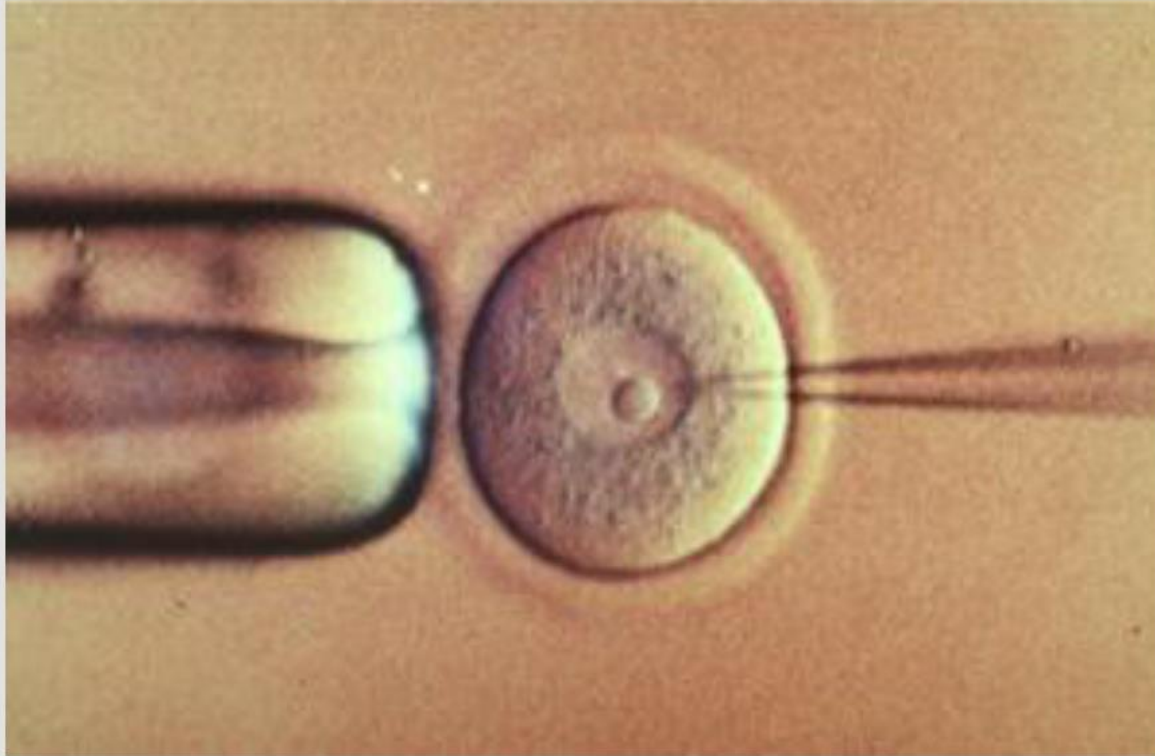


Cell Membrane
During Pulse



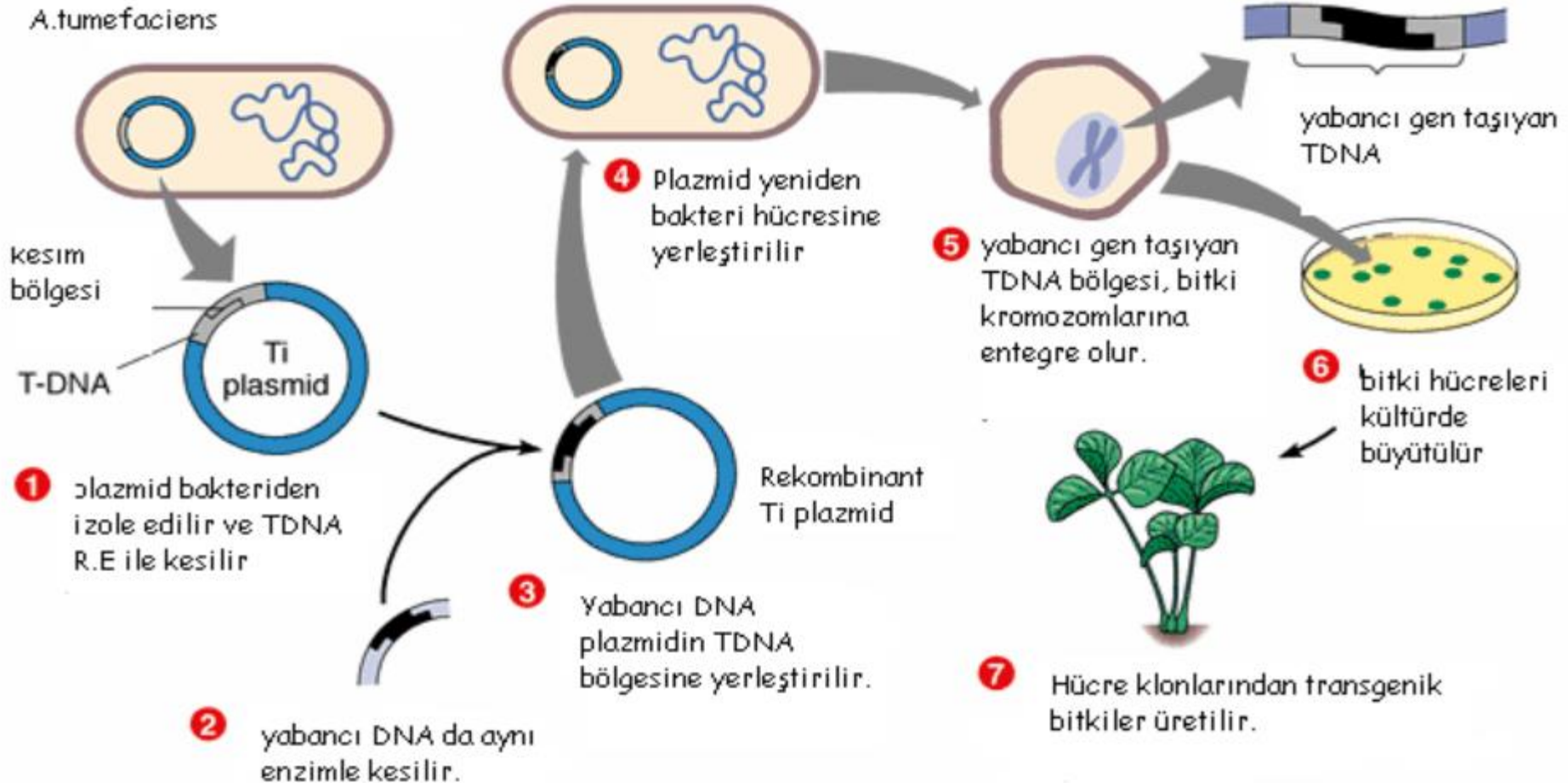
Cell Membrane
After Pulse
(Cell returns to original state)

Mikroenjeksiyonla, protoplastlara, izole edilmiş hücelere, kallus, meristemler, zigotik ve mikrospor türevli proembriyolar gibi çok hücreli dokulara DNA aktarımı yapılabilir.



Dolaylı gen aktarım yolları

Agrobacterium tumefaciens ve Agrobacterium rhizogenes



***A. Tumefaciens* enfeksiyonuyla
meydana gelen ta tümör oluşumu**

**Bitki hücresine tutunmuŐ *A.
tumefaciens* hücreleri**

