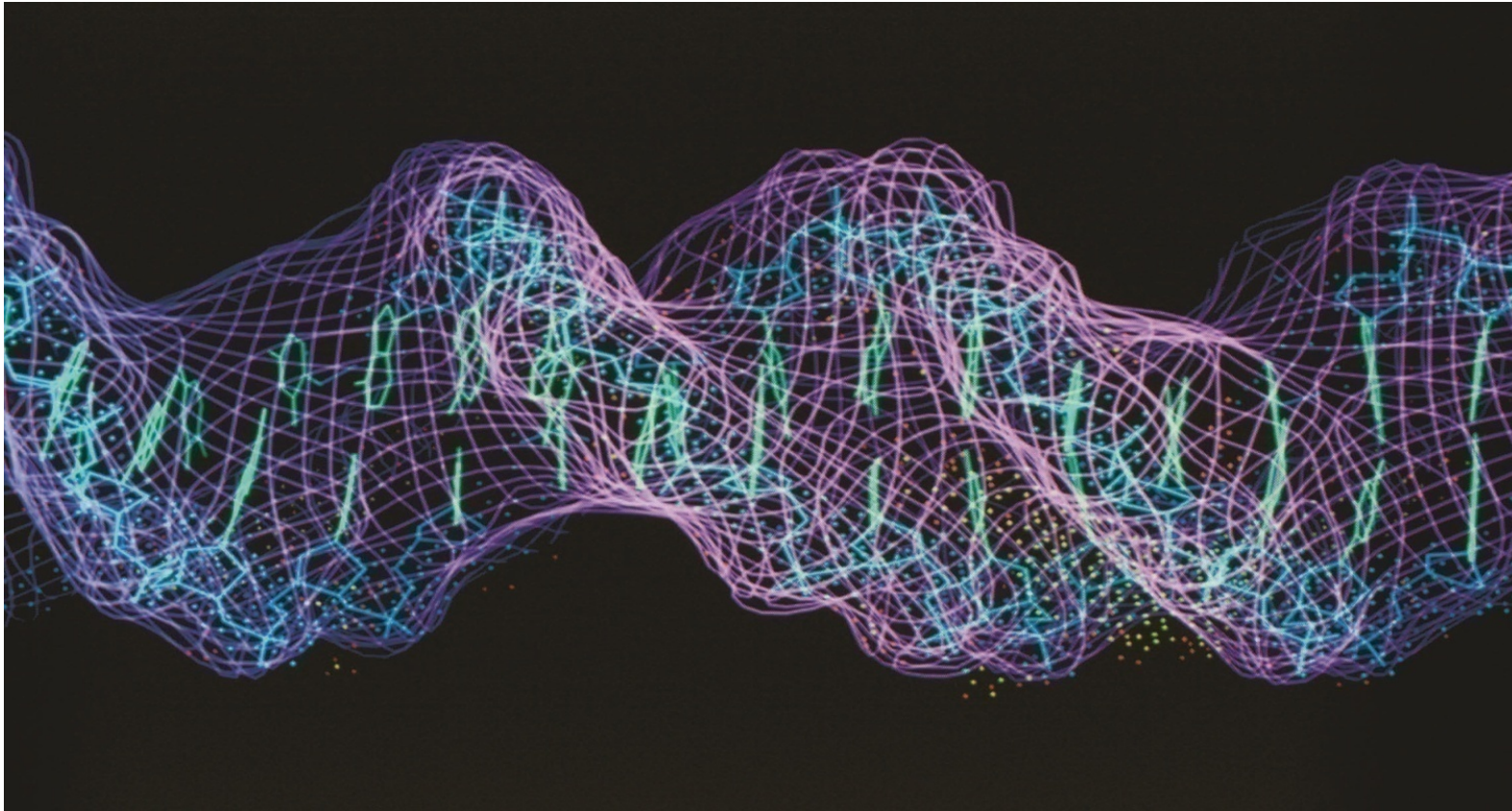


DNA YAPISI ve ANALİZİ



Bölüm kavramları

- Bazı virüslerin dışında, yeryüzündeki bütün organizmaların genetik materyali DNA'dır.
- Watson-Crick modeline göre, DNA sağ-el ikili sarmalı biçiminde bulunur.
- İkili sarmalın zincirleri, tamamlayıcı (komplementer, eşlenik) azotlu baz çiftleri arasındaki hidrojen bağları ile birbirine tutunur.

Bölüm kavramları

- Genetik bilginin depolanmasını ve ifade edilmesinin temelini sağlayan olgu DNA'nın yapısıdır.
- RNA'nın DNA ile çok fazla benzerliği bulunur, ancak RNA tek zincir halindedir.
- Bazı virüslerin genetik materyali RNA'dır.

Genetik bilgi

- Mantıksal olarak düşünöldüğünde, genlerde, bir sonraki kuşağa aktarıldığında soyun biçimini ve özelliklerini etkileyen bir çeşit bilgi bulunmalıdır.
- Buna genetik bilgi denir.

DNA canlılarda genetiğin temelini nasıl oluşturur ?

- 1944'e kadar, kromozomlardaki hangi kimyasal bileşenin genleri ve genetik materyali oluşturduğu açık değildi.
- Kromozomların nükleik asit ve protein bileşenlerine sahip olduğu bilindiğinden, her ikisi de genetik materyal olabilir.
- 1944'de DNA'nın kalıtıma ait bilgiyi nükleik asidin taşıdığı, deneysel olarak kanıtlanmıştır.

DNA canlılarda genetiğin temelini nasıl oluşturur ?

- James Watson ve Francis Crick'in DNA molekülünün işlevinin daha kolay anlaşılması için, önce yapısının aydınlatılması gerektiği öngörüsünün doğruluğu ortaya çıkmıştır.
- Bu bölümde, önce DNA'nın genetik materyal olduğuna dair bulgular gözden geçirilecek ve sonra yapısının aydınlatılması tartışılacaktır.

Genetik materyal dört özelliğe sahiptir

- Bir molekülün genetik materyal olarak davranması için dört özelliği bulunmalıdır:
 - Kendini eşleme (replikasyon)
 - Bilgi depolama
 - Bu bilgiyi ifade etme
 - Mutasyonla çeşitlenme (varyasyon)

Replikasyon

- Genetik materyalin replikasyonu, bütün canlı organizmaların temel bir özelliğidir ve hücre döngüsünde yer alır.
- Genetik materyal replike olduktan sonra yavru hücrelere eşit olarak dağılır ve her bir hücreye, orijinal genetik materyal miktarının yarısına sahip olacak şekilde paylaştırma yapılır.
- Mitoz ve mayozun ürünleri farklı olmasına rağmen, her iki işlem de, hücreSEL üreme (reprodüksiyon) adı altında toplanır.

Bilgi depolama

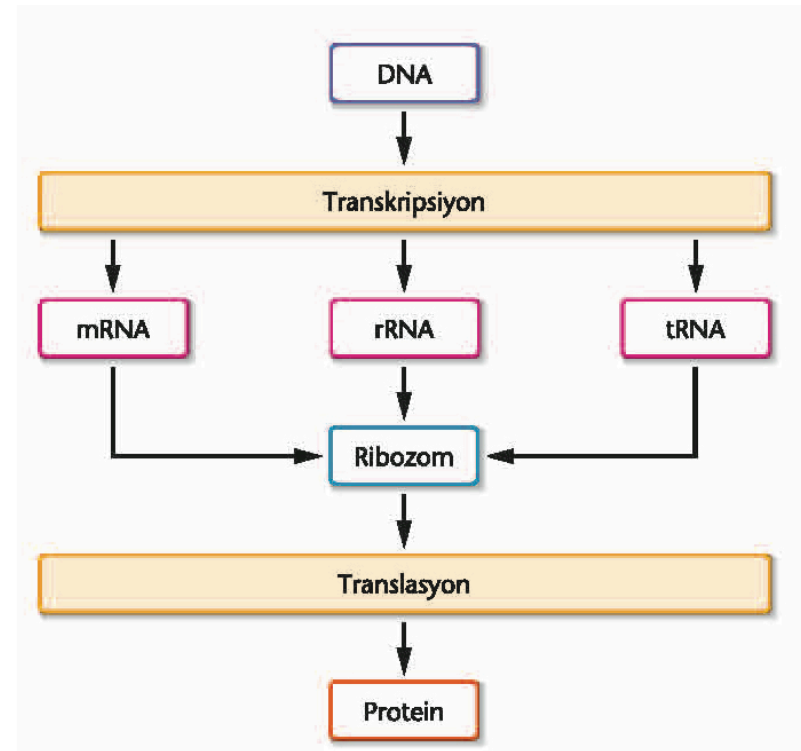
- Tüm kalıtsal özellikler genetik bilgi içerisinde depolanır.
- Hücrelerin çoğu DNA'nın tamamına sahip olduğu halde, belirli bir noktada bu genetik potansiyelin bir bölümünü ifade ederler.
- Örneğin, bakteriler belirli çevre koşulları karşısında birçok geni faaliyete geçirir, durum değişince bu genleri kapatır.

Bilgi depolama

- Genetik materyalin kimyasal dili, bilgi depolarken, bilgiyi yavru hücrelere ve organizmalara aktarıırken bu görevi yerine getirebilecek yetenekte olmalıdır.

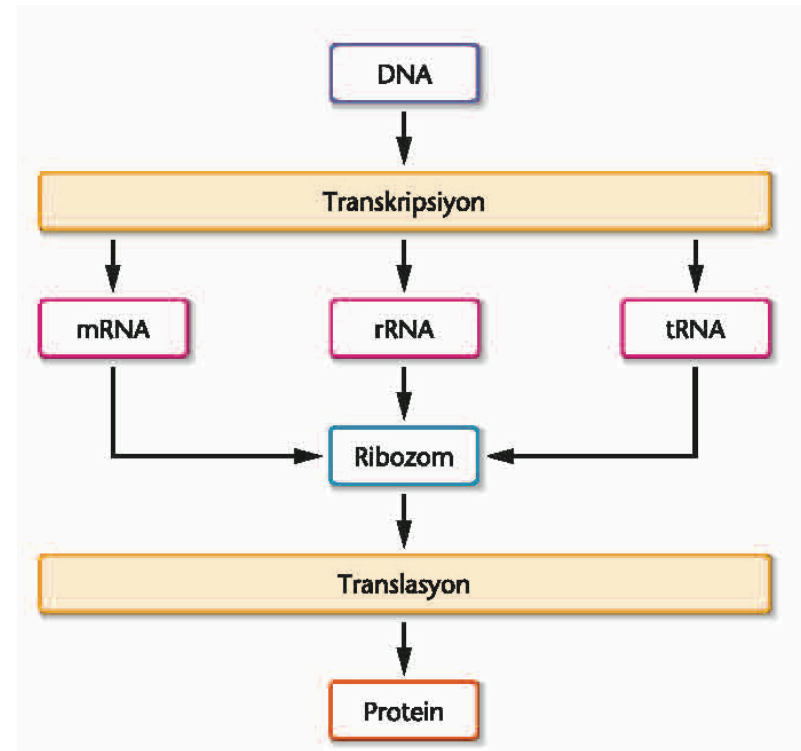
Genetik bilginin ifadesi

- Genetik bilginin ifadesi hücrede bilgi akışının temelini oluşturur.
- Her bir mRNA özgül bir genin ürünüdür ve değişik bir proteinin sentezine yol açar.



Genetik bilginin ifadesi

- Translasyon, rRNA içeren ribozomlarda, tRNA'nın da katılımıyla gerçekleşir.
- tRNA, mRNA'daki kimyasal bilgiyi, proteinleri oluşturan amino asitlere çevirerek adaptör rolü oynar.
- Bu işlemler, moleküler genetiğin santral dogmasını oluşturur.



Genetik materyalin mutasyonla çeşitlenmesi (varyasyon)

- Mutasyonlar organizmalar arasında ortaya çıkan yeni çeşitliliğin de kaynağıdır.
- Mutasyonla meydana gelen değişiklik, transkripsiyon ve translasyona yansır ve ilgili proteini etkiler.

Genetik materyalin mutasyonla çeşitlenmesi (varyasyon)

- Mutasyon eşey hücrelerinde olursa, gelecek kuşaklara aktarılır ve zamanla populasyon içerisinde yayılır.
- Kromozomların içinde ve kromozomlar arasında yer alan yeniden düzenlenmeleri de kapsayan genetik çeşitlilik evrimin ham maddesidir.

Genetik materyale ilişkin gözlemler

- Genetik materyalin rolü için hem proteinler hem de nükleik asitler başlıca adaylar olduğu halde, genetikçilerin çoğu 1940'lara kadar proteinlere şans tanımıştır.
- Bu inanç, üç faktörden kaynaklanmıştır.

1. faktör

- Proteinler hücrede bol bulunmaktır.
- Protein miktarı farklı olmakla birlikte, hücrelerin kuru ağırlığının %50'sini oluşturur.
- Hücrelerde fazla miktarda ve çeşitte protein bulunduğu için bu proteinlerin bazılarının genetik materyal olarak işlev görebileceği düşünöldü.

2. faktör

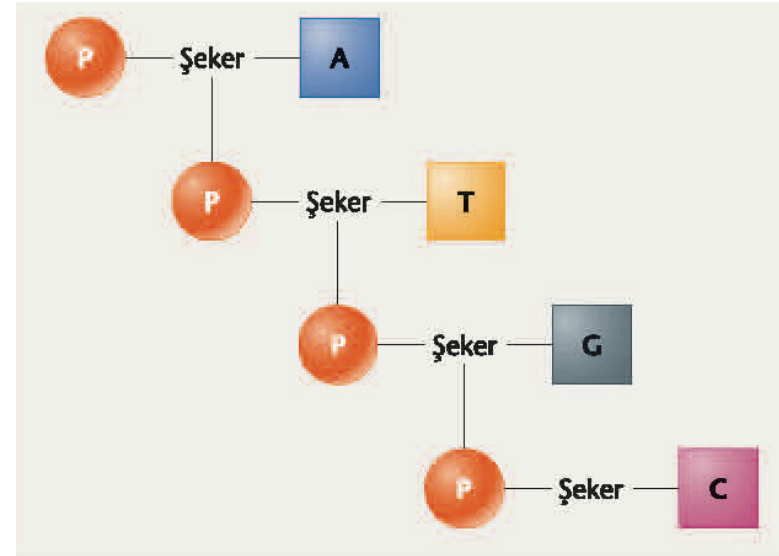
- Bu faktör, nükleik asitlerin kimyasal yapıları ile ilgili olarak kabul edilmiş olan bir öngörüdür.
- DNA ilk olarak 1868 yılında, İsviçreli kimyacı Friedrick Miescher tarafından çalışılmıştır.

2. faktör

- Miescher, hücrelerin sitoplazmasından çekirdekleri ayrıştırmayı başarmış ve bu çekirdeklerden nüklein olarak adlandırdığı, asidik bir madde elde etmiştir.
- Nüklein'in fazla miktarda fosfor içerdiğini fakat hiç kükürt içermediğini göstermiştir.
- Bu özellik nüklein'i proteinlerden ayırmaktadır.

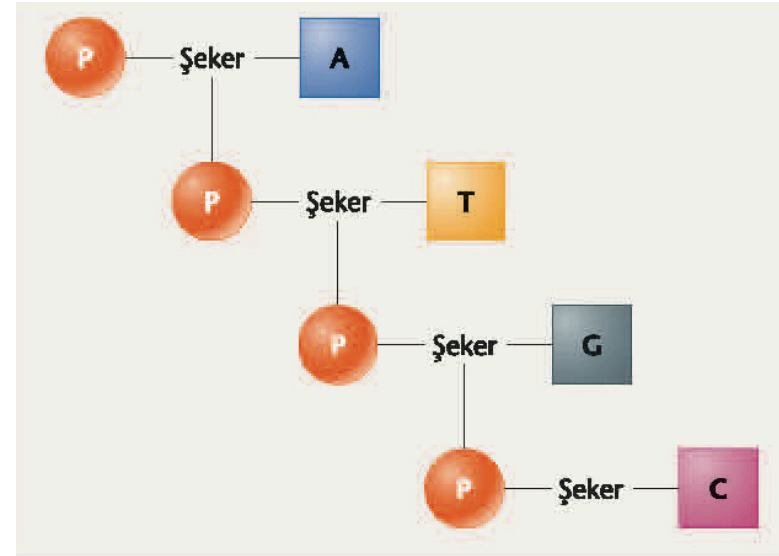
Tetranükleotid Hipotezi

- Nükleik asitlerin, nükleotidler denilen dört benzer yapı taşından oluştuğu gösterilmiştir.
- 1910'larda, Phoebus A. Levene, nükleotidlerin nükleik asitlerdeki kimyasal yerleşimini açıklamak için tetranükleotid hipotezini önermiştir.
- Basit dört nükleotid birimi, DNA'da devamlı tekrarlanmaktadır.
- Dört nükleotidin oranının 1:1:1:1 olduğu varsayılmıştır.



Tetranükleotid Hipotezi

- Tek kovalent bağla bağlı tetranükleotid yapısı oldukça basittir.
- Bu nedenle genetikçiler, genetik materyalden beklenen büyük miktarda kimyasal farklılığı bu yapının sağlayamayacağı görüşündeydi.
- Genetik materyale ait spekülasyonlarda proteinler ağırlık kazanmış ve nükleik asitler geri planda kalmıştır.



3. faktör

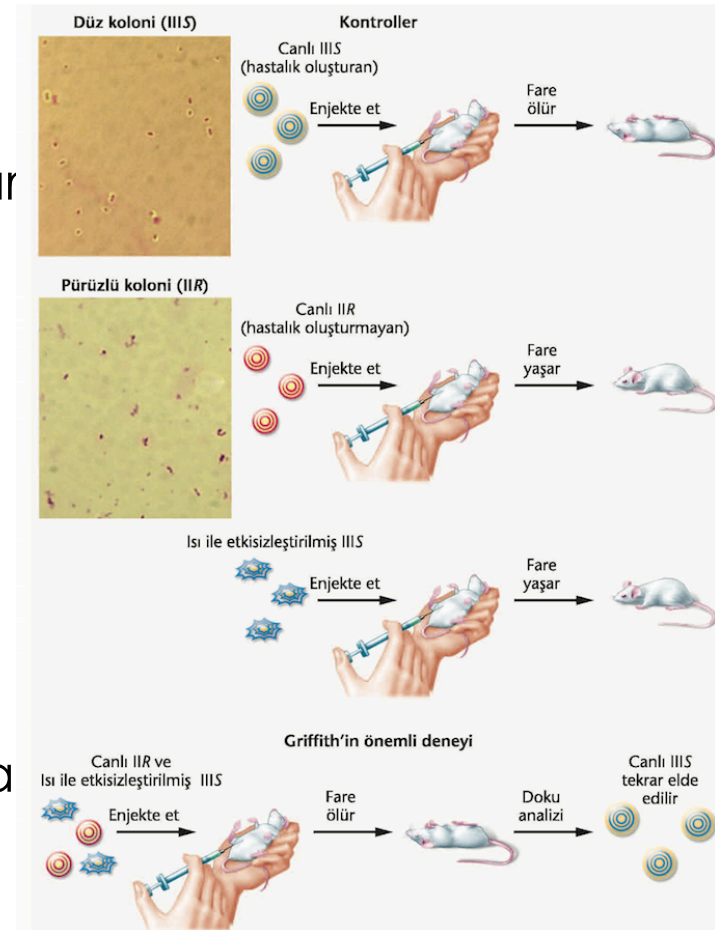
- Üçüncü faktör, genetiğin en aktif araştırma alanları ile ilgilidir.
- Bu alanda elde edilen bulgulara göre proteinler, genetik materyal olarak pasif bir biçimde kabul görmüştür.
- Ancak 1940'lardan sonra Chargaff, birçok organizma için 1:1:1:1 oranının doğru olmadığını göstererek Levene'in hipotezini çürütmüştür.

Transformasyon ile ilgili ilk alışmalar

- Frederick, *Diplococcus pneumoniae*'nin değişik birçok suşunu kullanarak deneyler yapmıştır.
- Bunların bir kısmı, bazı omurgalılarda (zellikle insan, sıçan) zatürre'ye neden olan virölant (hastalık oluşturan) suşlardı, bir kısmı da avirölant (hastalık oluşturmayan) suşlardı.
- Virölans, bakterilerin sahip oldukları polisakkarit kapsül yapıları ile ilgilidir.
- Virölant suşlarda kapsül bulunurken, avirölant suşlar kapsülsüzdür.

Griffith'in transformasyon deneyi

- Kapsüllü veya kapsülsüz olma durumu, virülant ve avirülant suşlar arasında temel bir fark daha yaratır.
- Şekilde görüldüğü gibi, agarlı kültür kabında üretildiğinde kapsüllü bakteri parlak-düz koloniler, kapsülsüz bakteri suşları ise pürüzlü koloniler oluşturur.
- Bu durum sayesinde, standart mikrobiyolojik kültür teknikleri ile virülant ve avirülant suşlar kolayca tanımlanabilir.



Serotipler

- *Diplococcus'un* her bir suşu, serotipler olarak adlandırılan düzinelerce değişik tipten biri olabilir.
- Serotipin özelliği, kalın ve yapışkan kapsülün polisakkarit içeriğinden kaynaklanır.
- Serotipler immünolojik tekniklerle tanımlanır ve çoğunlukla Romen rakamları ile gösterilir.

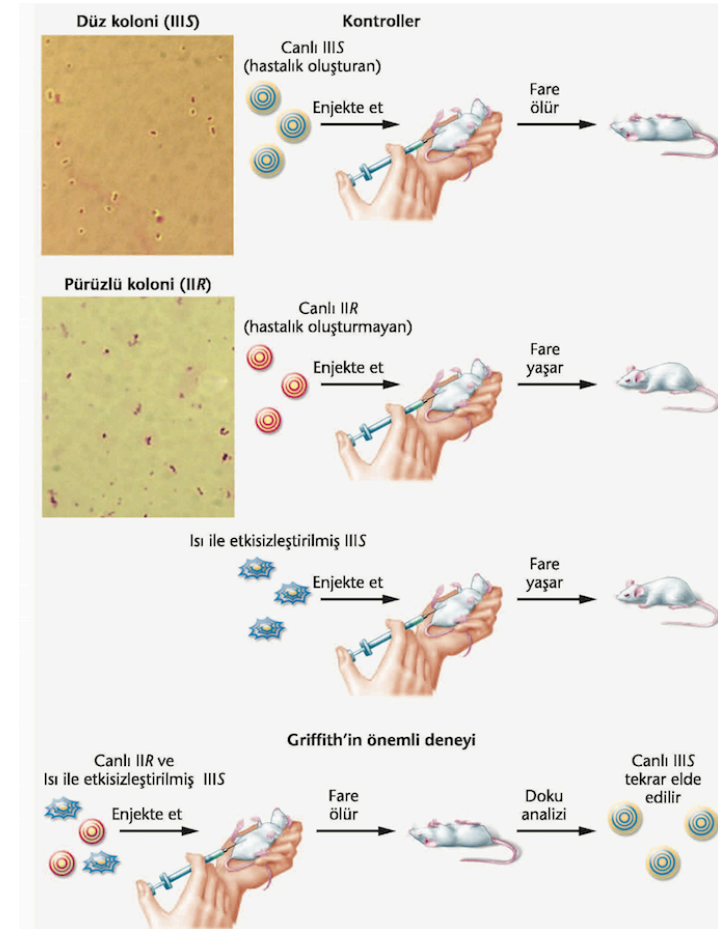
Serotipler

- Tip I ve II, Amerika'da zatürreye neden olan en yaygın tiplerdir.
- Griffith, genetik materyalle ilgili yeni kavramlara yol açan deneylerinde tip II ve III'ü kullanmıştır.
- Griffith'in iki suşunun özellikleri aşağıda verilmiştir.

Serotip	Koloni		
	Morfolojisi	Kapsül	Virülans
IIR	Pürüzlü	Yok	Hastalık yapmaz (avirülant)
IIIS	Düz	Var	Hastalık yapar (virülant)

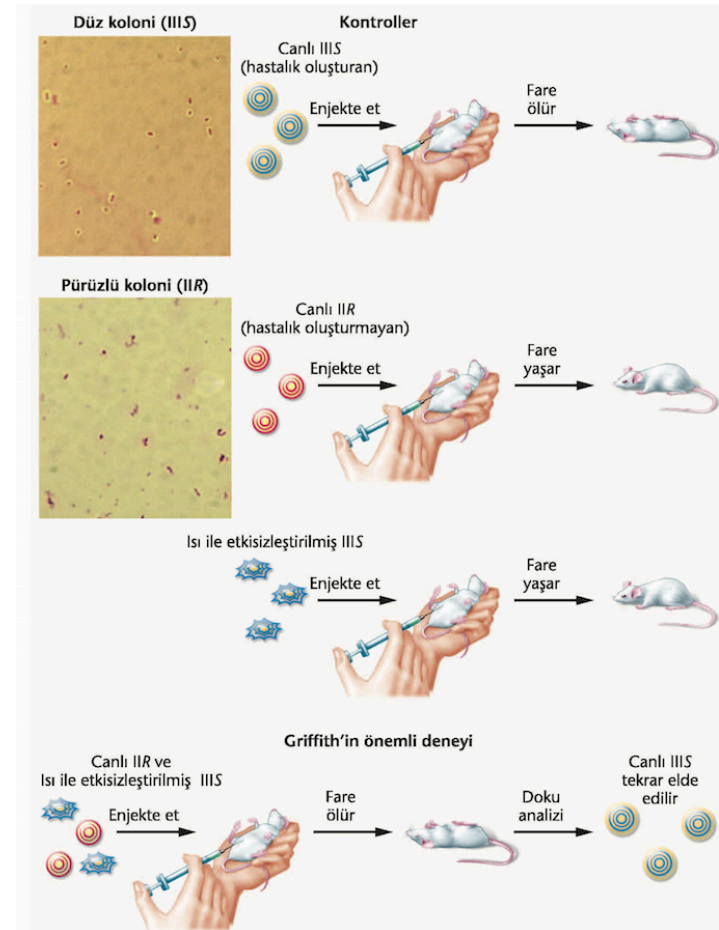
Griffith deneyinin ayrıntıları

- Griffith, yalnız canlı virülant hücrelerin sıçanda zatürre oluşturabileceğini yapılan diğer çalışmalardan biliyordu.
- Isıyla etkisiz hale getirilen virülant bakteriler sıçana enjekte edildiğinde zatürre oluşturmuyordu.
- Griffith, bu kritik deneyinde canlı IIR (avirülant) hücrelerle, ısı ile etkisiz hale getirilen IIS (virülant) hücreleri karıştırarak sıçana enjekte etti.



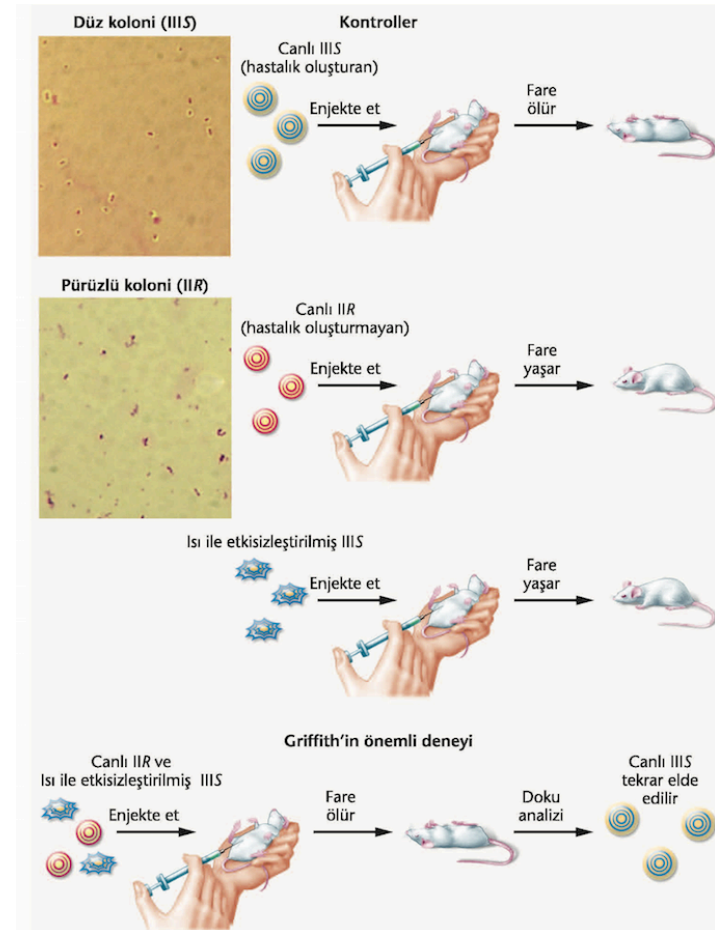
Griffith deneyinin ayrıntıları

- İki hücre tipi, tek başına verildiğinde sıçanı öldürmediğine göre, Griffith her iki hücrenin birlikte verilmesinin (çiftli enjeksiyonun) sıçanı öldürmesini beklemiyordu.
- Ancak, beş gün sonra, çift enjeksiyon yapılan bütün sıçanlar öldü.



Griffith deneyinin ayrıntıları

- Ölü sıçanların kan analizleri, fazla miktarda canlı IIS tipi (virülant) bakterilerin bulunduğunu göstermiştir.
- Ölen sıçanların kanında bulunan IIS bakteriler, polisakkarit kapsül açısından, ısı ile öldürülmüş hücrelerden elde edilen IIS suşuna benziyordu.
- Canlı avirülant IIR bakterilerin enjekte edildiği kontrol sıçanlar sağlıklıydı ve zatürre olmamıştı.



Griffith'in bulguları

- Griffith, ısı ile öldürölmüş IIS bakterilerinin bir biçimde, canlı avirölant IIR hücrelerinin virölant IIS'lere dönüşümünden sorumlu olduğu sonucuna ulaştı.

Griffith'in transformasyon prensibi

- Griffith bu olayı transformasyon olarak adlandırdı.
- Her ne kadar kapsül tek başına zatürreye neden olmuyorsa da;
- Transformasyonu gerçekleştiren ana maddenin polisakkarit kapsülün bir kısmı ya da kapsül sentezinde rol alan bir bileşik olabileceğini önerdi (transformasyon prensibi).

Hangi molekül ?

- Hangi molekülün transformasyonda görev aldığı şüphesiz kritik bir soruydu ?

Peki bu sonuca nasıl varıldı !!!

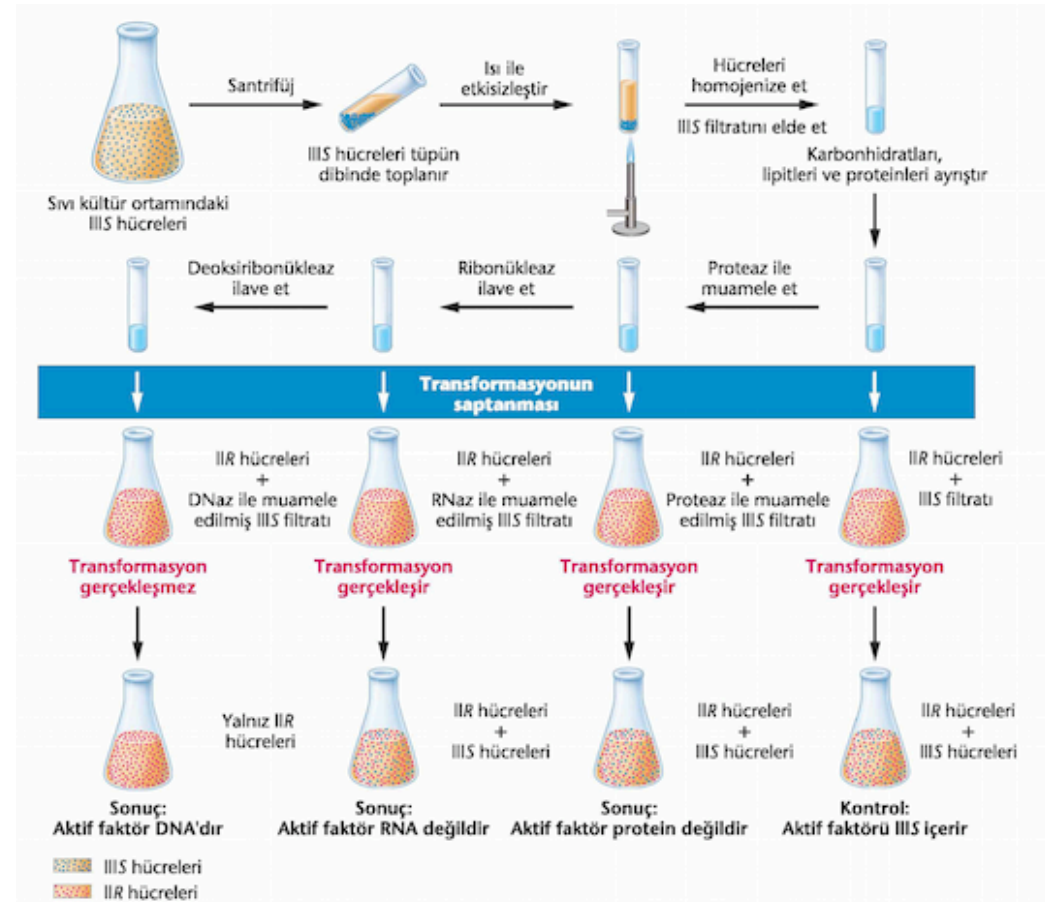
- Avery, MacLeod ve McCarty adlı araştırmacılar, transformasyon yapan maddeyi saf olarak elde ettiklerini ve transformasyondan sorumlu molekülün şüphesiz bir biçimde DNA olduğunu bildirdiler.
- Peki bu sonuca nasıl vardılar ?

İzolasyon (ayrıştırma) deneyi

- Avery, MacLeod ve McCarty , III S tipi virölant hücrelerin büyük ölçekteki (50-75 litre) sıvı kültürlerini başlattılar.
- Hücreler santrifüj edildi, toplandı ve ısıyla öldürüldü.

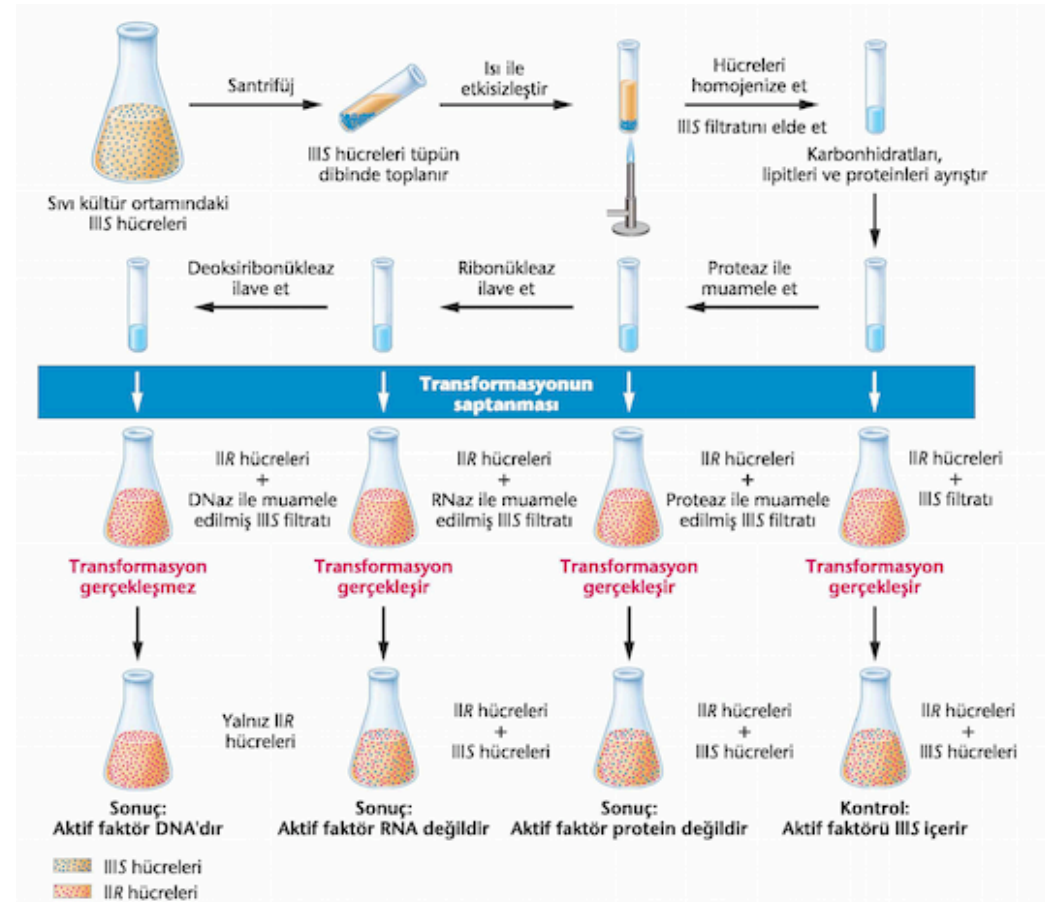
İzolasyon (ayırıştırma) deneyi

- Homojenizasyondan ve deoksi-kolat deterjanı (DOC) ile birkaç özütlemeye işleminden sonra, transformasyon potansiyeline sahip olduğu düşünülen çözünür süzüntüyü elde ettiler.
- Birkaç kloroform özütlemesi ile protein bu aktif özütten uzaklaştırıldı.



İzolasyon (ayırıştırma) deneyi

- Polisakkaritler enzimatik olarak parçalanıp uzaklaştırıldı.
- Son olarak, etanol çöktürmesiyle, tip IIR avirülant hücreleri transforme edebilecek ipliksi bir çökelek elde ettiler.



İzolasyon deneyi (sodyum deoksiribonükleat)

- Transformasyon kaynağının DNA olduğu açıkça kesinlik kazandı.
- İpliksi çökelekte önce, "sodyum deoksiribonükleat" oranını yansıtan azot/fosfor oranına bakıldı.
- Bu kimyasal isim daha sonra DNA'yı tanımlamak için kullanılmıştır.

Enzim muamelesi (RNase)

- Sonucun güvenilir olması açısından ürün; tripsin, kimotripsin ve ardından ribonükleaz (RNase) ile muamele edildi.
- Böylelikle muhtemel protein ve RNA kalıntıları ortamdan uzaklaştırılmış oldu.
- Ancak, transformasyon aktivitesi hala vardı.

Enzim muamelesi (DNase)

- Deoksiribonükleaz'ın (DNase) kullanılması ile ürünün transformasyon aktivitesini kaybettiği gösterildi.
- Artık, aktif ve transformasyondan sorumlu olan maddenin DNA olduğuna karar verildi.

Deneysel dayanak ?

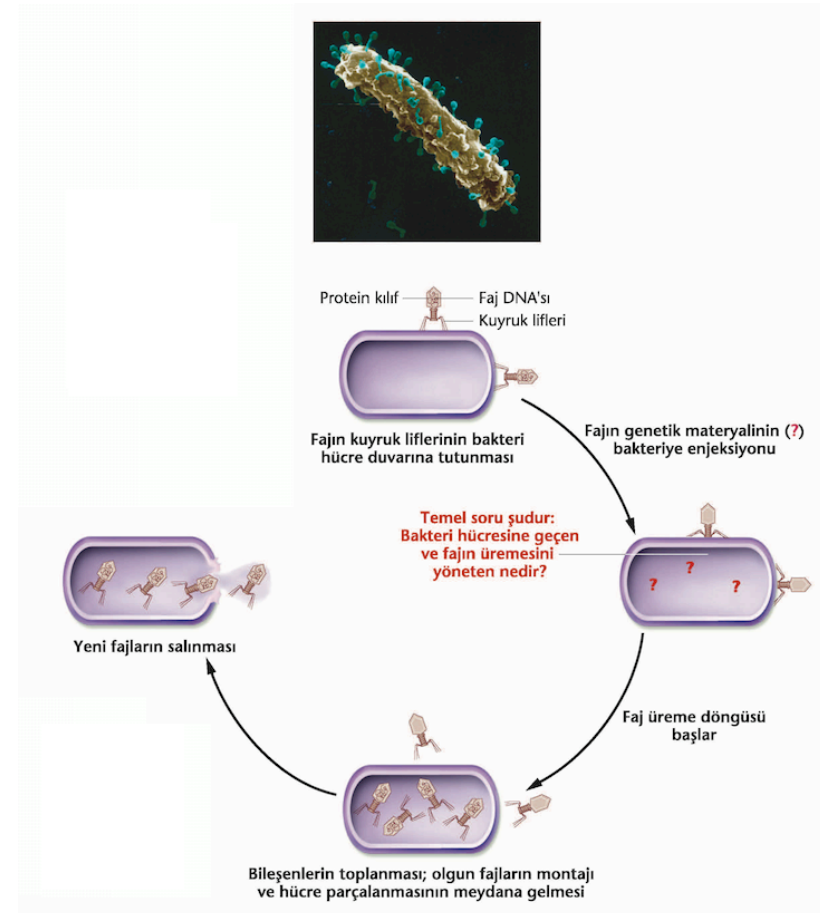
- Transformasyon maddesinin RNA ya da protein değil de DNA olduğu sonucuna varılmasının deneysel dayanağı nedir ?

Hershey-Chase deneyi

- DNA'nın genetik materyal olduğunu destekleyen ikinci önemli bulgudur.
- Bu bulgu, *Escherichia coli* bakterisinin, konakçısı olan T2 bakteriyofaj ile enfeksiyonu çalışmalarından elde edilmiştir

Litik döngü

- Kısa sürede birçok yeni faj ortaya çıkar ve bakteri hücresi parçalanarak (lisis) yeni oluşan virüsler ortama salınır.
- Bu işleme litik döngü denir.



Deneyysel veriler

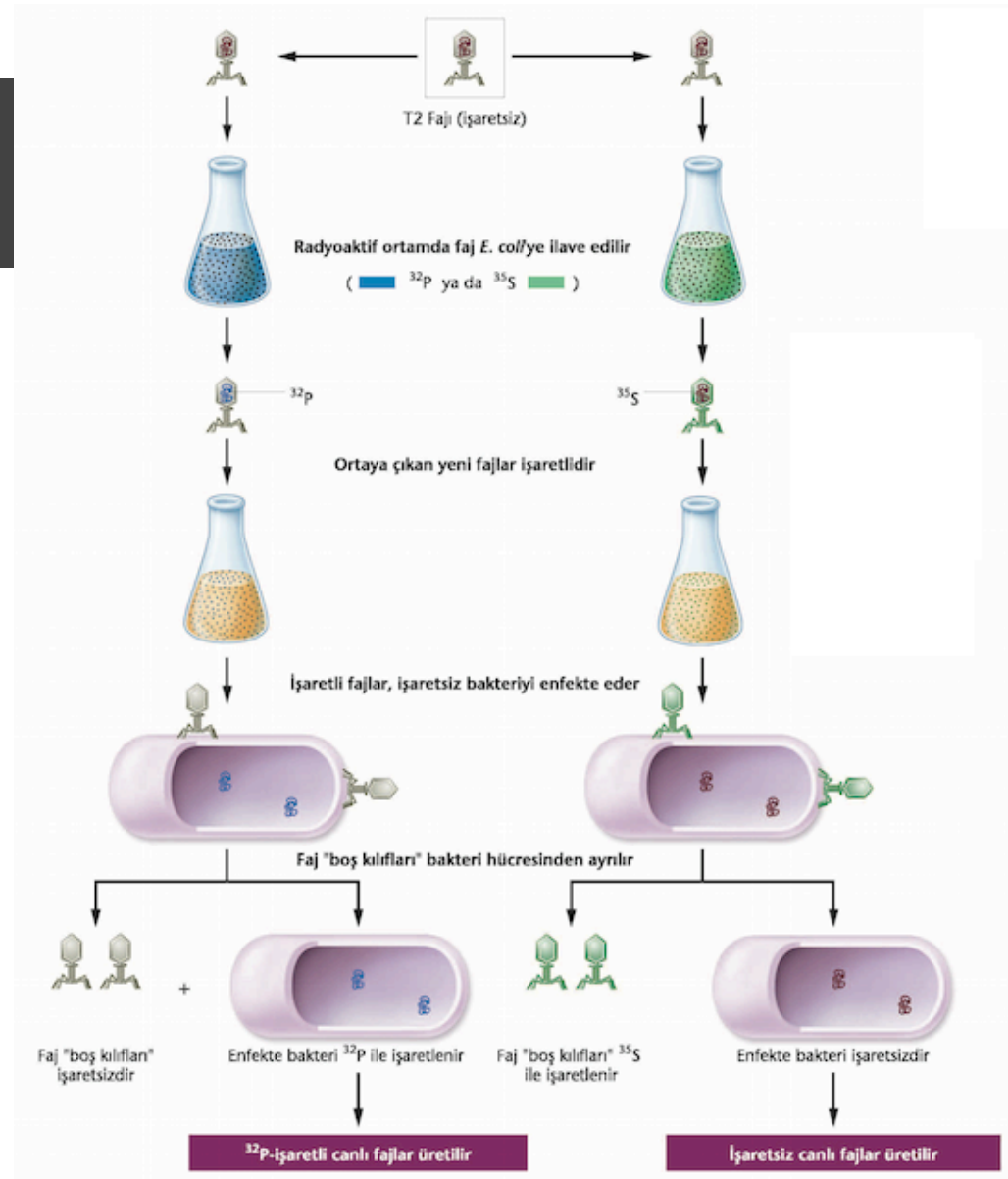
- 1952'de Aifred Hershey ve Martha Chase, faj üremesini aydınlatmak için bir deney gerçekleştirmişlerdir.
- Deneyde, faj proteini ve nükleik asidinin üreme işleminde birbirlerinden bağımsız işlevleri olduğunu açıkça ortaya koymuştur.
- Hershey ve Chase řu verilere sahipti:

DeneySEL veriler

- T2 fajları yaklaşık %50 protein ve %50 DNA içermektedir.
- Enfeksiyon, fajın kuyruk liflerinin bakteri hücre sine yapışması ile başlamaktadır.
- Yeni virüsler, bakteri hücre sinin içinde görölmektedir.

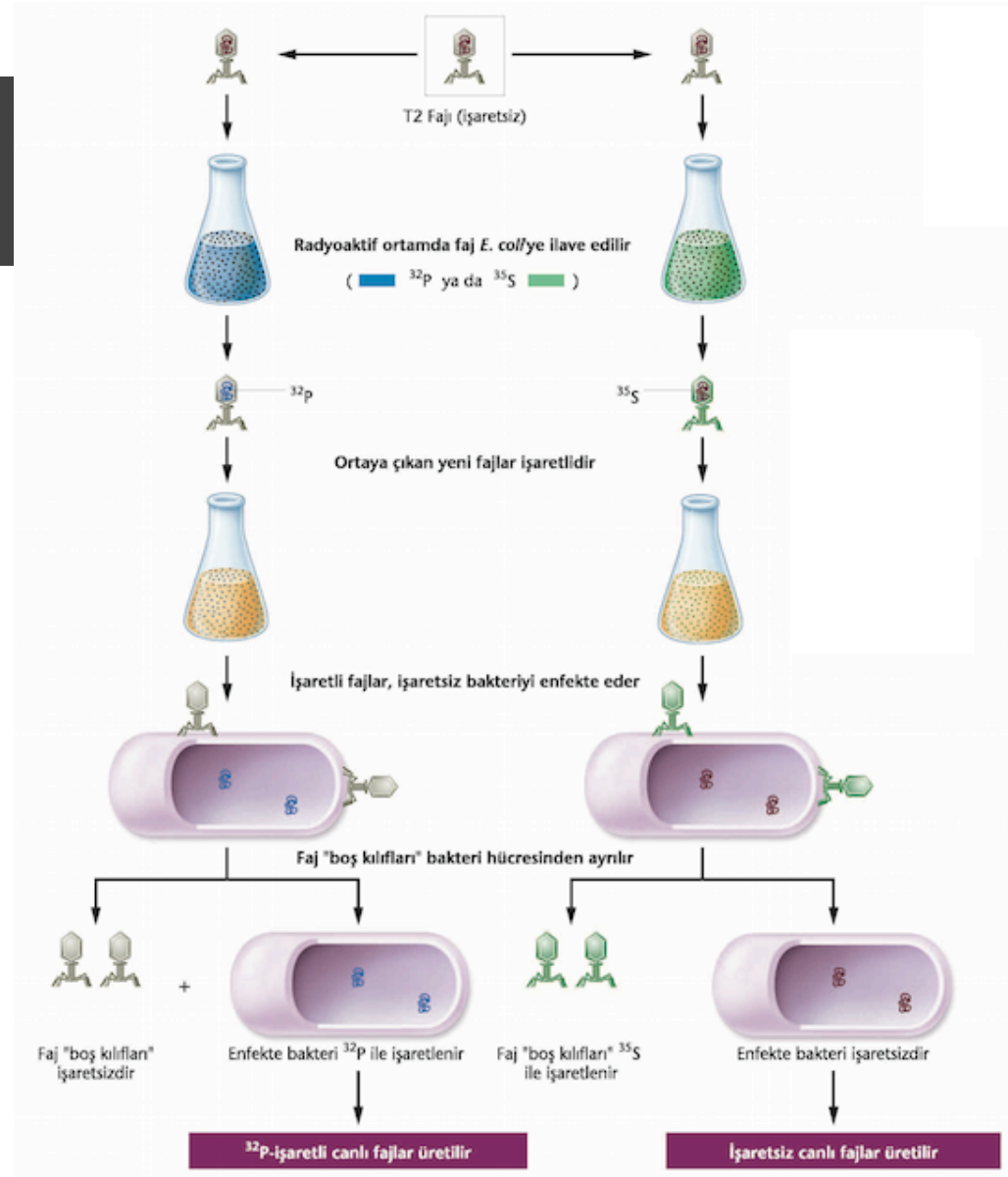
^{32}P ve ^{35}S

- Hershey ve Chase, enfeksiyon sırasında fajın moleküler bileşenlerini izlemek için radyoaktif izotop olarak ^{32}P ve ^{35}S 'i kullanmışlardır.
- Yeni oluşan fajlarda ^{32}P bulunmuş, ^{35}S ise bulunamamıştır.



Sonuçları yorumlayalım

- Fajın protein kılıfı konakçı hücrenin dışında kalmakta ve yeni fajların oluşumunu yönlendirememekte dir.
- Bunun aksine, faj DNA'sı konakçı hücreye girer ve fajın üremesini yönlendirir.



Sonuçları yorumlayalım

- Hershey ve Chase bu şekilde, T2 fajında genetik materyalin protein değil, DNA olduğunu göstermişlerdir.

Protoplastlar (sferoplastlar)

- Enzim ile muamele edilen hücreler, deyim yerindeyse, çıplak kalıyordu ve dışta sınırlayıcı olarak sadece hücre zarı bulunuyordu.
- Bu yapılara protoplastlar (ya da sferoplastlar) adı verilmektedir.

Protoplastlar (sferoplastlar)

- Hücre duvarı yokken, virüsün enfeksiyonu başlatması için yapısal bütünlüğe gereksinim duyulmamaktadır.
- Virüsün dış protein kılıfı, sağlam hücre duvarından DNA'nın hücreye girişi için gereklidir.
- Fakat sferoplastlar kullanıldığında enfeksiyon için bu kılıf önemsizdir.

Transfenksiyon deneyi

- George Guthrie ve Robert Sinsheimer, 1960'da yaptığı deneylerde ØX174 bakteriyofajından DNA saflaştırdılar.
- Küçük bir faj olan ØX174'ün, 5386 nükleotit içeren tek iplikli halkasal DNA'sı vardır.
- Saflaştırılan faj DNA'sı *E. coli* protoplastlarına ilave edildiğinde, tam bir yapısal bütünlüğe sahip olan ØX174 bakteriyofajları elde edilmiştir.

Transfenksiyon deneyi

- Bu deneyle, olgun virüs üretimi için ØX174 DNA'sının tek başına bütün gerekli bilgiyi taşıdığı kesin olarak gösterilmiştir.
- Sadece viral nükleik asit kullanılarak başlatılan bu enfeksiyon işlemine transfenksiyon denir.
- Bu verilerle DNA'nın genetik materyal olduğu sonucu böylece daha da güçlenmiştir.

Ökaryotlarda DNA

- Yapılan alışmalarda DNA'nın ökaryotlarda genetik materyal olduğu kavramı, doğrudan ve dolaylı kanıtlarla desteklemektedir.
 - Dolaylı kanıt: DNA'nın dağılımı
 - Dolaylı kanıt: Mutasyon oluşturma (mutagenез)
 - Doğrudan kanıt: Rekombinant DNA alışmaları

DNA'nın dağılımı

- Genetik materyal, işlev gördüğü yerde, yani çekirdekte, kromozomun bir parçası olarak bulunmalıdır.
- Bu kritere hem DNA hem de protein uymaktadır.
- Ancak, protein sitoplazmada da yüksek oranda bulunurken, DNA bulunmamaktadır.

DNA'nın dağılımı

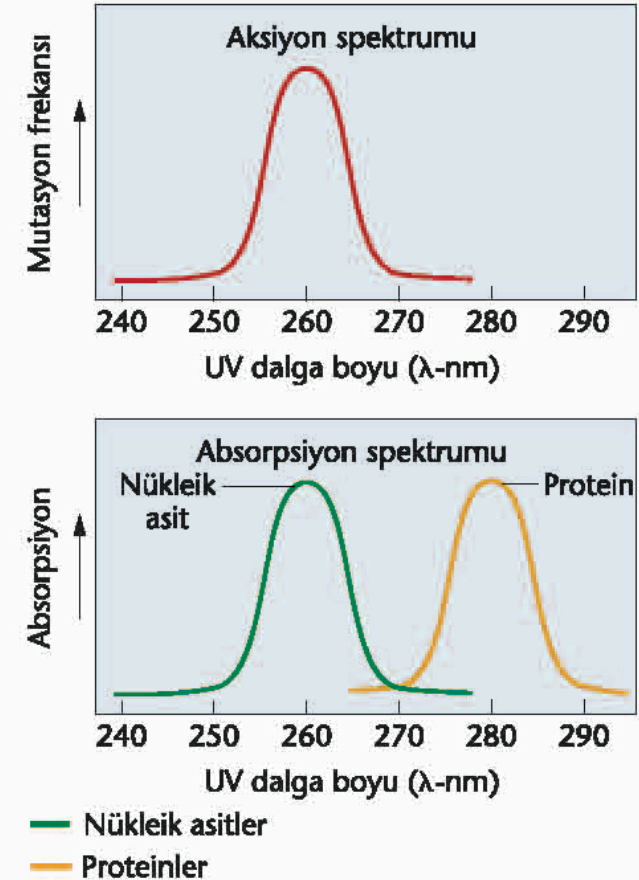
- DNA, sadece genetik işlev gösteren yerlerde bulunur.
- Proteinlere ise hücrede her yerde rastlanır.
- Bu gözlemlere göre, genetik materyal proteinden ziyade DNA'dır.

DNA'nın dağılımı

- DNA miktarı ile kromozom takımının sayısı arasında yakın bir bağlantı vardır.
- Proteinler için, eşey hücrelerinde ve diploid hücrelerde böyle bir tutarlı bağlantı gözlenmez.
- Böylece, bu bulgular, ökaryotlarda proteinlerin değil DNA'nın genetik materyal olduğunu daha da ayrıntılı olarak kanıtlamaktadır.

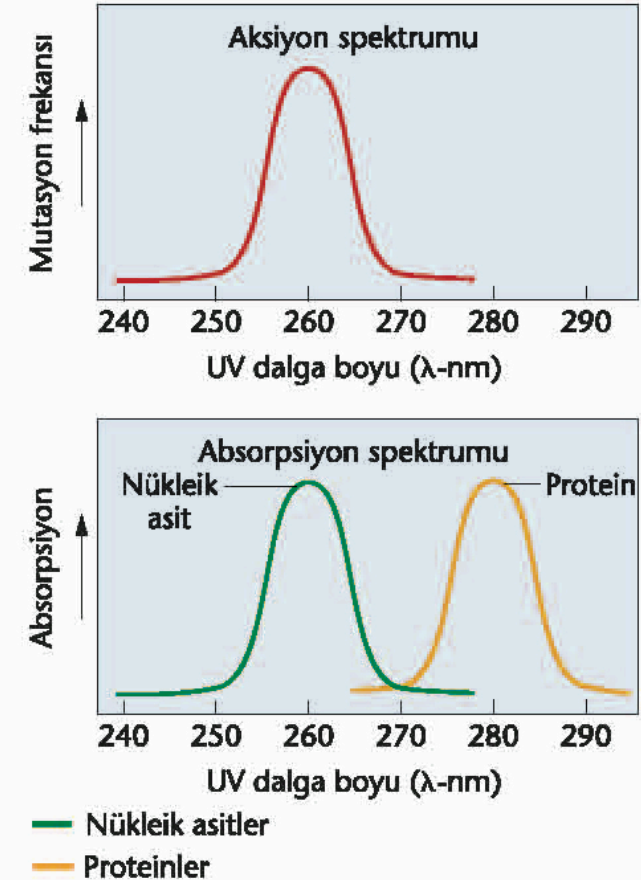
Mutasyon oluşturma (Mutagenез)

- Mor ötesi ışık (UV), genetik materyalde mutasyonları uyaran çeşitli etkenlerden biridir.
- Her bir dalga boyunun etkinliği, meydana gelen mutasyon sayısı ile ölçölür.
- Mutasyon sıklığına karşı dalga boyu grafiğe aktarıldığında, UV ışınının mutajenik ajan olarak aksiyon spektrumu elde edilir.



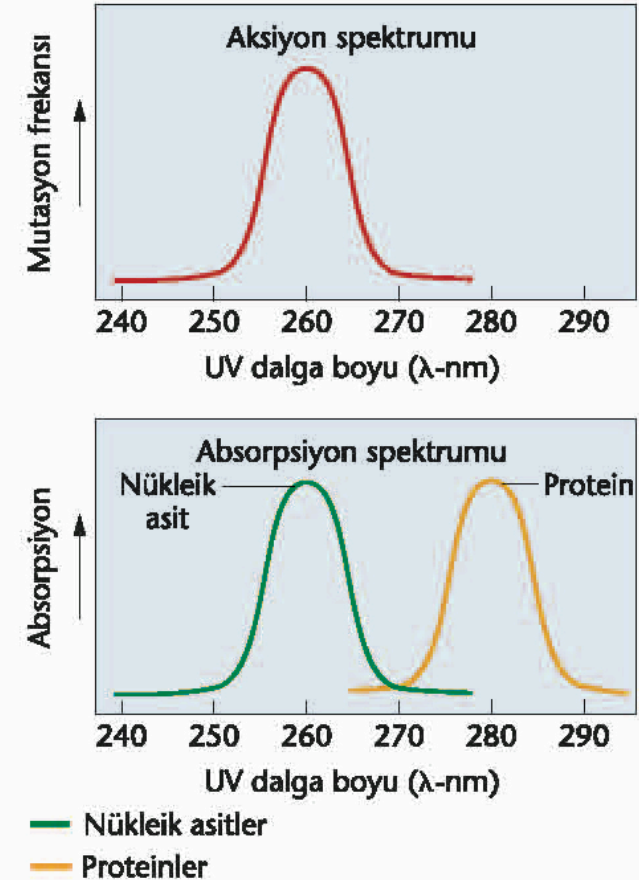
Mutasyon oluşturma (Mutagenез)

- Bu aksiyon spektrumu, genetik materyal olduğundan şüphelenilen molekülün absorpsiyon (emilim) spektrumu ile karşılaştırılır.



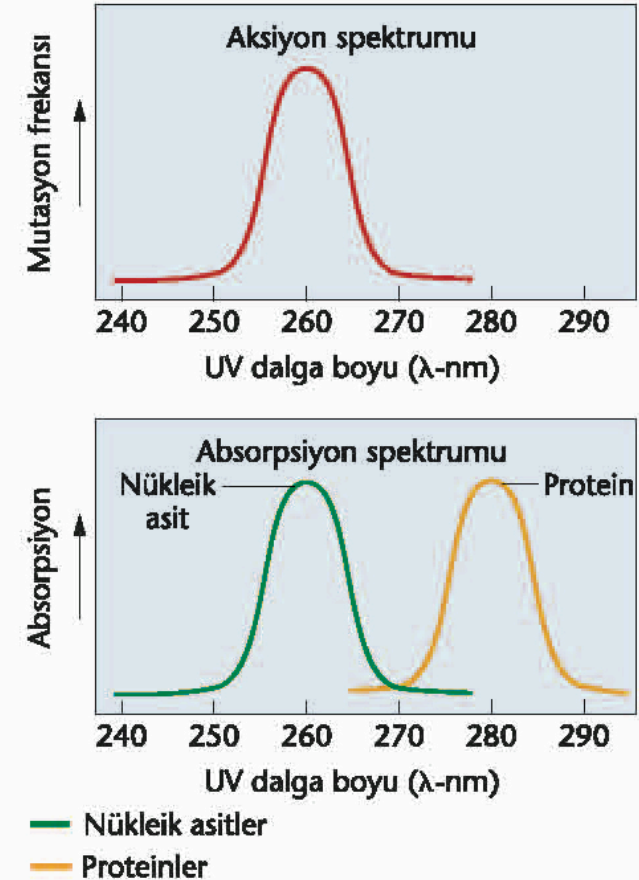
Mutasyon oluşturma (Mutagenез)

- UV ışığının en mutajenik olduğu dalga boyu (λ) 260nm'dir (nanometre).
- Hem DNA hem de RNA, UV ışığı bu dalga boyunda emer.



Mutasyon oluşturma (Mutagenenez)

- Proteinin ise en kuvvetli absorpsiyonu 280 nm'de gösterir.
- DNA için bu dalga boyunda önemli bir mutajenik etki görülmez.
- Bu dolaylı kanıt da, genetik materyalin nükleik asit olduğunu destekler.



Rekombinant DNA alışmaları

- En gcl kanıt, moleküler analizlerin uygulandığı rekombinant DNA teknolojisinden elde edilmiştir.
- Bu yöntemde ökaryotik organizmaların özel gen bölgelerine ait DNA segmentleri ayrıştırılarak, bakteri DNA'sı ile birleştirilmiştir.

Rekombinant DNA alışmaları

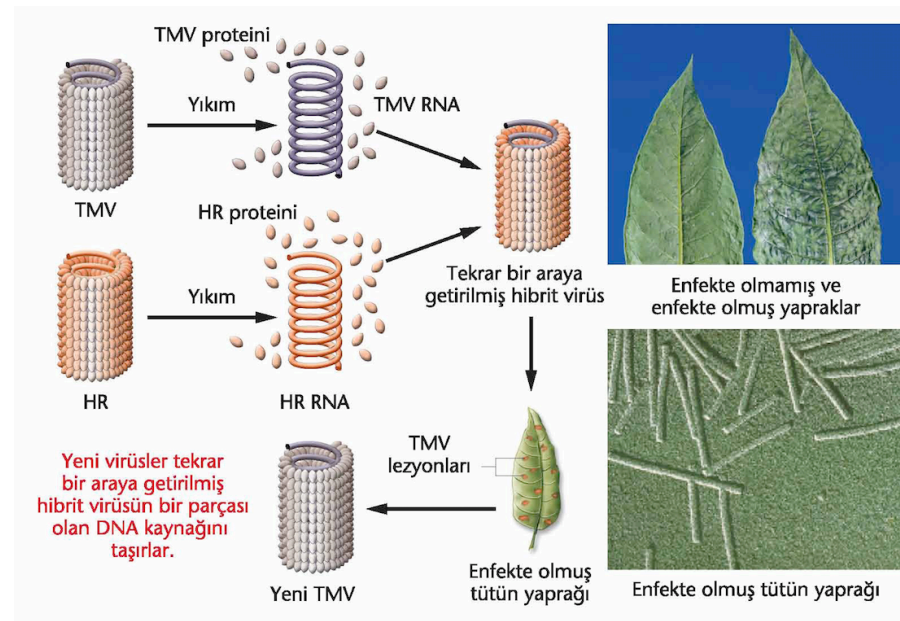
- Böyle bir kompleks bakteri hucresine yerleştirilip, genetik ifadesi izlenebilir.
- Bu tür bir karyotik DNA'nın ürünü olan ökaryotik proteinin bakteri hucresindeki varlığı, bu DNA'nın bakteri hucresinde sadece var olmadığını, ayrıca işlevsel olduğunu da gösterir.

RNA bazı virüslerde genetik materyal olarak görev yapmaktadır

- Bazı virüslerde DNA yerine RNA bulunur.
- 1956'da, tütün mozaik virüsünden (TMV) saflaştırılan RNA, tütün yapraklarına bulaştırıldığında, virüsün neden olduğu karakteristik lezyonlar oluşmuştur.
- Birazdan anlatılacak olan deney ile, bu virüsün genetik materyalinin RNA olduğu sonucuna varılmıştır.

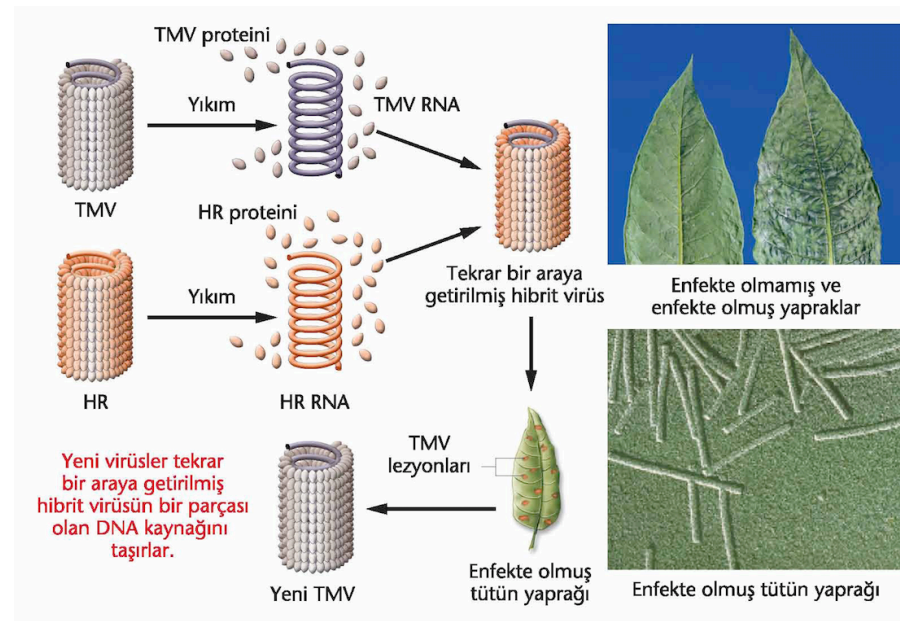
Conrat-Singer deneyi

- Heinz Fraenkel-Conrat ve B.Singer, TMV ve Holmes ribgrass (HR) viral suşlarından RNA ve kılıf proteinlerini izole etmişlerdir.



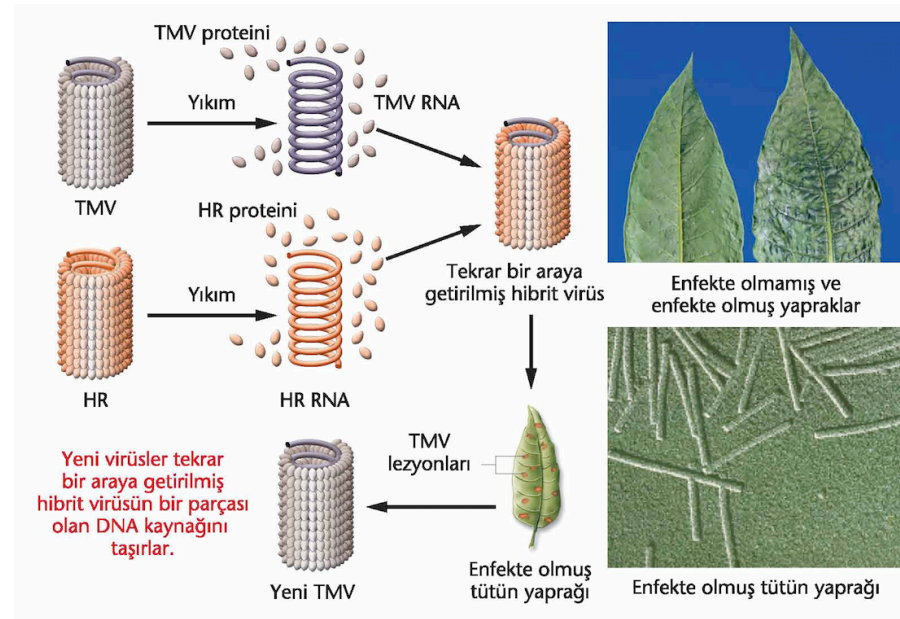
Conrat-Singer deneyi

- Daha sonra, bir suşun RNA'sı ile diğer suşun protein kılıfını karıştırarak "melez" (hibrit) virüsler elde etmişlerdir.



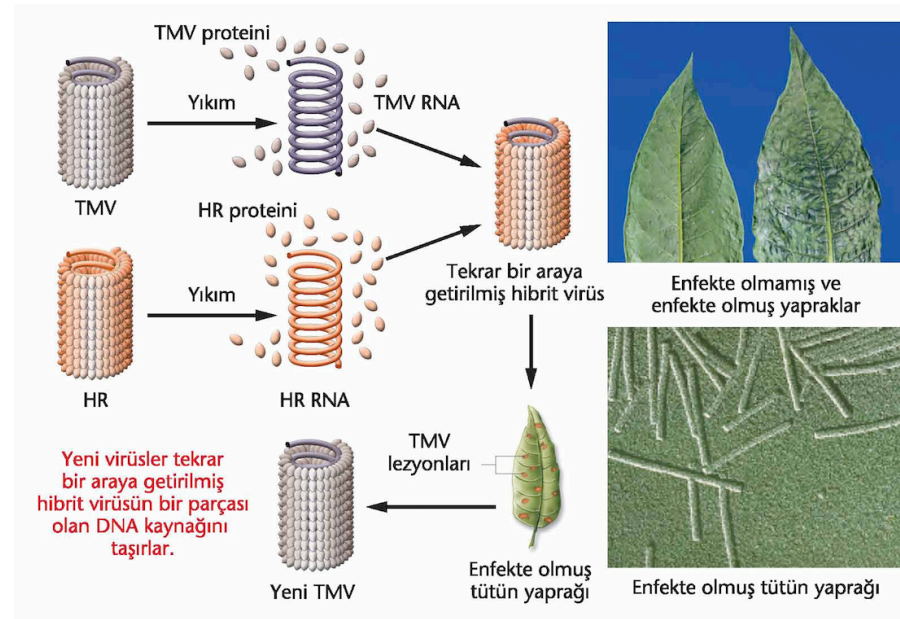
Conrat-Singer deneyi

- Bu melez virüsler tütün yapraklarına bulaştığında, lezyonlar, yeniden yapılanmış olan virüsün RNA'sına göre oluşmuştur.



Conrat-Singer deneyi

- Böylece, bu virüslerde RNA'nın genetik materyal olduğu sonucu ortaya çıkmıştır.



Norman R. Pace ve Sol Spiegelman

- 1965 ve 1966'da, bu araştırmacılar, Q β fajından RNA'nın ayrıştırılıp, *in vitro* replike edilebileceğini göstermişlerdir.
- Replikasyon, RNA replikaz denilen bir enzime bağlıdır.

Norman R. Pace ve Sol Spiegelman

- RNA, virüsün replikasyonu için gerekli olan bütün bileşenlerin sentezini yönlendirir.
- Dolayısıyla RNA, bu fajlarda genetik materyal olarak fazlasıyla yeterlidir.

Retrovirüsler

- RNA taşıyan bir grup virüs tipidir.
- Bunlarda replikasyon olağan dışıdır.

Retrovirüsler

- Konak hücreyi enfekte ettikten sonra DNA sentezine kalıp görevi görmesi için kendi RNA'larını kullanırlar.
- RNA'dan DNA sentezini sağlayan bu süreçte görev alan enzim revers transkriptaz' dir.
- Oluşan bu cDNA, konak genomuna katılabilir ve konak genleri ifade edildiğinde cDNA da ifade edilir.
- AIDS hastalığına neden olan virüsler RNA virüsleridir.

Nükleik asit kimyası

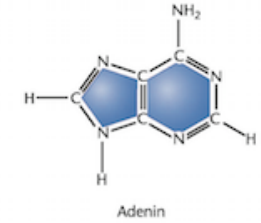
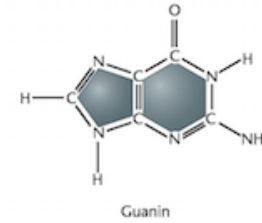
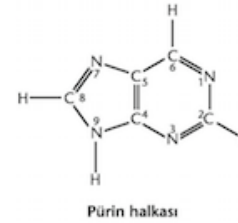
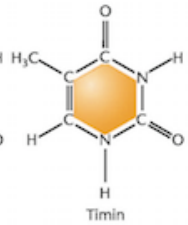
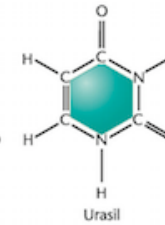
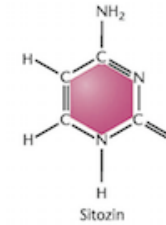
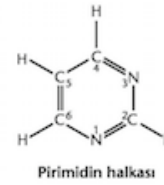
- DNA'nın yapısını kavramak için nükleik asit kimyasını bilmek gerekir.

Nükleotidler

- DNA nükleik asittir ve nükleotidler, bütün nükleik asit moleküllerinin yapı taşlarıdır.
- Bazen mono-nükleotid olarak adlandırılan bu yapısal birimler, üç bileşeni içerir:
 - Azotlu baz,
 - Pentoz şekeri
 - Fosfat grubu

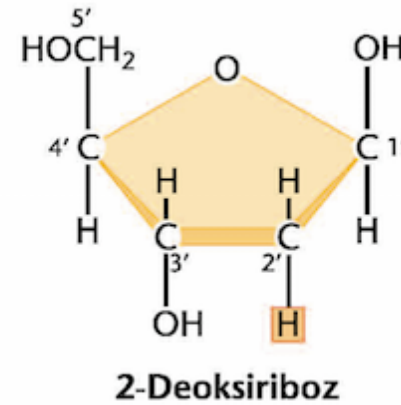
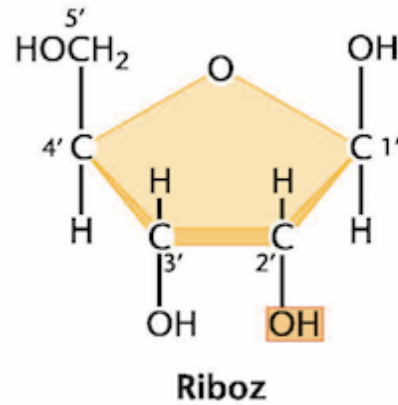
Nükleotidler

- Azotlu bazlar iki çeşittir:
 - Pürinler
 - Pirimidinler
- Pürinler: adenin ve guanin
- Pirimidinler: sitozin timin ve urasil



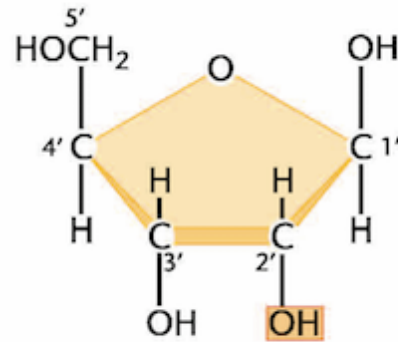
Riboz / Deoksiriboz

- Nükleik aside adını veren, taşıdığı pentoz şekerdir.
- Ribonükleik asitlerde (RNA) riboz, deoksiribonükleik asitlerde (DNA) deoksiriboz bulunur.

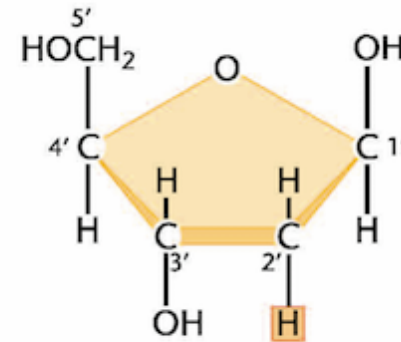


Riboz / Deoksiriboz

- Her karbon atomu üslü numaralarla gösterilir (C-1', C-2' gibi)
- Riboz ile karşılaştırıldığında, deoksiribozda C-2' pozisyonunda hidroksil grubu yerine hidrojen atomu bulunur.
- Bu şekilde C-2' pozisyonundaki hidroksil grubunun varlığı, RNA'yı DNA'dan ayırır.



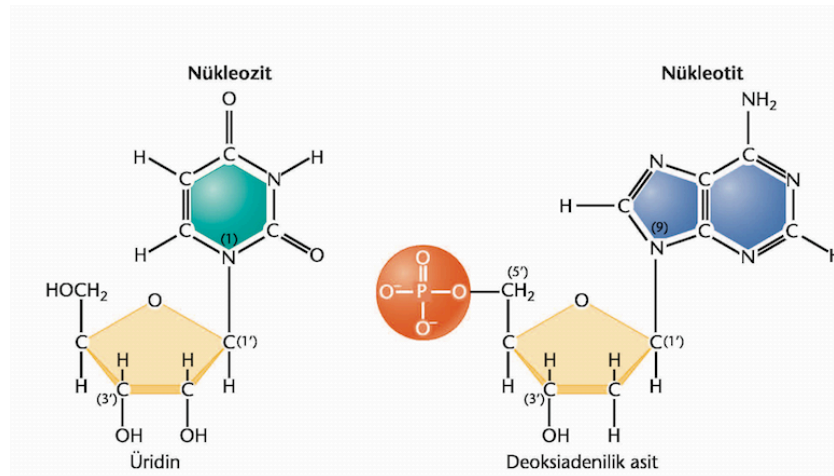
Riboz



2-Deoksiriboz

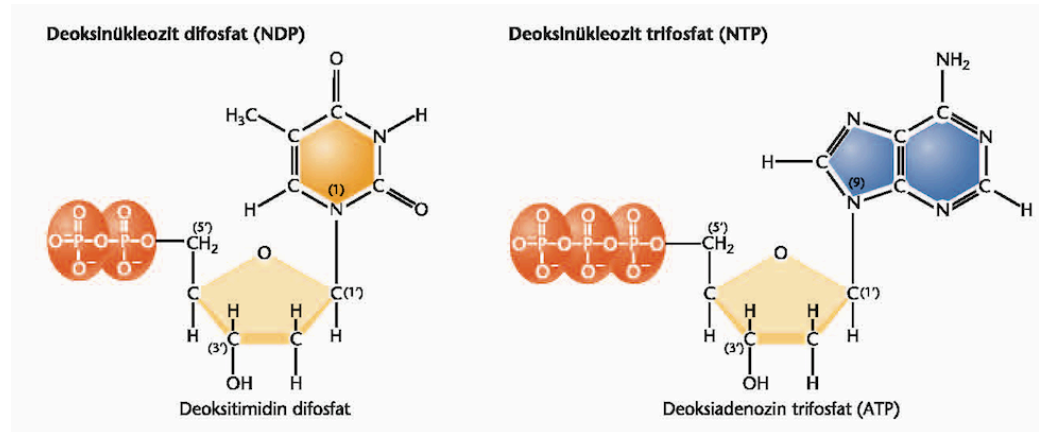
Nükleozid / Nükleotid

- Bir molekül eğer pürin ya da pirimidin bazı ve riboz ya da deoksiriboz şekeri içeriyorsa, bu kimyasal birime nükleozit denir.
- Nükleozite fosfat grubu takılırsa, nükleotit olarak adlandırılan molekül oluşur.



Di-fosfatlar ve tri-fosfatlar

- Nükleotidler, nükleozid monofosfat (NMP) olarak da tanımlanırlar.
- Bir ya da iki fosfat ilavesi ile, sırasıyla, nükleozid difosfatlar (NDP) ve nükleozid trifosfatlar (NTP) oluşur.



ATP / GTP

- Terminal fosfat grubunun çıkarılması ya da ilavesiyle büyük miktarda enerji oluşumu söz konusu olduğu için adenzin trifosfat (ATP) ve guanozin trifosfat (GTP) hücre biyoenerjitiğinde çok önemlidir.
- ATP ve GTP genetik işlemler de dahil birçok hücre faaliyetinde kullanılır.

Polinükleotidler

- İki mononükleotid arasında kurulan bağ yapısında, iki şekere bağlı fosfat grubu yer alır.
- Oluşan bağ, fosfodiester bağıdır.
- İki nükleotid birleştiğinde bir dinükleotid; üç nükleotid birleştiğinde bir trinükleotid oluşturur.
- Yaklaşık 20 nükleotid içeren kısa zincirlere oligonükleotid denir.
- Daha uzunları polinükleotid olarak adlandırılır.

Levene'nin yanlışlığı

- Yapılan araştırmalar sonucunda, Levene'nin tetranükleotid hipotezinin yanlış olduğu ortaya konmuştur.
- DNA'da dört bazın mutlaka eř molar miktarlarda bulunması gerekmediği gösterilmiştir.

Levene'nin yanlışlığı

- DNA'nın molekül ağırlığının 10^6 - 10^9 dalton arasında olduğu bulunmuştur.
- Bu değer, tetranükleotid olamayacak kadar büyüktür.
- Bugün gerçek olan, DNA'nın çok uzun bir polinükleotid zincirine sahip olduğudur.

DNA'nın olağanüstü çeşitliliği

- Uzun polinükleotid zincir yapısı, DNA'nın bir genetik bilgiyi depolayabilme kapasitesini açıklamaktadır.
- Bu uzun zincirdeki her bir nükleotid pozisyonu, dört nükleotidden herhangi biri tarafından işgal edilirse, olağanüstü çeşitlilik ortaya çıkar.
- Örneğin, sadece 1000 nükleotid içeren bir polinükleotid için, her birinin dizilimi diğerinden farklı olan 4^{1000} değişik yapı oluşturulabilir.

DNA'nın işlevini kavramanın anahtarı

- Polinükleotit zincirleri, genetik materyal olarak rol oynayan DNA'yı oluşturmak üzere nasıl düzenlenmişlerdir ?

Watson ve Crick'in önerileri

- Watson ve Crick'in, DNA'nın yapısı ile ilgili önermede bulunurken başlıca iki kaynaktan gelen bilgileri kullanmışlardır:
 - Hidroliz edilmiş DNA örneğinin baz kompozisyon analizi
 - DNA'nın X-ışını kırınımı çalışmaları

Erwin Chargaff'ın alışmaları

- Herhangi bir türde, DNA'daki adenin bazlarının miktarı, timin bazlarının miktarı ile orantılıdır.
- Guanin bazlarının miktarı ise sitozin bazlarının miktarı ile orantılıdır.
- Ayrıntılı bilgi için bir sonraki slaytta yer alan tabloya bakınız.

(a) Chargaff'ın verileri

Organizma/Kaynak	Molar oranlar ^a				Organizma	%G + C
	1	2	3	4		
	A	T	G	C		
Öküz timusu	26	25	21	16	T2 faji	36.0
Öküz dalağı	25	24	20	15	<i>Drosophila</i>	45.0
Maya	24	25	14	13	Mısır	49.1
Kuş tüberküloz basili	12	11	28	26	<i>Euglena</i>	53.5
İnsan spermi	29	31	18	18	<i>Neurospora</i>	53.7

(a) Değişik kaynaklardan elde edilen DNA'ların baz içerikleri

Kaynak	Baz içeriği				Baz oranı		A + T/G + C oranı	
	1	2	3	4	5	6	7	8
	A	T	G	C	A/T	G/C	(A + G)/(C + T)	(A + T)/(C + G)
İnsan	30.9	29.4	19.9	19.8	1.05	1.00	1.04	1.52
Deniz kestanesi	32.8	32.1	17.7	17.3	1.02	1.02	1.02	1.58
<i>E.coli</i>	24.7	23.6	26.0	25.7	1.04	1.01	1.03	0.93
<i>Sarcina lutea</i>	13.4	12.4	37.1	37.1	1.08	1.00	1.04	0.35
T7 bakteriyofaji	26.0	26.0	24.0	24.0	1.00	1.00	1.00	1.08

*Kaynak: Chargaff, 1950'den.

^aP mol başına nitrojen mol içeriği (genellikle yüzde 100'den daha az olarak elde edilir).

Erwin Chargaff'ın alışmaları

- Tablodaki oranlara göre, pürinlerin (A+G) toplamı pirimidinlerin (C+T) toplamına eşittir.
- C + G yüzdesinin, A + T yüzdesine eşit olması gerekmez.
- İki değer arasındaki oran türlere göre büyük değişiklikler gösterir.

Chargaff'ın ulaştığı sonuçlar

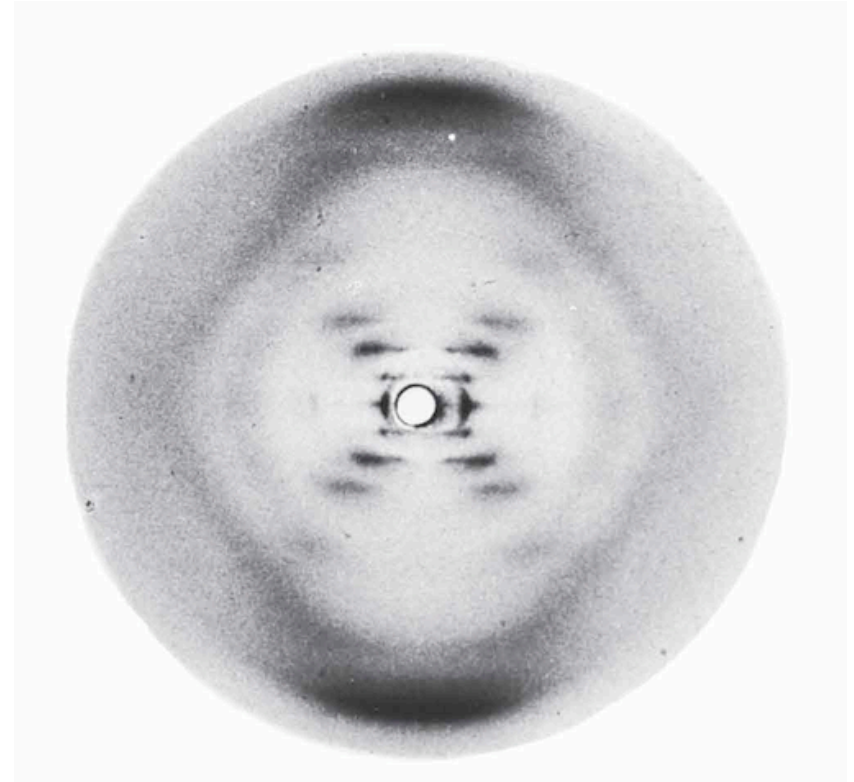
- Veriler "bilmece" için ilk ipuçlarını sağlamıştır.
- Ayrıca, dört bazın eşit miktarda bulunduğunu savunan tetranükleotid hipotezi de çürütülmüştür.

X- ışını kırınımı analizi

- DNA zincirleri X-ışını bombardımanına tutulduğunda, molekülün atomik yapısına göre ışınlar saçılır.
- Saçılım profili (difraksiyon), fotoğraf filmi üzerinde lekeler halinde belirir.
- Böylelikle moleküldeki düzenli yapılar ve genel görünüm dikkatle incelenir.
- Bu olay X-ışını kırınımı olarak bilinir.

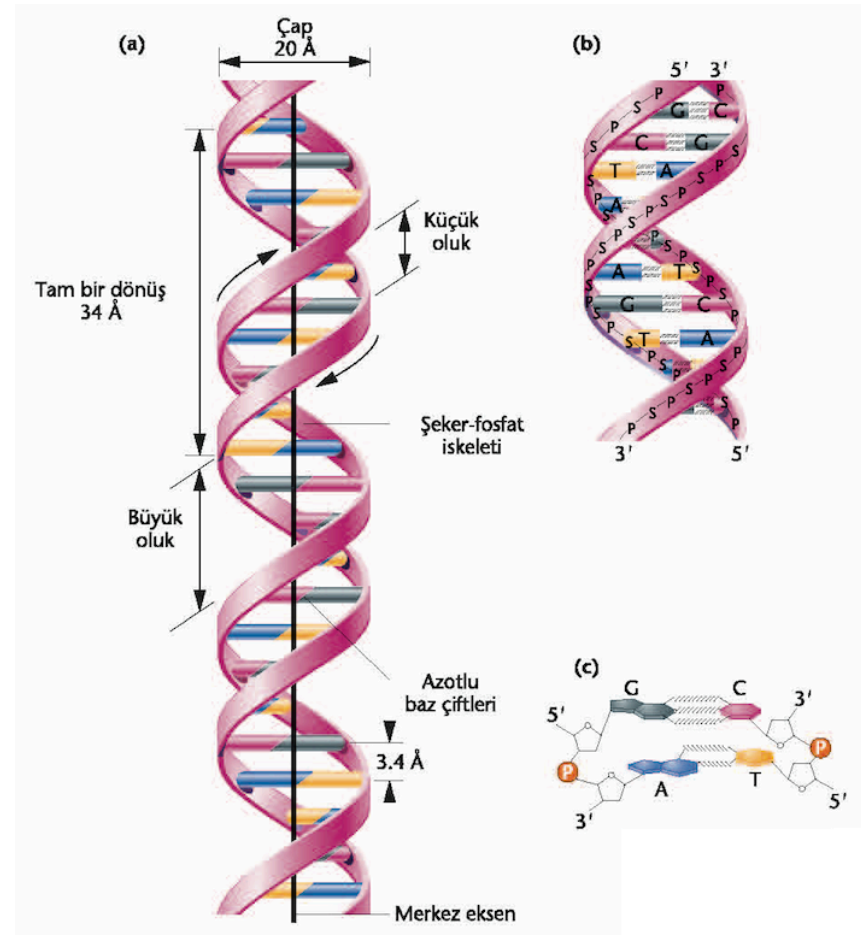
X- ışını kırınımı analizi

- Wiliam Astbury, DNA'da 3.4 angstrom (Å) aralıklarla tekrarlayan düzenli bir yapı saptamıştır.
- Rosalind Franklin DNA'nın bir çeşit sarmal yapıda olduğunu ileri sürmüştür.
- Ancak, araştırmacı kesin bir model önerememiştir.
- Pauling, DNA'nın üçlü sarmal yapıda olduğu şeklinde yanlış bir öneri getirmiştir.



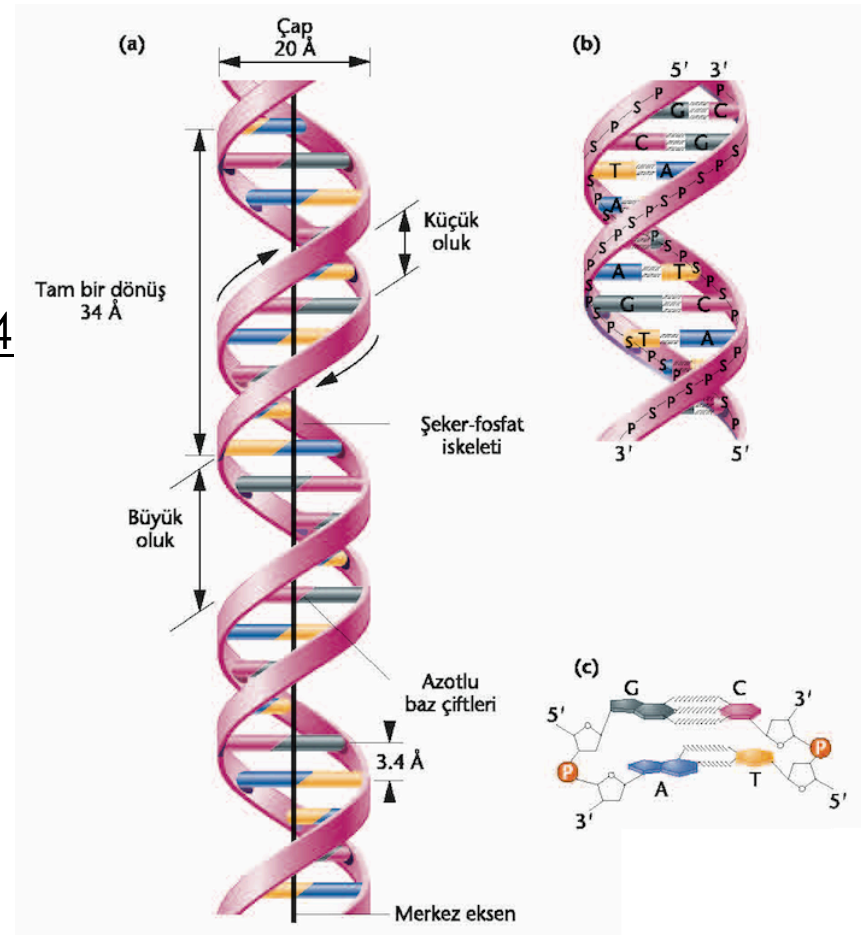
Watson-Crick modeli

- İki uzun polinükleotit zinciri, bir merkez eksen etrafında kıvrılarak, sağ-el ikili sarmal yapısını oluşturur.
- İki zincir birbirine anti-paraleldir.
- Yani, zincirlerin C-5' → C-3' yönelimi birbirine göre terstir.



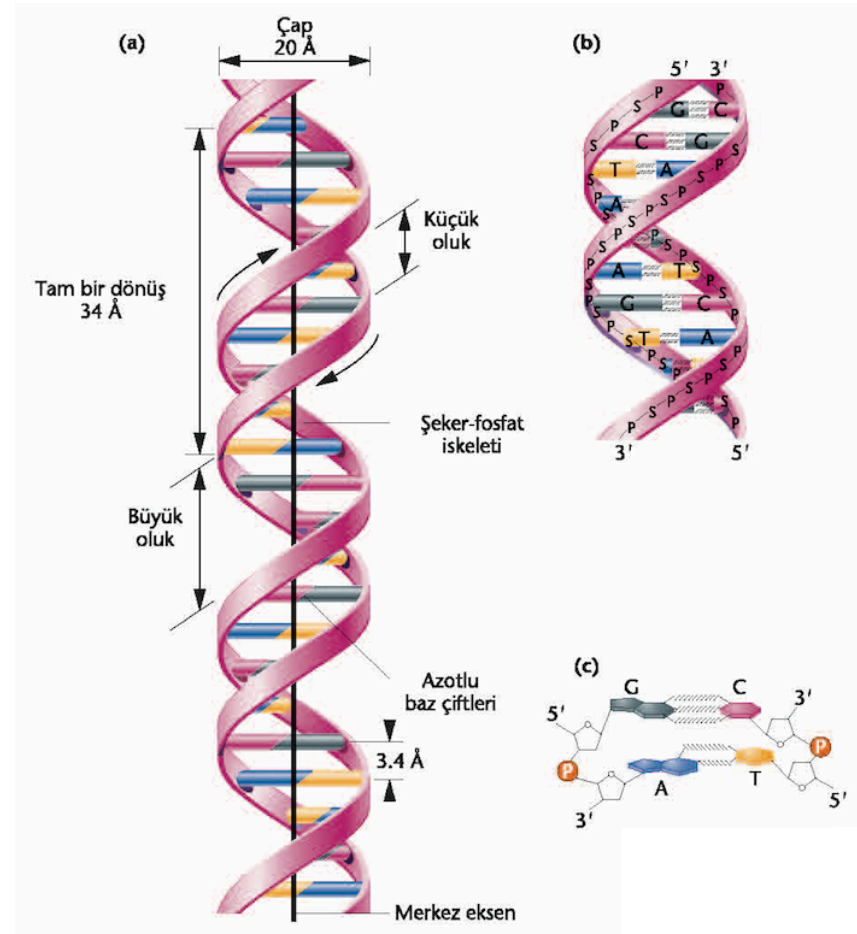
Watson-Crick modeli

- Her iki zincirin bazları düzlemsel yapıdadır ve düzlemleri eksene diktir.
- Bazlar, aralarında 3.4 \AA (0.34 nm) mesafe olacak şekilde birbirine ardına "istiflenir" ve sarmalın içinde yer alır.
- Karşı zincirlerdeki azotlu bazlarla, hidrojen bağları ile bağlanarak eşleşirler.
- DNA'da sadece, $A = T$ ve $G = C$ eşleşmesi mümkündür.



Watson-Crick modeli

- Sarmalın her bir tam bir dönüşü 34 Å (3.4 nm)'dir.
- Her bir zincirde bir dönüşte 10 baz yer alır.
- Ana eksen üzerinde daha geniş olan büyük (majör) oluklar ve daha dar olan küçük (minör) oluklar yer alır.
- Sarmalın çapı 20 Å (2 nm)'dur.



Baz eşleşmesi

- Baz-eşleşmesi, modelin genetik açıdan en önemli özelliğidir.
- İki zincirin anti-paralel doğası ikili sarmal modelinin kilit noktasıdır.
- Zincirin biri 5' ucundan 3' yönüne uzanırken diğeri 3' ucundan 5' yönüne uzanır.

Baz eşleşmesi

- Sağ-el sarmalının doğasını anlamamanın en iyi yolu, ayna görüntüsü olan sol-el sarmalı ile karşılaştırmaktır.
- Sağ el sarmalının uzaydaki konformasyonu, Watson ve Crick'in elindeki verilere en iyi uyan yapıdır.



Sağ-el ikili sarmalı



Sol-el ikili sarmalı

Spiral merdiven basamağı

- Bu yapıda yer alan her pürinin (A ya da G) karşısına bir pirimidin (T ya da C) gelirse,
- Sarmalın çapı, X-ışını kırınımı çalışmalarını sonucu öne sürüldüğü gibi 20 Å (2nm) olmaktadır.

Tamamlayıcılık

- Özgöl $A = T$ ve $G = C$ baz eşleşmesi, tamamlayıcılık (complementarity) kavramının temelidir.
- Bu terim, bazlar arasında hidrojen bağları ile sağlanan kimyasal ilişkiyi tanımlar.

Neden hesaba katılmadı?

- Neden başka baz eşleşmeleri olası değildir ?
- Watson ve Crick, $A = G$ ve $C = T$ baz eşleşmesini hesaba katmamışlardır.

Çünkü !!!

- Watson ve Crick'in öne sürdüğü eşleşmeler, pürin-pürin ve pirimidin-pirimidin arasındaki eşleşmelerdir.
- Bu eşleşmede pürin ve pirimidin halkalarının büyüklüğüne bağlı olarak sarmalın çapı bazı kısımlarda 20 Å'dan büyük ve bazı kısımlarda 20 Å'dan küçük olacaktır.

Çünkü !!!

- Ayrıca bu şekildeki baz eşlemesi ile oluşan üç boyutlu konfigürasyonda, yeterli sayıda hidrojen bağı oluşturacak uygun bir sıralanma gerçekleşmez.
- $A = G$ ve $C = T$ baz eşleşmeleri ise, her ne kadar pürin-pirimidin eşleşmesi olsa da, aynı nedenden dolayı kabul edilmemiştir.

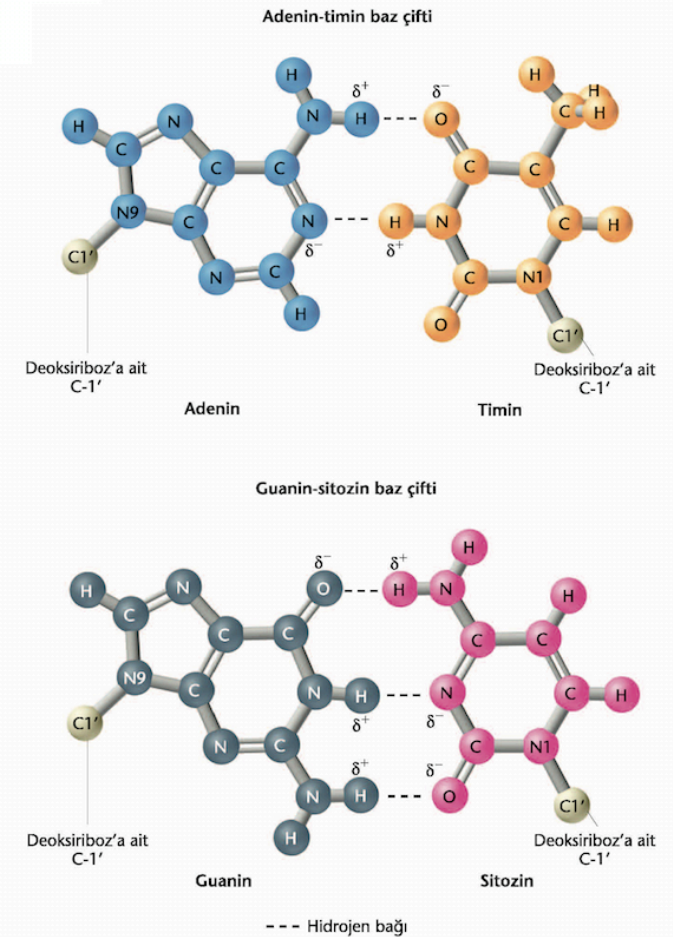
Hidrojen bağı

- Hidrojen bağı, kovelent bağ ile bağlı bir hidrojen atomu ile ortaklanmamış bir elektron içeren diğer bir atom arasındaki zayıf bir elektrostatik çekimdir.

Hidrojen bağı

- İkili sarmaldaki bazların konumuna göre;
 - Adenin timinle iki hidrojen bağı
 - Guanin sitozinle üç hidrojen bağı yapar

- Daha uzun sarmallardaki (iki uzun polinükleotid zinciri) binlerce bağ, DNA ikili sarmalındaki kimyasal kararlılığı artırır.



Kimyasal dayanıklılık

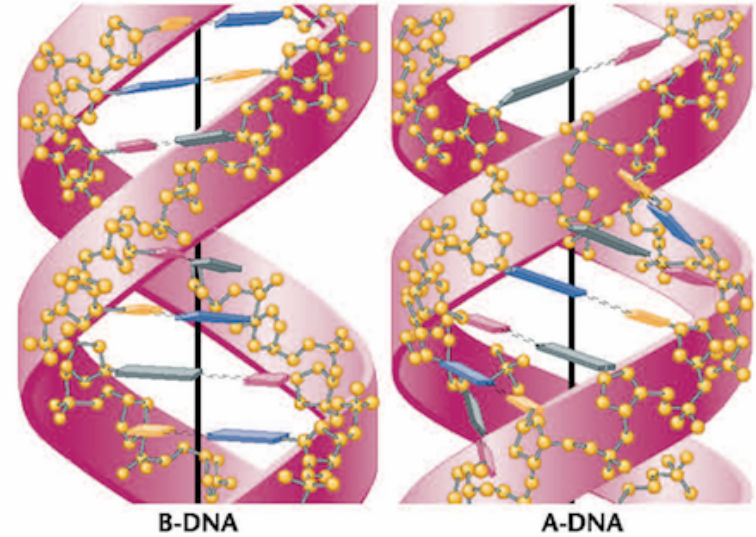
- Dayanıklılık sağlayan diğer bir faktör de eksen boyunca uzanan şekerler ve bazların düzenidir.
- Watson-Crick modelinde, hidrofilik şeker-fosfat iskeleti eksenin dışındadır ve her iki kısım da su ile ilişki kurar.

Kimyasal dayanıklılık

- Oldukça hidrofobik azotlu bazlar sarmalın (eksenin) içinde yatay biçimde "istiflenmiştir" ve böylece su ile temastan korunmuştur.
- Bu moleküler düzenlemeler sarmala önemli bir kimyasal dayanıklılık sağlar.

DNA'nın formları

- Değişik izolasyon koşullarına göre, DNA'nın farklı konformasyonel formları tanımlanmıştır.
- Watson ve Crick'in incelemelerini yaptıkları dönemde, DNA'nın iki formu A-DNA ve B-DNA bilinmekteydi.
- Watson ve Crick'in analizleri, Rosalind Franklin'in X-ışını kırınımı çalışmaları yaptığı DNA'nın B formuna dayanmaktaydı.

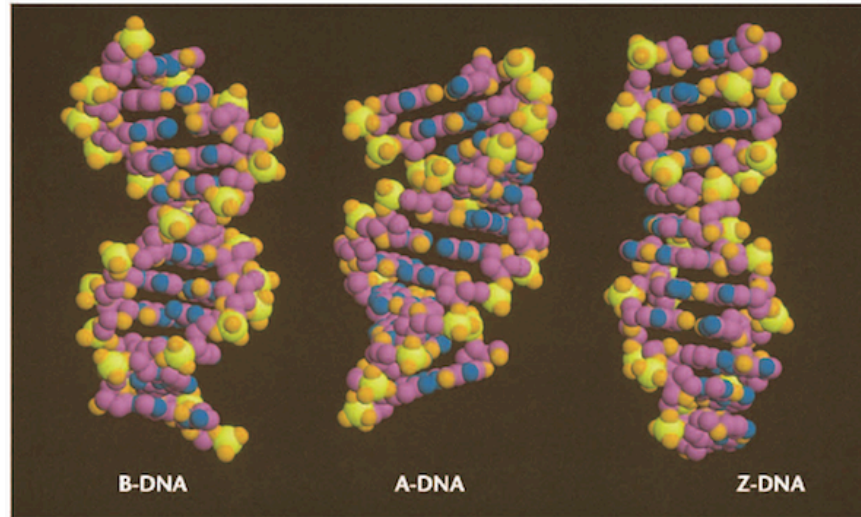


Tek-kristal X-ışını analizi

- 1950'lerde DNA çalışmaları X-ışını kırınımı deneylerine dayanmasına rağmen, son yıllarda yapılan araştırmalarda tek-kristal X-ışını analizi kullanılmaktadır.
- Eski çalışmalarda çözünürlük 5 Å iken, tek-kristal X-ışını kırınımında ise yaklaşık 1 Å'dur ve neredeyse atomik çözünürlüğe yakındır.

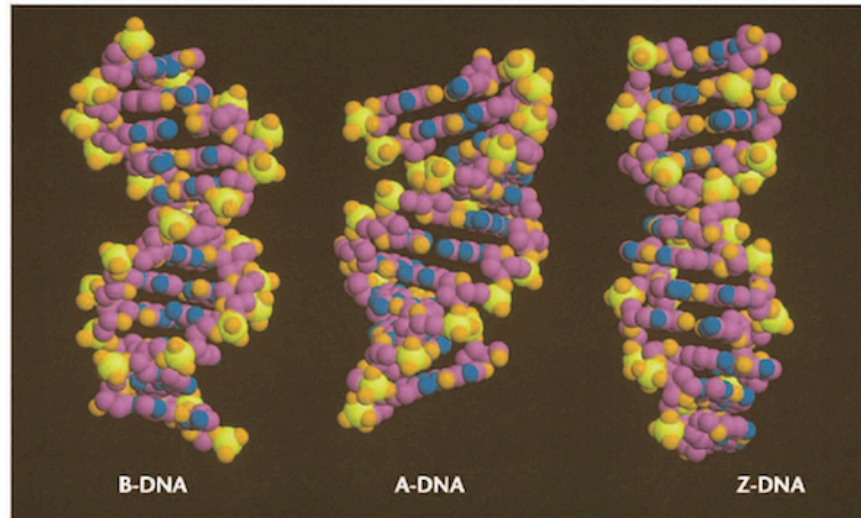
A-DNA / B-DNA

- A-DNA şimdi ayrıntılı olarak incelenebilmektedir.
- A-DNA yüksek-tuz ya da dehidrasyon koşullarında baskın olan yapıdır.
- B-DNA ile karşılaştırıldığında A-DNA daha sıkı bir yapıdadır.



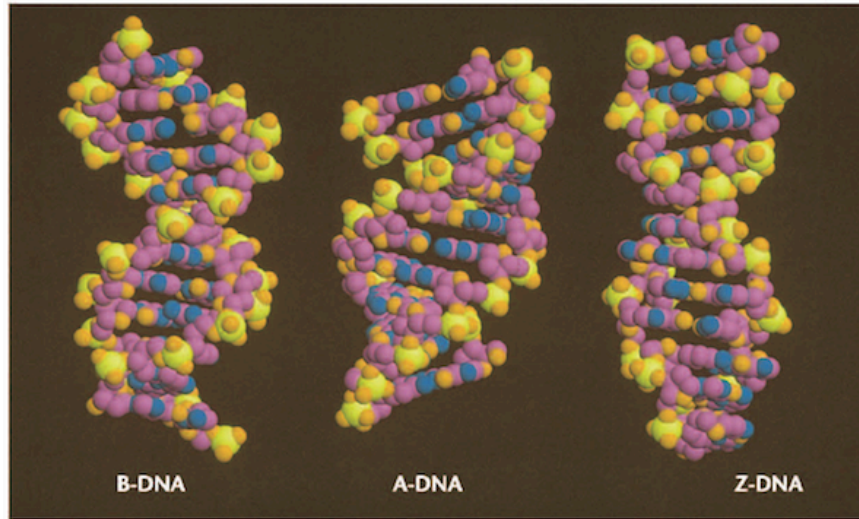
A-DNA / B-DNA

- apı 23 Å olan sarmalın tam bir dönüşünde 9 baz çifti yer alır.
- A-DNA da sağ-el sarmalıdır ancak bazların yönelişleri bir miktar farklıdır.



A-DNA / B-DNA

- Bazılar sarmalın eksenine göre eğik ve yatay olarak yer değiştirmiştir.
- Bu farklılardan dolayı, büyük ve küçük oluğun görünümü B-DNA'dakine göre farklıdır.



C-DNA

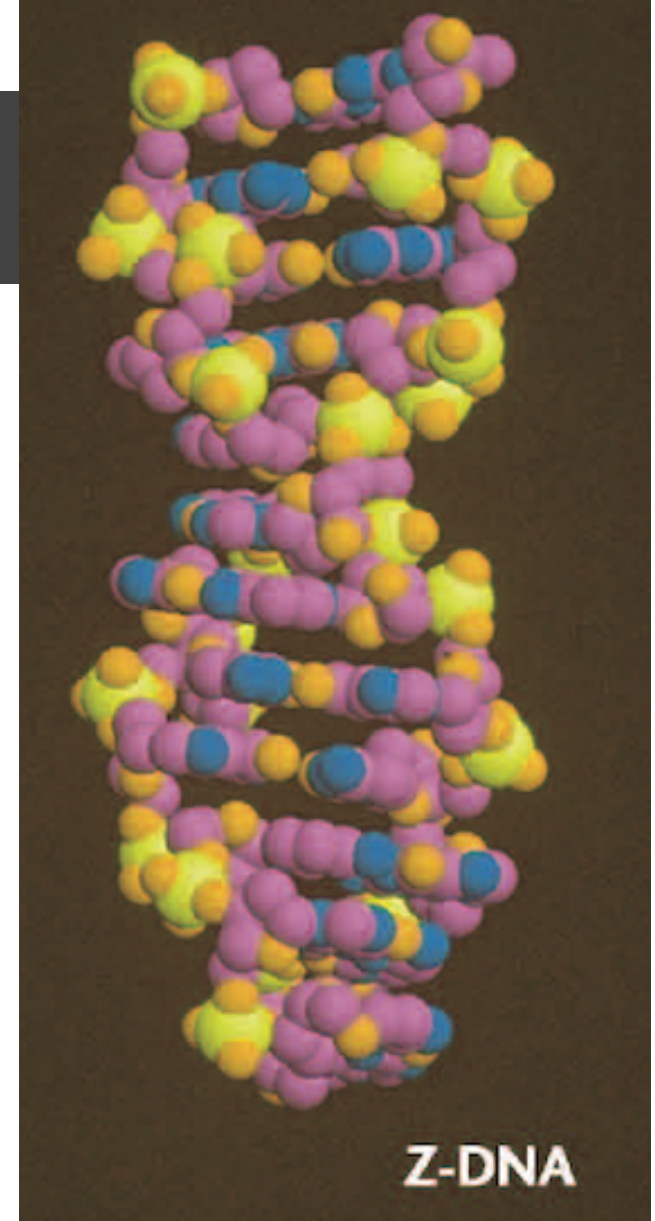
- C-DNA, A-DNA ve B-DNA'ya göre daha yüksek dehidrasyon koşullarında izolasyon yapıldığında görülür.
- Sarmalın tam bir dönüşünde 9.3 baz yer alır.
- Sarmalın apı 19 Å'dur.

D-DNA / E-DNA

- Diğer iki form olan D-DNA ve E-DNA, içeriğinde guanin bulunmayan DNA formlarıdır.
- Sarmalın tam bir dönüşünde daha az baz çifti bulunmakta olup bunlar sırasıyla 8 ve 7 bazdır.

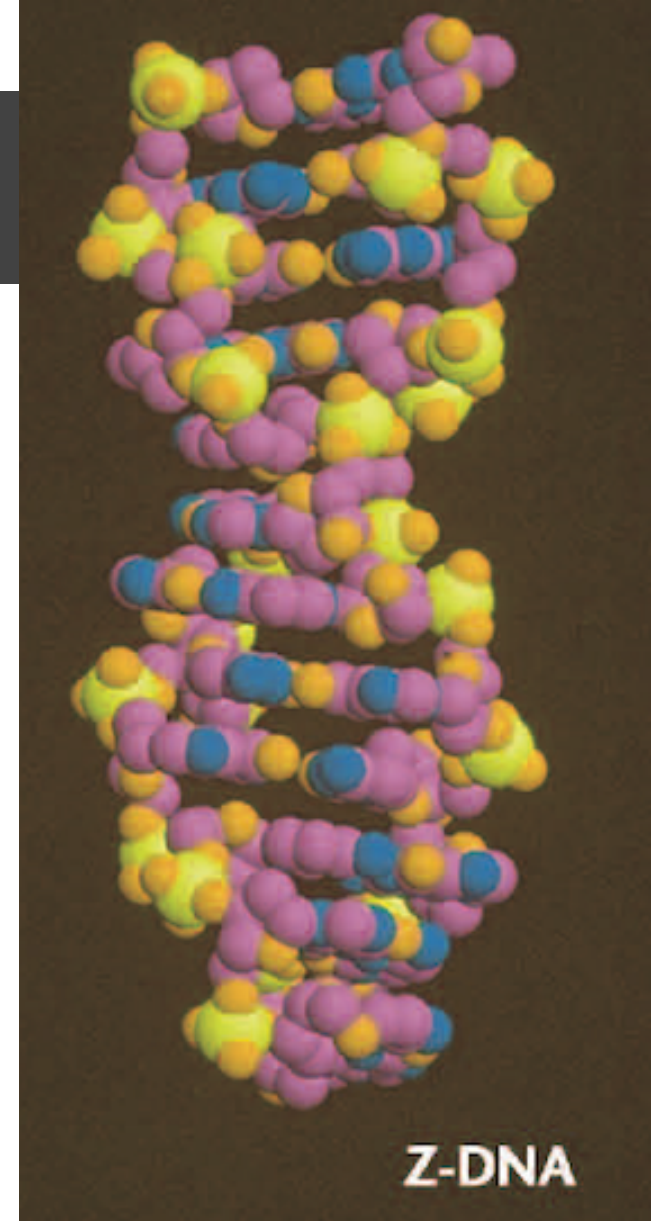
Z-DNA

- Z-DNA, DNA'nın bir başka formudur.
- Z-DNA'nın ilgi çekici konfigürasyonu sol el sarmalı olmasıdır.
- Sol el sarmalın çapı 18 Å (1.8 nm)'dur.



Z-DNA

- Her bir dönüşte 12 baz çifti yer alır ve zikzak konfigürasyona sahiptir (adı buradan kaynaklanır).
- B-DNA'da bulunan büyük oluk Z-DNA'da neredeyse kaybolmuştur.



P-DNA nedir ?

- DNA yapay bir şekilde uzatılırsa, P-DNA denilen yeni ilginç bir form daha alabilmektedir.

P-DNA / B-DNA karşılaştırması

- P-DNA modeli B formu ile karşılaştırıldığında, daha uzun, daha incedir ve B-DNA'da yüzeyde bulunan fosfat grupları iç kısımda yer aldığı için oldukça ilginç bir yapıdır.
- B-DNA'da sarmalın içinde yer alan azotlu bazlar, P-DNA'da sarmalın dış yüzeyine daha yakındır.
- B-DNA'da her bir dönüşte 10.4 baz bulunurken, P-DNA'da bunun aksine 2.62 baz yer alır.

Replikasyonda ve transkripsiyonda DNA formları

- Replikasyonda ve transkripsiyonda sarmalın zincirleri açılmalı ve DNA bu işlemlerde rol alan büyük yapıdaki enzimlerle ve diğer çeşitli proteinlerle ilişkiye açık olmalıdır.
- DNA'nın biçimindeki değişikliklerin bu işlemleri kolaylaştırması olasıdır.

Değişik formların biyolojik önemi

- Özgün konformasyonlar, proteinler için moleküler tanıma noktaları oluşturabilir.
- Ancak değişik formların biyolojik önemi, bu formların canlı içinde varlığının açıkça gösterilmesiyle gerçekleşecektir.

RNA'nın kimyasal yapısı

- Nükleik asitlerin ikinci çeşidi ribonükleik asit ya da RNA'dır.
- RNA'da da nükleotid yapı taşları polinükleotid zincirlerini meydana getirir.
- RNA'da deoksiriboz yerine riboz şekeri, azotlu baz timin yerine urasil bulunur.

RNA'nın DNA'dan en önemli farkı !

- RNA'nın DNA'dan en önemli bir farkı, RNA'nın çoğunlukla tek zincirli olmasıdır.

RNA'nın çift sarmal istisnası

- Birincisi, RNA molekülleri, tamamlayıcı baz çiftlerinin ikili sarmal bölgelerini oluşturmak için bazen kendi üstlerine katlanırlar.
- İkincisi, genetik materyali RNA olan bazı hayvan virüslerinde RNA ikili sarmal olarak bulunur.

RNA eşitleri

- Genetik bilginin ifadesinde üç hücrese RNA molekölü işlevseidir: ribozomal RNA (rRNA), haberci RNA (mRNA) ve taşıyıcı RNA (tRNA).
- Bu molekölle DNA'nın bir zincirinin tamamlayıcı kopyası olarak transkripsiyon sonucunda sentezlenir.

RNA'nın kalıbı

- RNA'nın nükleotid dizisi, sentezlendiği kalıp DNA'nın deoksiribonükleotid dizisinin komplementeridir.
- RNA'da timin yerine urasil bulunduğu için, transkripsiyonda ve RNA baz eşleşmesi sırasında, urasil adeninin eşleniğidir.

RNA karakterizasyonu

- Aşağıdaki tabloda, prokaryotik ve ökaryotik hücrelerde bulunan RNA'nın başlıca formlarının özellikleri verilmiştir.
- Değişik RNA'lar, merkezkaç alandaki çökelmelerine ve içerdikleri nükleotid sayısı ile ölçülen büyüklüklerine göre ayırt edilir.

RNA Sınıfı	% Toplam RNA*	Bileşenler (Svedberg Sabiti)	Ökaryotik (E) ya da Prokaryotik (P)	Nükleotit Sayısı
Ribozomal (rRNA)	80	5S	P ve E	120
		5.8S	E	160
		16S	P	1542
		18S	E	1874
		23S	P	2904
Taşıyıcı (tRNA)	15	28S	E	4718
		4S	P ve E	75-90
Haberci (mRNA)	5	değişir	P ve E	100-10.000

* E. coli'de

RNA karakterizasyonu

- Çökeltme özelliği molekülün; yoğunluğu, kütlesi ve biçimine bağlıdır.
- Svedberg katsayısı (S) adlı birimle ölçülür.
- Büyük S değeri çoğunlukla molekülün büyük olduğunu gösterse de, bağlantı doğrudan değildir.

RNA Sınıfı	% Toplam RNA*	Bileşenler (Svedberg Sabiti)	Ökaryotik (E) ya da Prokaryotik (P)	Nükleotit Sayısı
Ribozomal (rRNA)	80	5S	P ve E	120
		5.8S	E	160
		16S	P	1542
		18S	E	1874
		23S	P	2904
Taşıyıcı (tRNA)	15	28S	E	4718
		4S	P ve E	75-90
Haberci (mRNA)	5	değişir	P ve E	100-10.000

* E. coli'de

RNA karakterizasyonu

- Örneğin, molekül ağırlığındaki iki kat artış S değerini iki kat yükseltmez.
- Bunun nedeni, molekülün kütlesinin yanı sıra, büyüklüğünün ve biçiminin de çökme (S) hızını etkilemesidir.
- Gördüğünüz gibi, üç sınıf RNA'nın büyüklükleri çok farklıdır.

RNA Sınıfı	% Toplam RNA*	Bileşenler (Svedberg Sabiti)	Ökaryotik (E) ya da Prokaryotik (P)	Nükleotit Sayısı
Ribozomal (rRNA)	80	5S	P ve E	120
		5.8S	E	160
		16S	P	1542
		18S	E	1874
		23S	P	2904
		28S	E	4718
Taşıyıcı (tRNA)	15	4S	P ve E	75-90
Haberci (mRNA)	5	değişir	P ve E	100-10.000

* E. coli'de

DNA ve RNA araştırmalarında birçok analitik yöntem yararlı olmuştur

- DNA'nın genetik materyal olarak rolü ve RNA'nın transkripsiyon ve translasyondaki görevleri aydınlatılmıştır.
- Bu bölümde, bu moleküllerin incelenmesinde kullanılan çeşitli yöntemleri göreceğiz.

Ultraviyole Işığının soğurulması (UV)

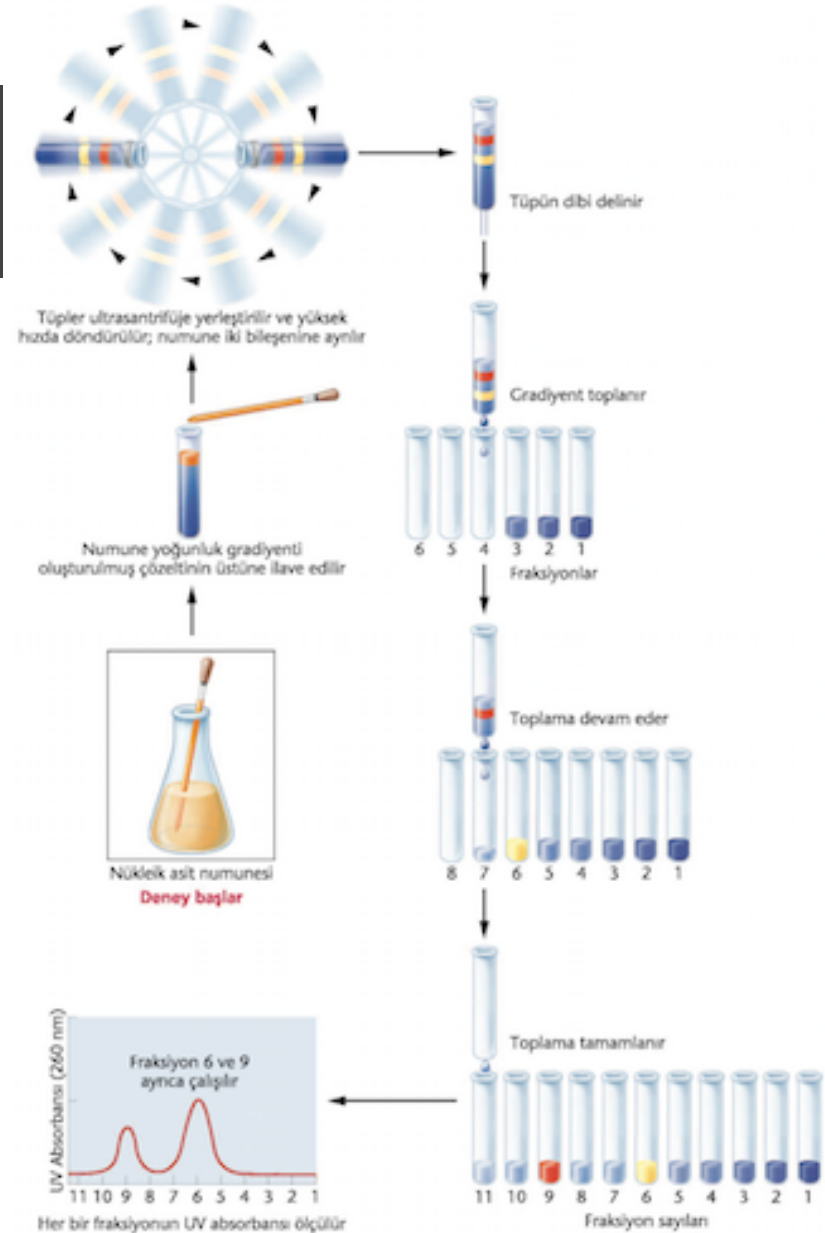
- Azotlu baz içeren herhangi bir molekül (Örneğin, nükleozidler, nükleotidler ve polinükleotidler) UV ışığı kullanılarak incelenebilir.
- Özellikle nükleik asitlerin yerleşimi, ayrıştırılması ve tanımlanmasında önemlidir.

ökeme Davranışı

- Nükleik asit karışımları, çeşitli gradiyent santrifügasyon işlemlerinden biri ile ayrıştırılabilir.
- Bu şekilde, nükleik asidin, gradiyentin hangi kısmında yer aldığı belirlenir ve bu fraksiyon ayrıştırılarak daha ayrıntılı incelenir.

Gradyent santrifügasyon

- Gradyent fraksiyonlarını ayrı ayrı alabilmek için tüpün dibi delinerek fraksiyonlar tek tek tüplerde toplanır.
- Her birinin 260 nm'de ultraviyole absorbansı ölçülür ve örneklerin grafik şeklindeki profilleri oluşturulur.



Gradyent santrifügasyon

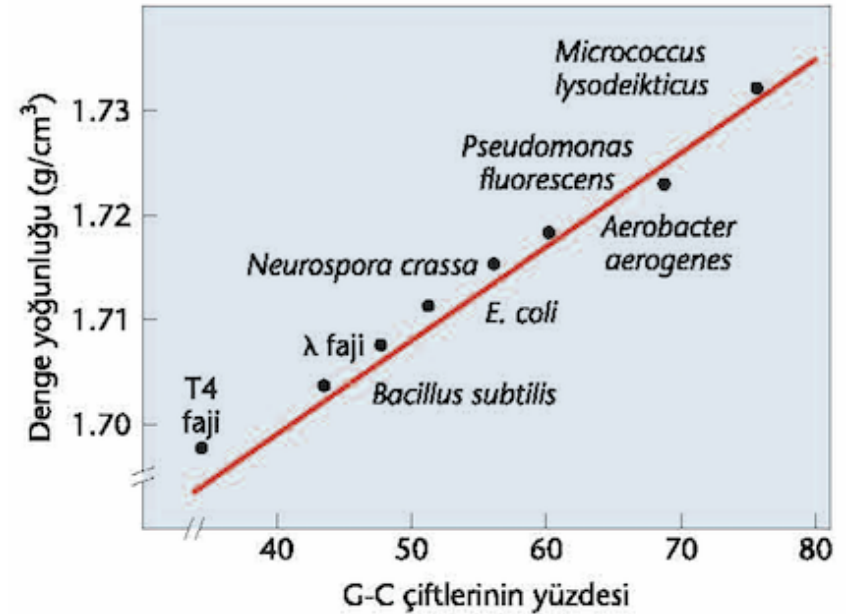
- Gradyent santrifügasyonları, moleküllerin çözeltideki çökme davranışlarına dayanır.
- Nükleik asitlerin incelenmesinde iki tip gradyent santrifügasyon tekniğı uygulanır:
 - Çökme (sedimentasyon) dengesi
 - Çökme hızı

ökölme dengesi santrifügasyonu

- ökölme dengesi santrifügasyonuna bazen yoğunluk gradiyent santrifügasyonu da denir.
- Karışımındaki her bir bileşenin yoğunluğu ile çakışan yoğunluk, o bileşenin gradiyentini oluşturulur.
- Gradiyent fraksiyonlara ayrılabilir ve bileşenleri ayrıştırılır.
- Uygun bir biçimde kullanıldığında, bu yöntemle yoğunlukları çok az farklı DNA'lar yüksek çözünürlükle ayrıştırılabilir.

Çökme dengesi santrifügasyonu

- Bu yöntem, DNA'nın baz kompozisyonuna ait bulgu elde etmek için kullanılabilir.
- Bu yöntemi kullanarak, değişik kaynaklardan elde edilen DNA'ların moleküler tanımlamasını yapabiliriz.



ökelleme hızı santrifüstasyonu

- İkinci yöntem olan çökelleme hızı santrifüstasyonu bir analitik santrifüjdür.
- Moleküllerin santrifüstasyon sırasındaki hareketleri, mor ötesi ışığı soğurma optikleri ile izlenir.
- Böylece "ökelleme hızı" saptanabilir.

ökelleme hızı santrifügasyonu

- Bu yöntemde kilit değişkenler, incelenen moleküllerin kütlesi ve biçimidir.
- Genelde, kütle ne kadar fazla ise çökelleme hızı o kadar yüksektir.
- Ancak molekülün biçimi, sürtünme direncini etkiler.
- Bu nedenle, eşit kütleli fakat değişik biçimdeki iki molekül, değişik hızlarda çöker.

Çökeltme hızı ile moleköl ağırlığı tayini

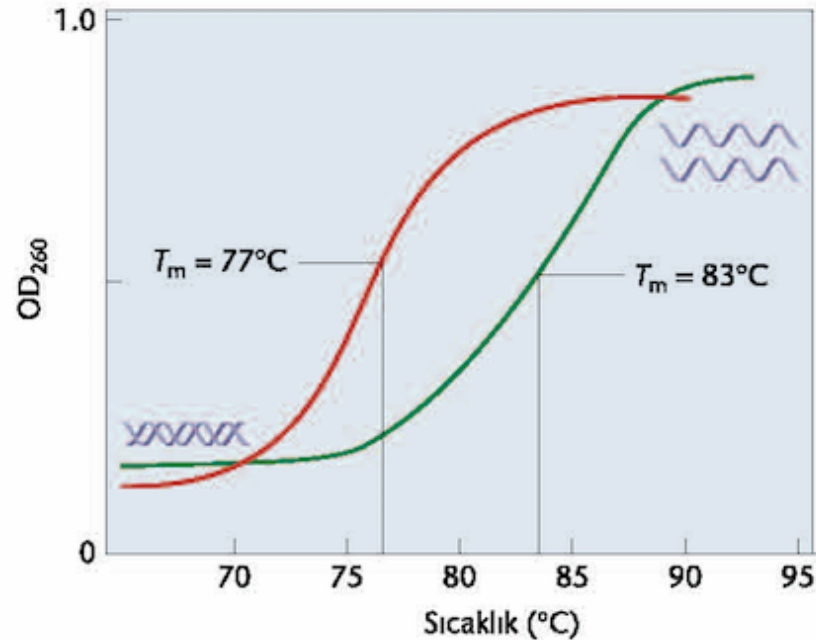
- Çökeltme yöntemi moleköl ağırlığının (MW) tayininde kullanılabilir.
- Çalışılan molekölün bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri biliniyorsa, çökeltme hızından moleköl ağırlığı hesaplanabilir.

Nükleik asitlerin denatürasyonu ve renatürasyonu

- İkili sarmal DNA'nın denatürasyonu sonucu hidrojen bağları kopar.
- Zincirlerin ayrılması sırasında DNA'nın akışkanlığı azalır, UV absorpsiyonu ve denge yoğunluğu artar.
- Isı sonucu oluşan denatürasyona bazen erime (melting) denir.

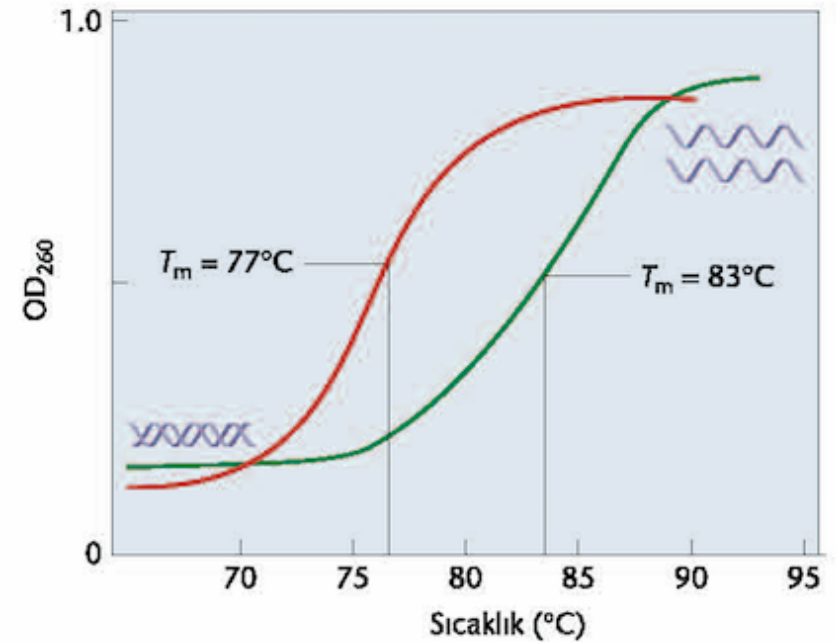
Hiperkromik kayma

- Isıtılan DNA çözeltisinin UV absorpsiyonundaki artış, hiperkromik kayma olarak adlandırılır ve ölçümü çok kolaydır.



Erime profili

- Erime sırasında, DNA'nın 260 nm'deki absorpsiyonu (OD_{260}) izlenir ve sıcaklığa karşı grafiğe geçirilse, DNA'nın erime profili elde edilir.
- Bu profilin ya da eğrinin orta noktasına erime sıcaklığı (T_m) denir ve DNA zincirinin %50'sinin açılmış ya da denature olduğu noktayı gösterir.



Renatürasyon

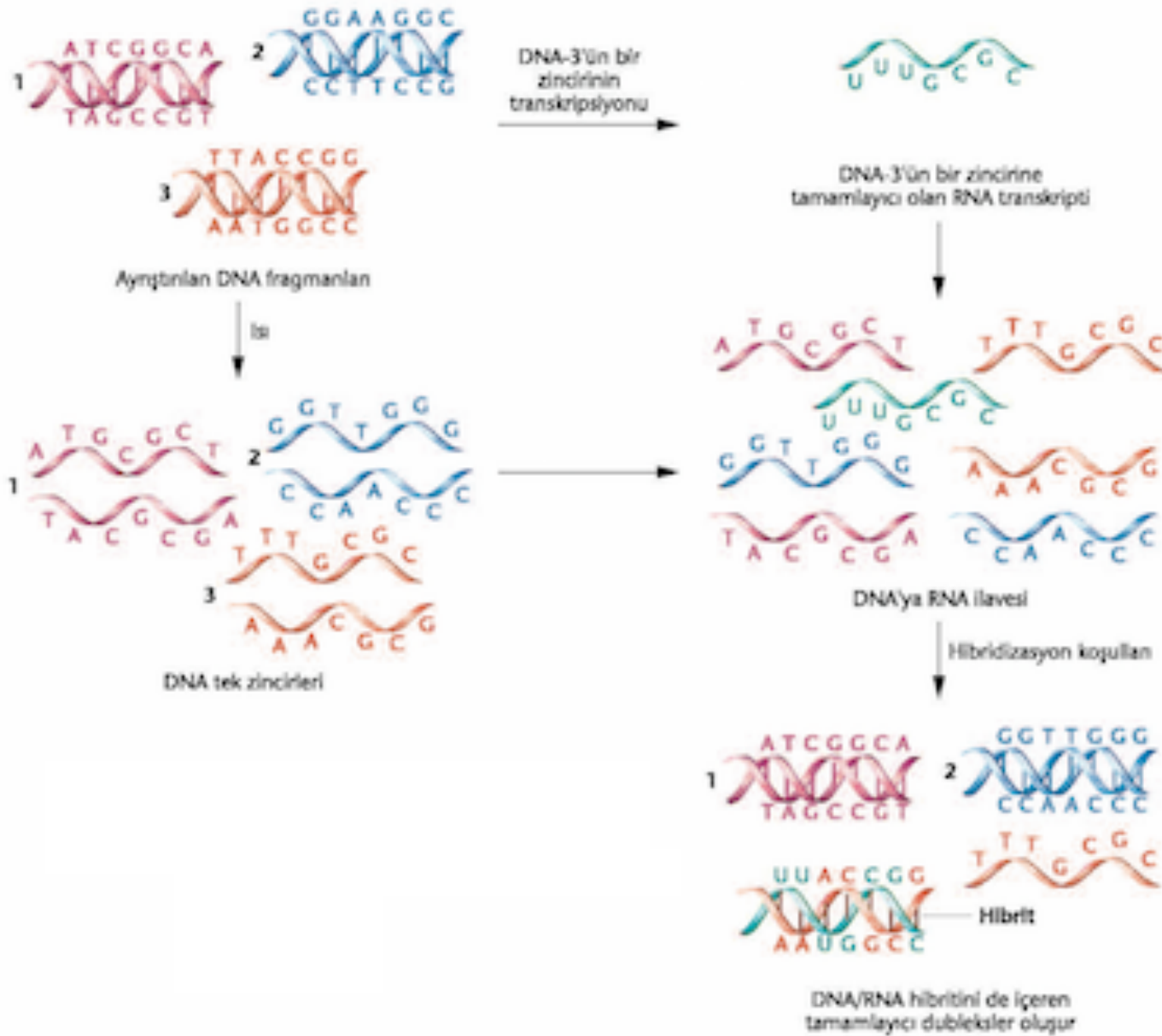
- Isı ile denatüre edilen DNA yavaşça soğutulursa, tamamlayıcı zincirler arasındaki rastgele çarpışmalar sonucu zincirler tekrar bir araya gelir.
- Uygun sıcaklıkta, zincirlerin ikili yapısını kazanmasını sağlayacak şekilde hidrojen bağları tekrar kurulur.
- Soğuma zamanıyla birlikte oluşan dublekslerin (ikili sarmal) sayısı artacaktır.

Moleküler hibridizasyon (melezleme)

- Tekrar bir araya gelen tek zincirler, aynı nükleik asitten kaynaklanmak zorunda değildir.
- Örneğin, DNA zincirleri iki farklı organizmaya ait ise ve aralarında bir miktar baz tamamlayıcılığı bulunuyorsa, renatürasyon sırasında çift zincirli moleküler hibritler oluşur.

Moleküler hibridizasyon (melezleme)

- Bir sonraki slaytta, DNA ve bu DNA'dan sentezlenmiş RNA'nın birlikte bulunduğu durum verilmiştir.
- RNA, tamamlayıcısı olduğu tek zincirli DNA'yı bulup onunla birleşecektir.
- Böylelikle DNA:RNA ikilisi oluşacak şekilde moleküler hibridizasyon gerçekleşir.



DNA blotlama

- Hibridizasyon, çözelti içinde ya da DNA'nın bir jele veya bir çeşit özel filtreye bağlı olduğu durumda gerçekteşebilir.
- Bu tip filtreler çeşitli DNA blotlama işlemlerinde kullanılır ve bu şekilde hibridizasyon, tamamlayıcı nükleik asit dizileri için prob görevi yapar.

Mikroarray analizi

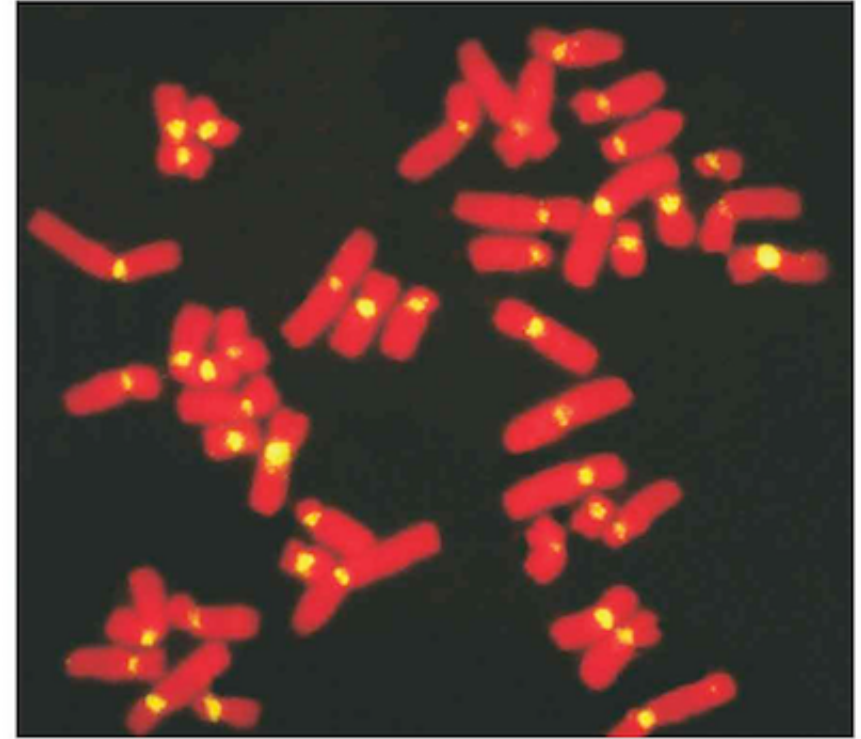
- Belirli bir DNA dizisi için klonlanmış binlerce genin tek bir analizde bütünüyle taranmasını sağlar.

Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH)

- Sitolojik preparatlarda bulunan DNA'nın, hibrit oluşumu için hedef olarak kullanılmasıdır.
- Bu yaklaşım, hibridizasyonu izlemek için floresan problr ile birlikte kullanıldığında, floresan *in situ* (hücre içi) hibridizasyon yöntemi ya da kısaca baş harflerinden oluşan FISH adını alır.

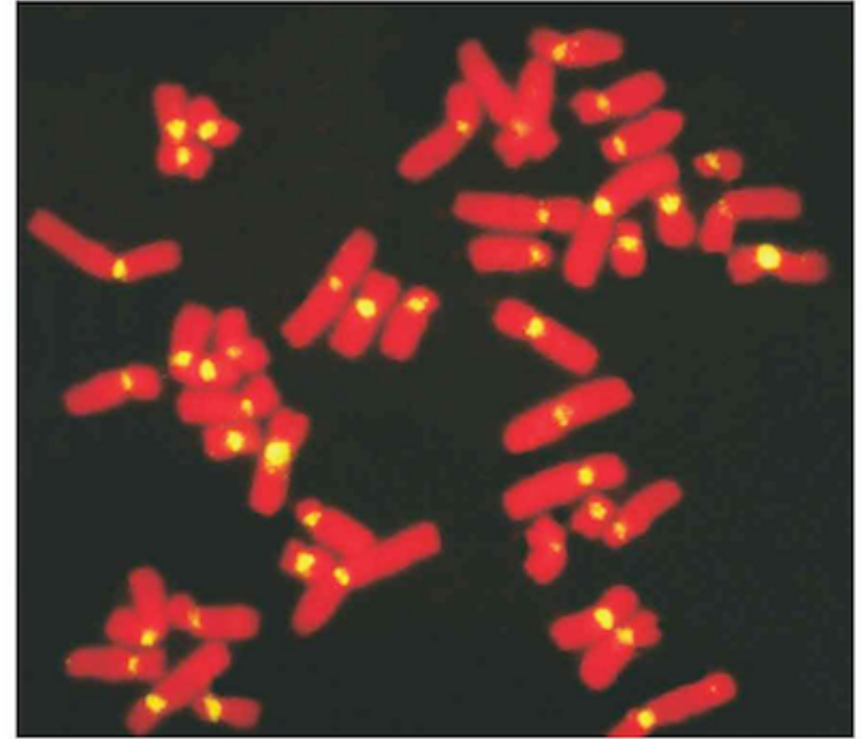
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH)

- Floresan tekniği (FISH) kullanarak, insan metafaz kromozomlarının *in situ* hibridizasyonu yandaki şekilde verilmiştir.
- Sentromerik DNA'ya özgül olan prob, hibridizasyonun varlığını sarı floresan sinyali şeklinde ışığa ile göstermektedir.
- Kromozomal DNA'nın propidium iyodür ile zıt boyanması, kırmızı floresansı (ışımayı) sağlamaktadır.



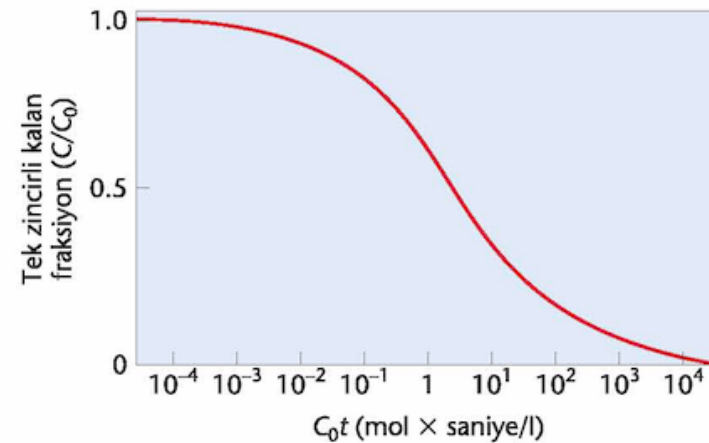
Floresan *in situ* hibridizasyon (FISH)

- İnsan kromozomlarının sentromerlerine özgül DNA'nın tanımlanmasında FISH'in kullanımı gösterilmektedir.
- FISH tüm kromozom setinin içinde tek bir geni saptayacak kadar hassastır.
- Özgül genetik bilgilere ev sahipliği yapan kromozomal bölgelerin tanımlanmasında kullanılır.



Reasosiyasyon Kinetiği ve Tekrarlayan DNA

- Tek bir kaynaktan elde edilen tamamlayıcı DNA ipliklerinin, tekrar bir araya gelme (reasosiyasyon) hızının ölçümü, moleküler hibridizasyon yönteminin bir uzantısıdır.
- Reasosiyasyon kinetiği olarak bilinir.

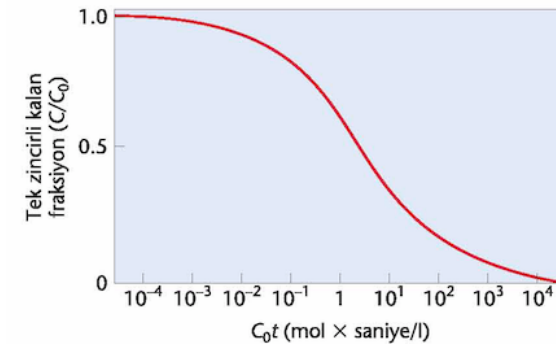


Reasosiyasyon Kinetiği ve Tekrarlayan DNA

- Birleşme sırasında, tek iplikli DNA'lar rastgele birbirlerine çarparlar.
- Eğer DNA'lar birbirinin tamamlayıcısı ise, kararlı ikili sarmal zincir oluşur.
- Tamamlayıcı değilse, tek iplikli DNA'lar başka DNA fragmanlarıyla karşılaşmak üzere serbest kalır.
- Bütün eşleşmeler tamamlanana kadar işlem devam eder.

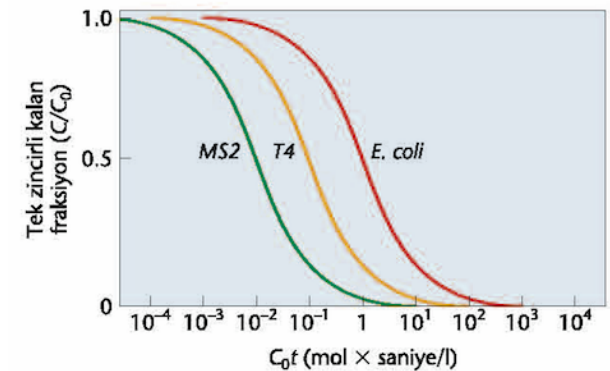
Reasosiyasyon Kinetiği ve Tekrarlayan DNA

- DNA parçalarının reasosiyasyon yüzdesi, logaritmik skalada, ürünlerin C_0 'larına ve t 'ye karşı grafiğe geçirilir.
- C_0 : Tek zincirli DNA'nın başlangıçtaki konsantrasyonunun bir litre nükleotiddeki mol cinsinden değeridir.
- t : Genelde dakika olarak verilen zamandır.



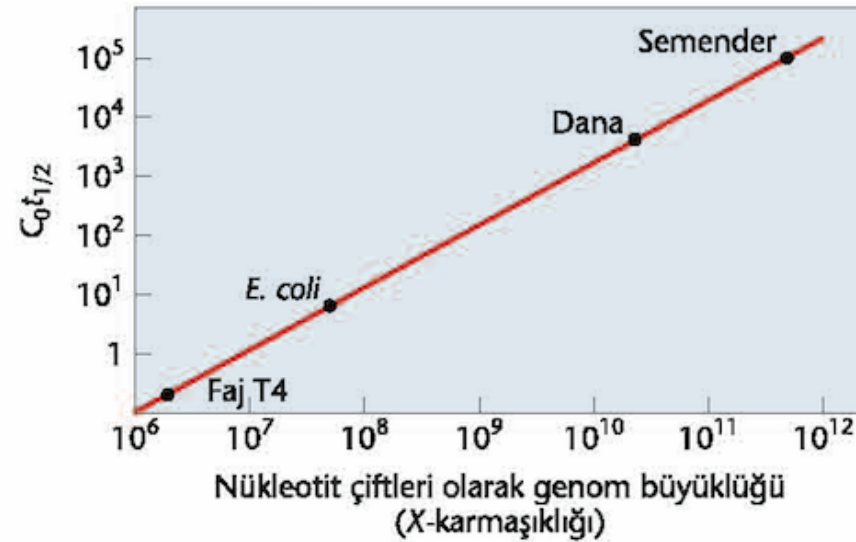
Artan reasiasyon zamanı

- Her biri farklı genom büyüklüğüne sahip, iki bakteriyofaj ya da tek bakteriyel kaynağa ait DNA'lar karşılaştırılmaktadır.
- Görülebildiği gibi, genom büyüklüğü arttıkça, elde edilen eğriler gittikçe sağa kaymaktadır.
- Bu da, artan reasosiyasyon zamanı demektir.



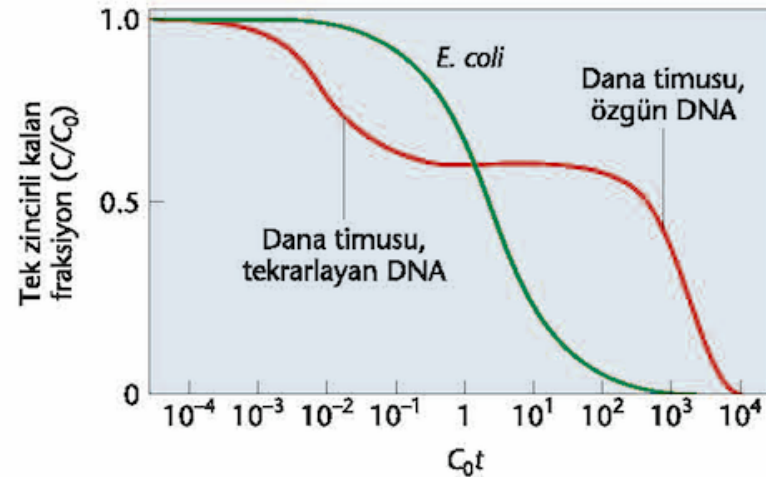
Büyük genomda reasiasyon karşılaştırması

- Daha büyük genomlarda, reasosiyasyon düşük hızda meydana gelir, çünkü özgün DNA dizilerinin sayısı fazla ise, ilk eşleşmeler daha uzun zaman alır.



Tekrarlanan DNA dizileri

- Dana genomunda görülen hızlı birleşen kısımlar, tekrarlanan DNA dizileri içermektedir.
- Bu yorum, bu DNA kısımlarının neden hızlı birleştiğini açıklamaktadır.



Tekrarlanan DNA dizileri

- Aynı dizinin çoklu kopyalarının eşleşmeler yapması çok daha olasıdır, böylece tek kopyası bulunan dizilere göre bunlar daha hızlı reasosiyasyon olur.
- Özgün DNA dizilerinin sayısı daha fazla olduğu için, dana timus DNA'sı, E. coli'ye göre daha kompleks ve tekrar birleşmesi daha uzun zaman alır.

Nükleik asitlerin elektroforezi

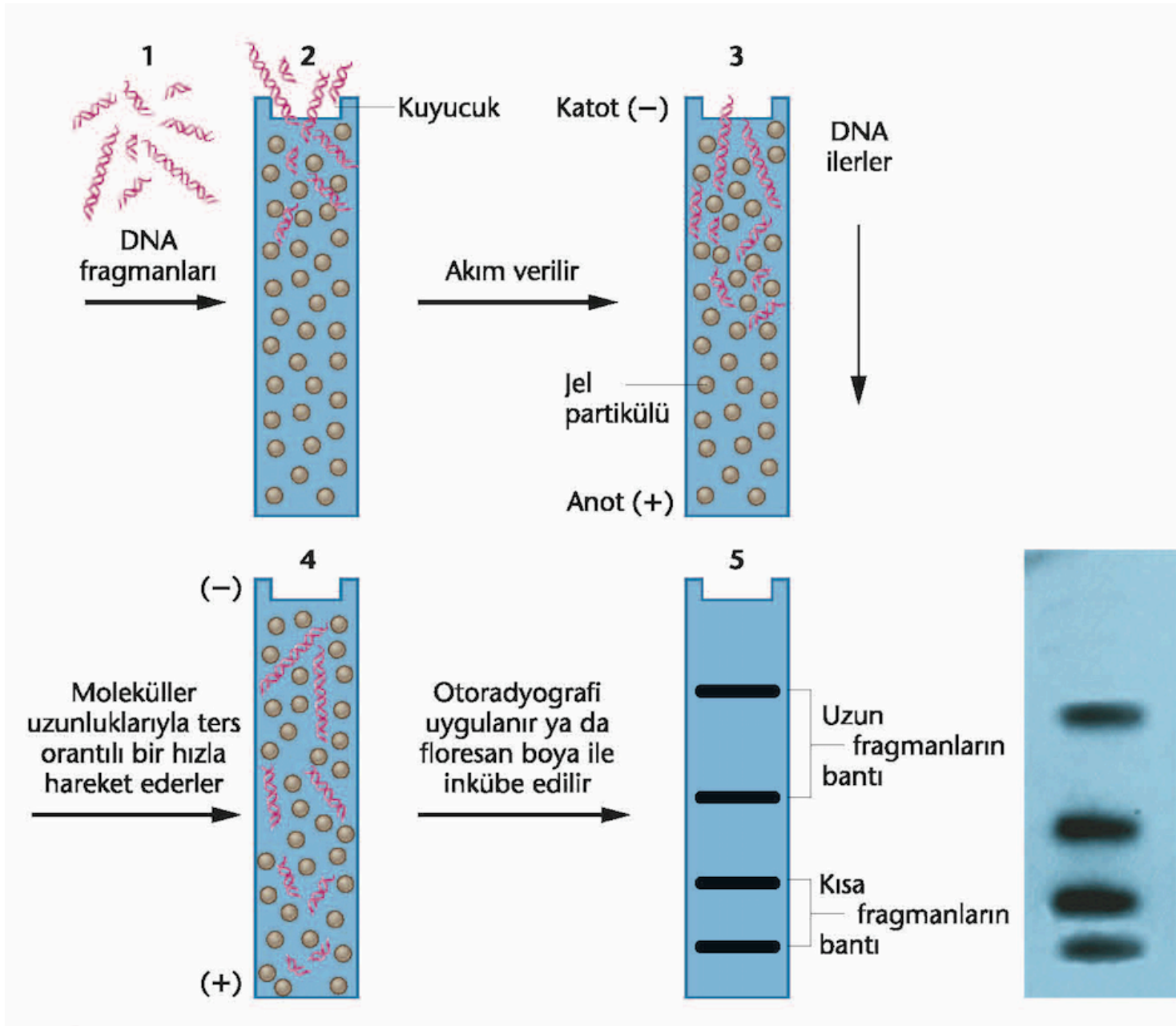
- Bu bölümü, nükleik asitlerin incelenmesinde yetkin bir teknik olan elektroforez ile bitireceğiz.
- Bu teknikle, farklı uzunluklardaki DNA ve RNA zincirlerine ait parçalar birbirinden ayrılabilir.

Nükleik asitlerin elektroforezi

- Elektroforez teknolojisi özellikle, aynı yük:kütle oranına sahip, ancak farklı boyutlardaki molekül karışımlarının ayrıştırılmasında işe yaramıştır.
- Poliakrilamit ya da agaroz jel gibi çeşitli gözenek boyutlarında hazırlanan ortamların kullanımı ile bu iki molekül birbirinden ayrılabilir.

Nükleik asitlerin elektroforezi

- Küçük moleküller büyük moleküllere göre jelde daha hızlı yol alır.
- Ayrımın kilit noktası jel matriksine (gözeneklere) dayanmaktadır.
- Ayrıntılar için bir sonraki slayta bakınız.



TEŐEKKÜRLER

Bu sunumun hazırlanmasındaki katkılarından dolayı aşağıda isimleri verilen öğrencilerime teŐekkür ederim.

NURŐEN KARDEŐLER

DERYA AKÇIÇEK

RUKEN ERTÜRK

ÖZLEM GENÇ

BAHAR KARTAL