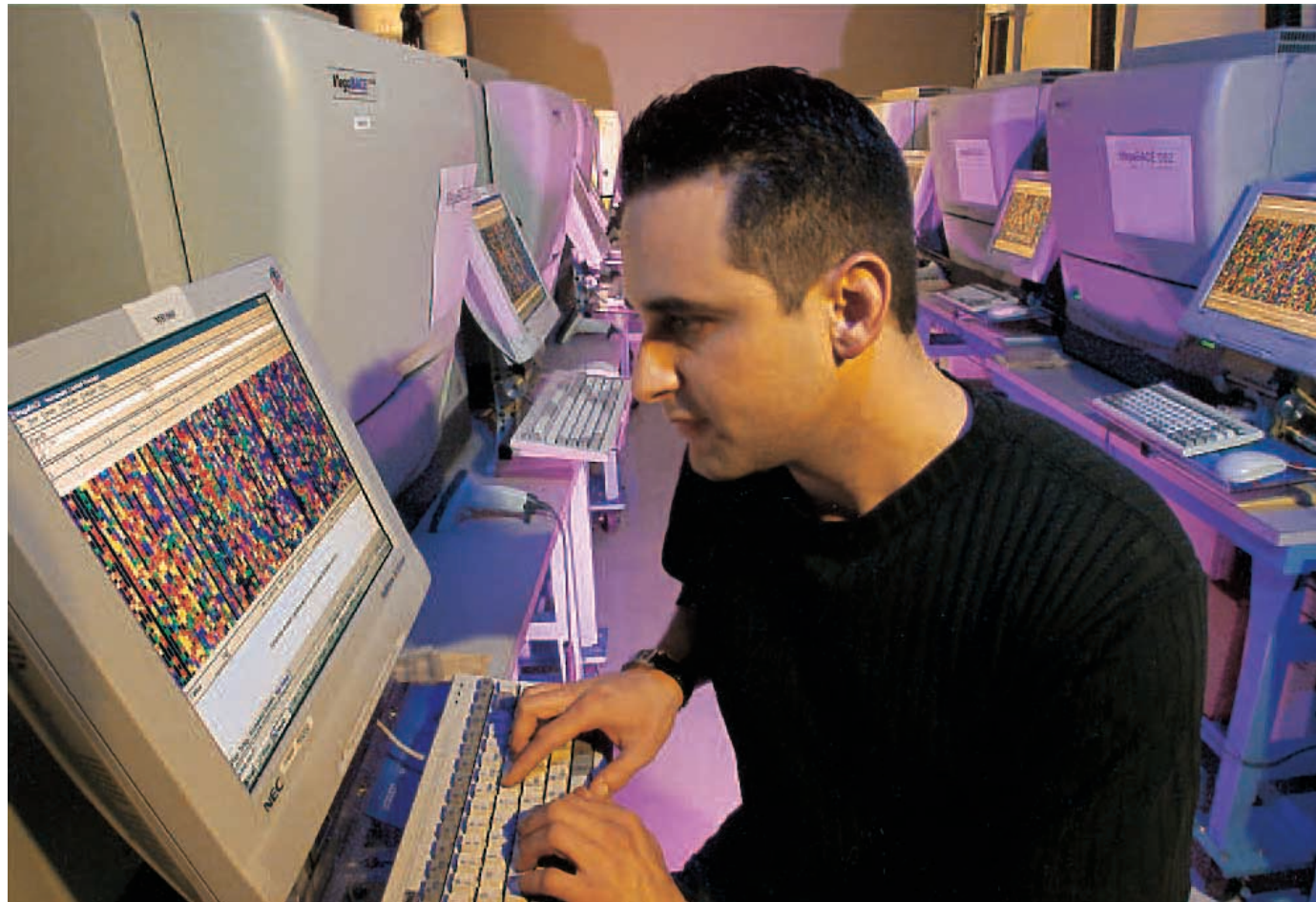


# DNA TEKNOLOJİSİ VE GENOMİK



# Gen klonlama nedir?

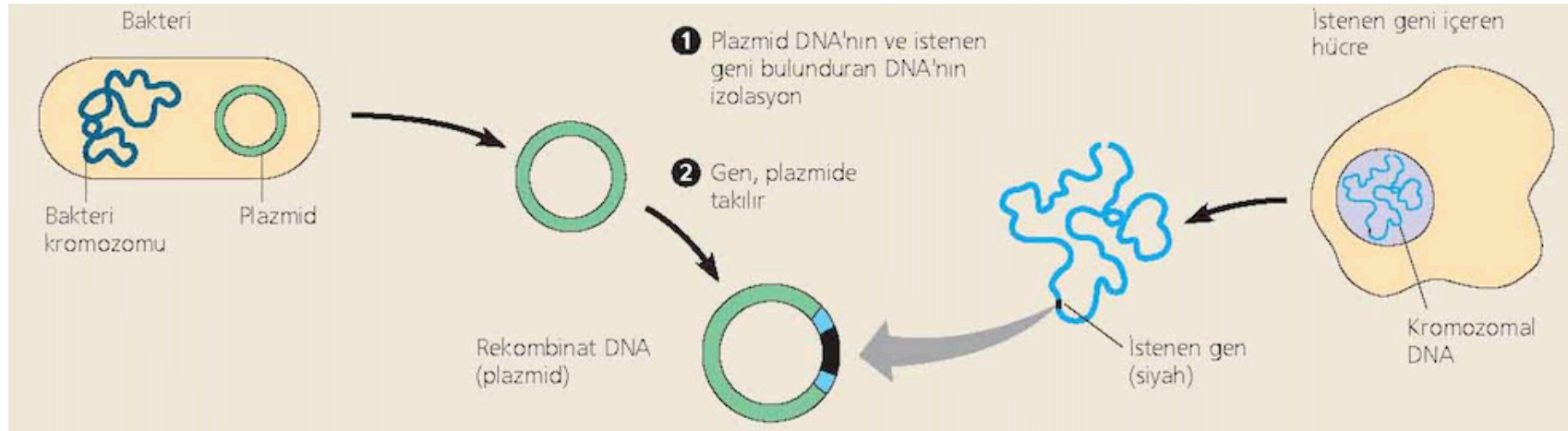
- Ökaryotlarda genler kromozomların çok küçük bir kısmını oluştururlar.
- Geri kalan kısım, kodlama yapmayan dizilerden meydana gelmektedir.
- Örneğin bir insan geni, kromozomal DNA'nın ortalama olarak 100.000'de 1'i kadardır.

# Gen klonlama nedir?

- Genom içinde özgöl bir gen üzerinde çalışma yapabilmek için, o genin çok sayıda benzer kopyasını elde etmek gerekir.
- Bu işleme gen klonlama adı verilir.

# Gen klonlamasının temel basamakları

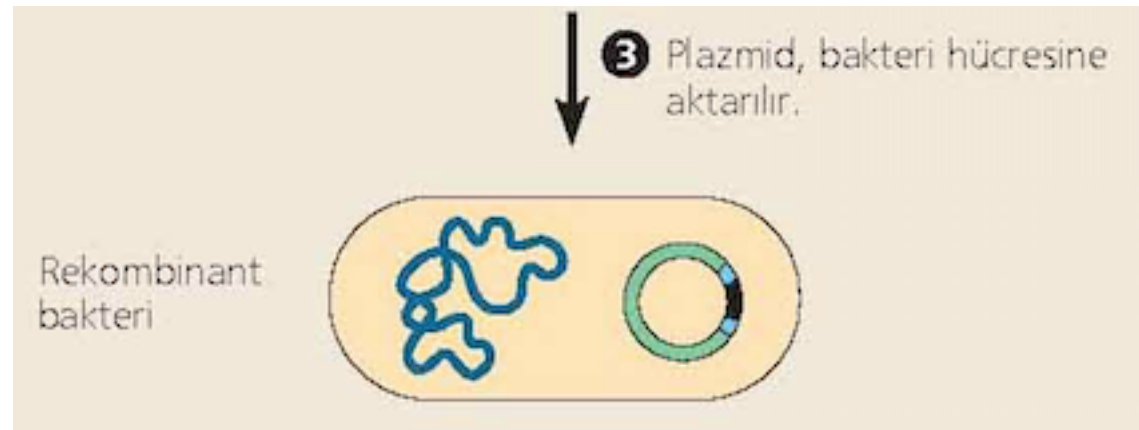
- Genlerin ya da diğer DNA parçalarının klonlanabilmesi için öncelikle plazmitler bakteri hücrelerinden izole edilir.
- Yabancı DNA, plazmit içine yerleştirilir.





## Gen klonlamasının temel basamakları

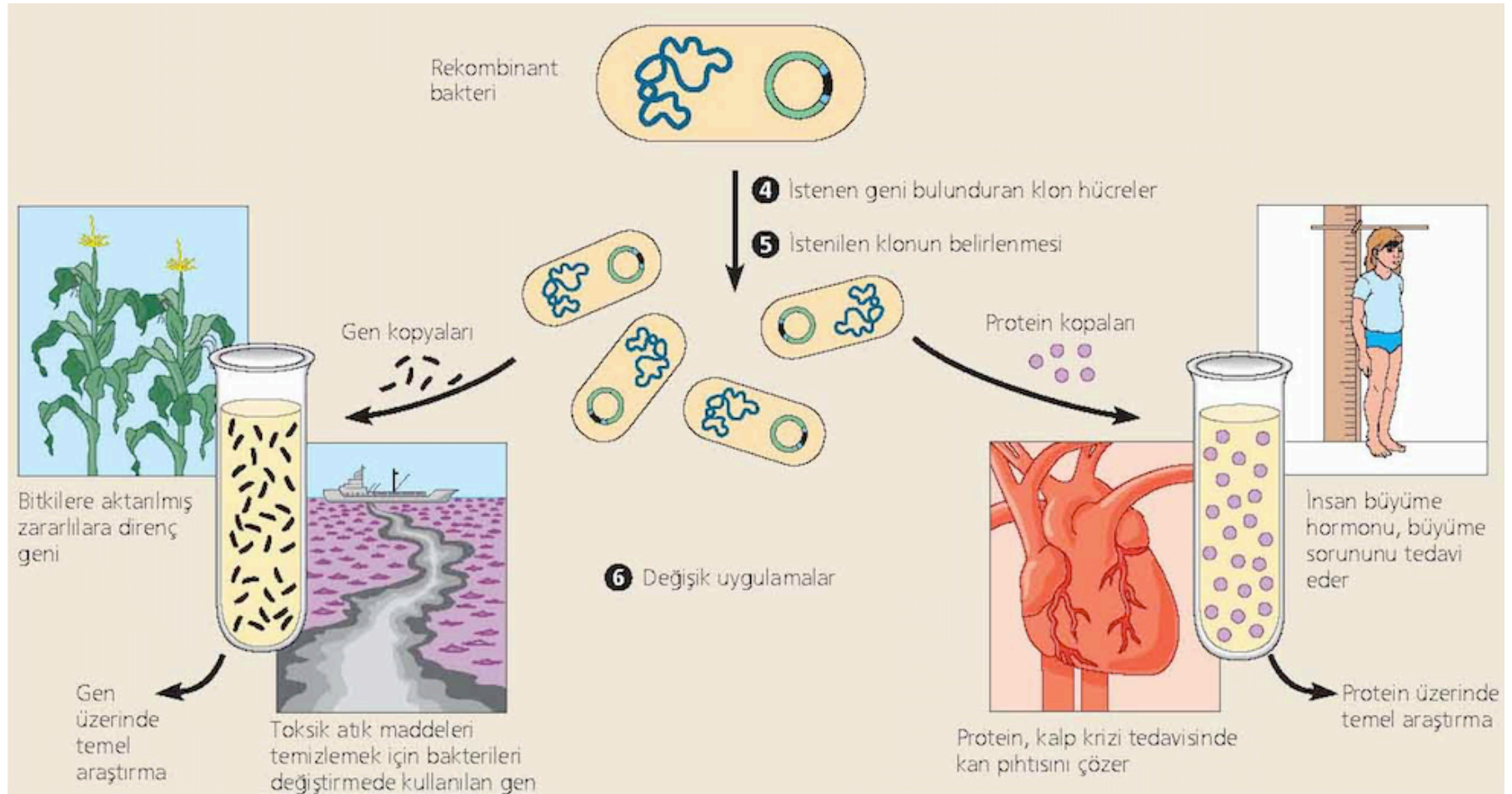
- Bu durumda plazmit DNA'sı yeni bir DNA parçası taşıdığından dolayı rekombinant hale gelmiş olur.
- Plazmit, bakteri hücrelerine geri aktarılır.



# Gen klonlamasının temel basamakları

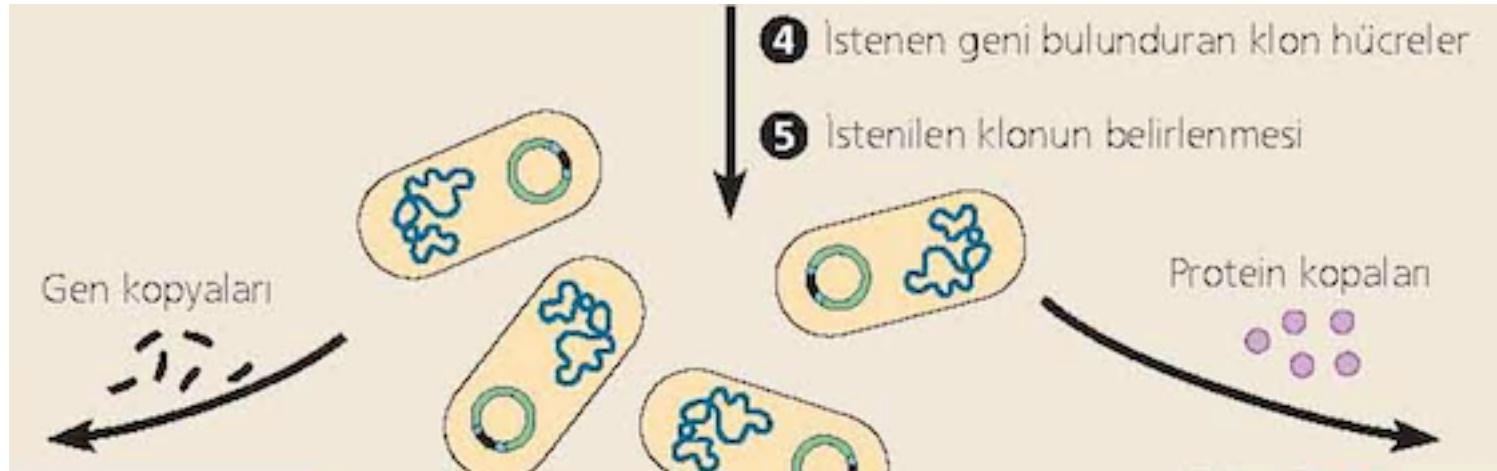
- Bakteri çoğaldıkça plazmit de çoğalarak ilgili genin klonlarını oluşturacaktır.
- Elde edilen bakteriyel klon, yabancı gen tarafından kodlanan proteini üretecektir.

# Gen klonlamasının temel basamakları



## Klonlanan genleri hangi amaçlarla kullanırız?

- İlgili genin protein ürününü elde etmek (örneğin; insülin ya da büyüme hormonu),
- Genin kendisinin çok sayıda kopyasını oluşturmak



# Restriksiyon enzimler

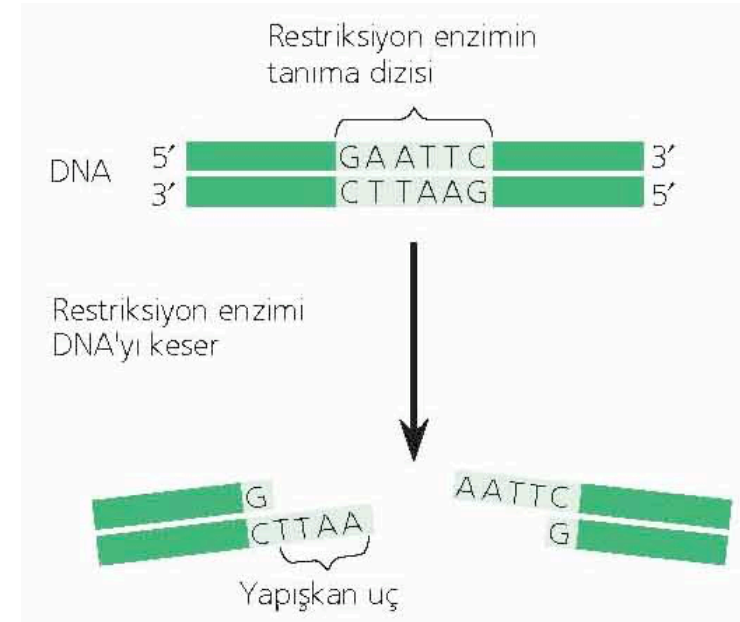
- Restriksiyon enzimlerin keşfiyle birlikte genleri klonlamak mümkün hale gelmiştir.
- Bu enzimler, bakterileri, yabancı mikroorganizmaların genetik materyaline karşı korumaktadır.
- DNA üzerindeki kısa nükleotit dizilerini tanır ve bu diziler içindeki özgül nükleotitlerden kesme işlemi gerçekleştirirler.

## Peki, bakteri kendi DNA'sını nasıl korur?

- Bakteri, restriksiyon enzimler yoluyla yabancı DNA ile mücadele ederken, kendi genlerini kesim işleminden koruyabilir.
- Bunun için kendi DNA'sında enzimin tanıma bölgelerinde yer alan A veya C nükleotitlerine metil (-CH<sub>3</sub>) grupları ekler.

# Restriksiyon bölgesi

- Pekçok restriksiyon bölgesi simetrik tir.
- Her iki zincirde de 4-8 nükleotitten oluşan anti-paralel bir dizidir.
- Enzim, her iki zincirdeki kovalent fosfodiester bağlarını da keser.





# Restriksiyon bölgesi

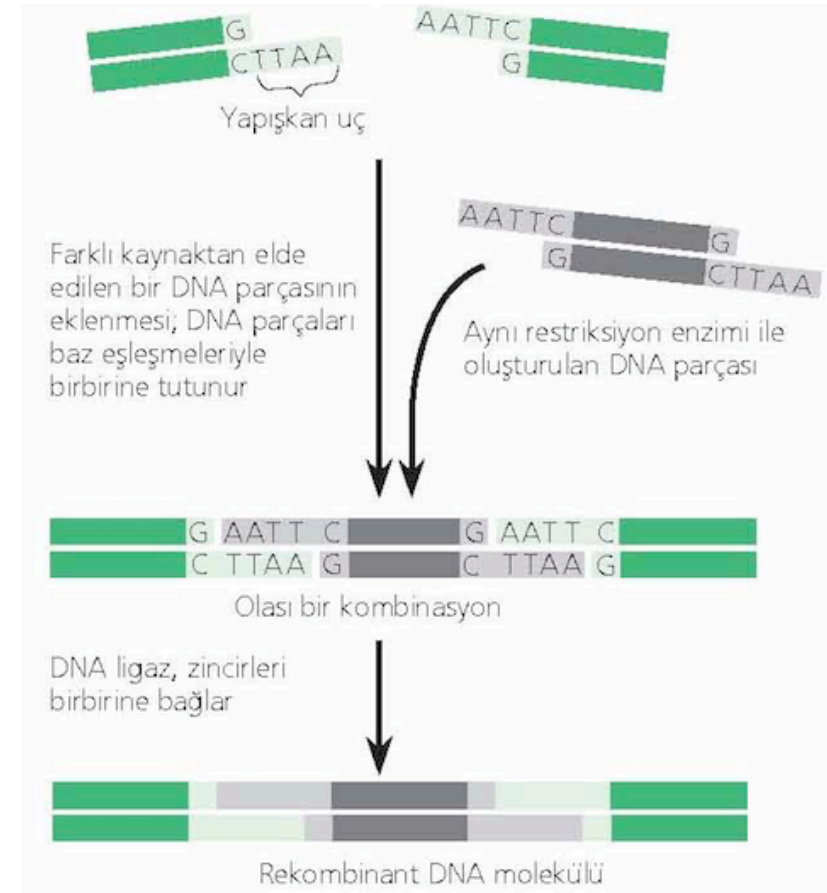
- DNA zinciri boyunca enzimin kesim bölgesinden çok sayıda bulunacağından, çok sayıda kesim gerçekleştirilir.
- Dolayısıyla çok sayıda DNA fragmenti oluşur.

# Restriksiyon fragment seti

- Aynı DNA molekülünün kopyaları, aynı enzim ile kesildiğinde, aynı restriksiyon fragment setini oluşturacaktır.

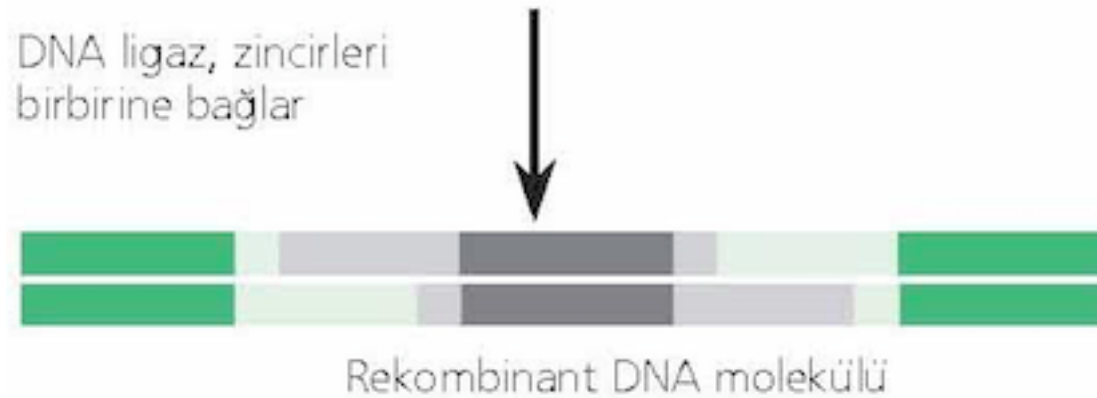
# Yapışkan uç

- Kesim sonucunda küt uçlar meydana gelebileceği gibi, yapışkan uç adı verilen, en az bir adet tek zincirli uç çıkıntısına sahip çift zincirli DNA fragmentleri de oluşur.
- Bu kısa çıkıntılar, aynı enzimle kesilmiş diğer DNA molekülleri üzerindeki komplementer tek zincirli dizilerle baz eşleşmeleri yapar.



# Ligaz

- Bir önceki slaytta anlatılan baz eşleşmelerinde hidrojen bağı kullanıldığından, bu birliktelik geçicidir.
- DNA ligaz, fosfodiester bağı oluşumunu katalizleyerek zincirleri birleştirir.

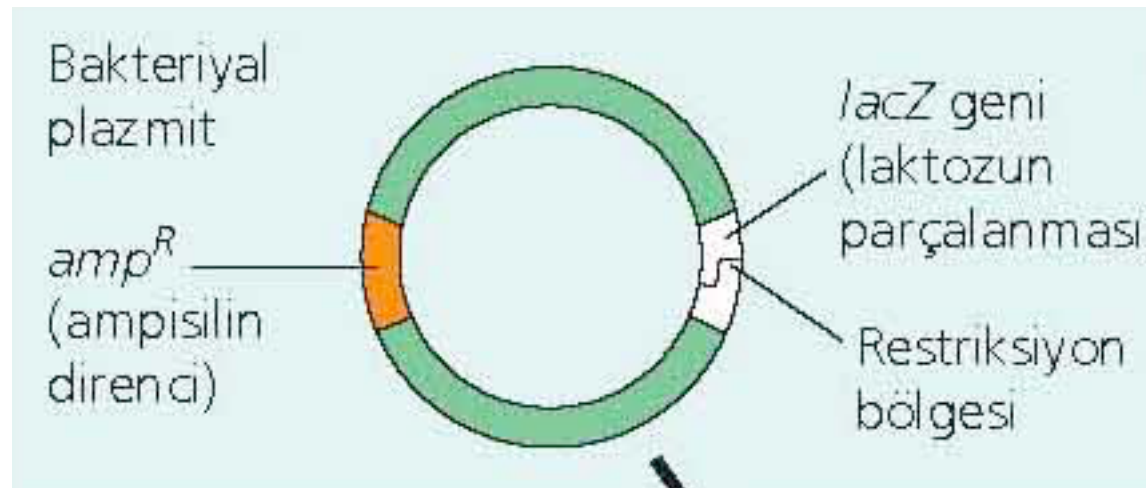


## Yabancı bir genin plazmite aktarılması (temel basamaklar)

- 1. Vektör ve yabancı DNA'nın izolasyonu
- 2. DNA'nın vektöre aktarılması
- 3. Klonlama vektörünün hücrelere aktarılması
- 4. Hücrelerin klonlanması
- 5. İstenen geni taşıyan hücre klonlarının seçimi

# 1. Vektör ve yabancı DNA'nın izolasyonu

- Öncelikle *E. coli*'den plazmit izolasyonu gerçekleştirilir.
- Plazmit üzerinde bazı marker genler bulunmaktadır:
  - $amp^R$ : Ampisilin'e dirençlilik sağlar.
  - $lacZ$ : Laktozu metabolize eden  $\beta$ -galaktosidaz'ı kodlar.



# 1. Vektör ve yabancı DNA'nın izolasyonu

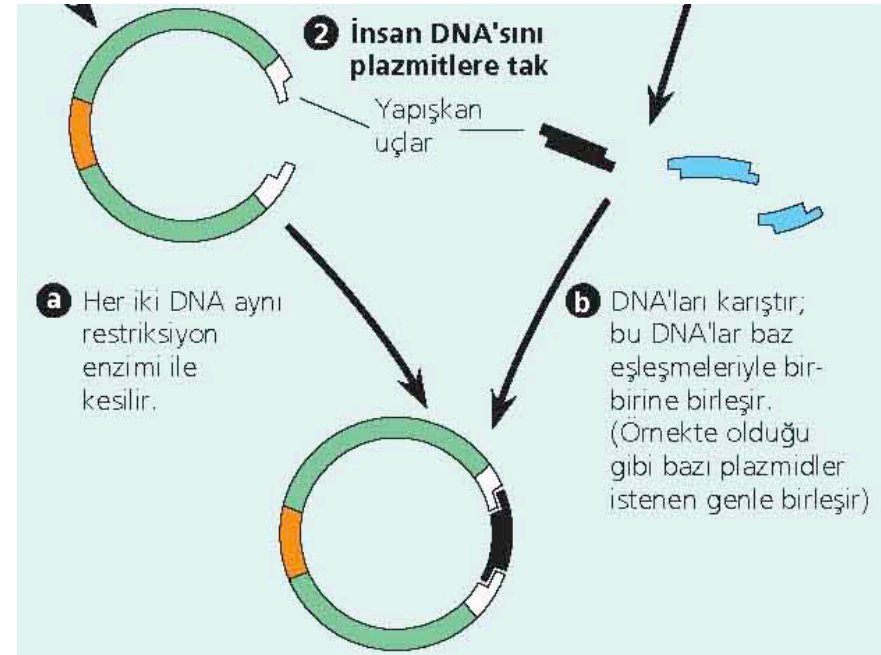
- Marker genler, klonlama işleminin başarısının doğrulanması aşamasında kullanılacaktır.
- Plazmit, kullanılan restriksiyon enzimi için lacZ geni içerisinde bir tanıma dizisine sahiptir.
- Plazmit izolasyonuna ilave olarak, aktarılmak istenen gen de diğer kaynaktan kesilerek izole edilir.





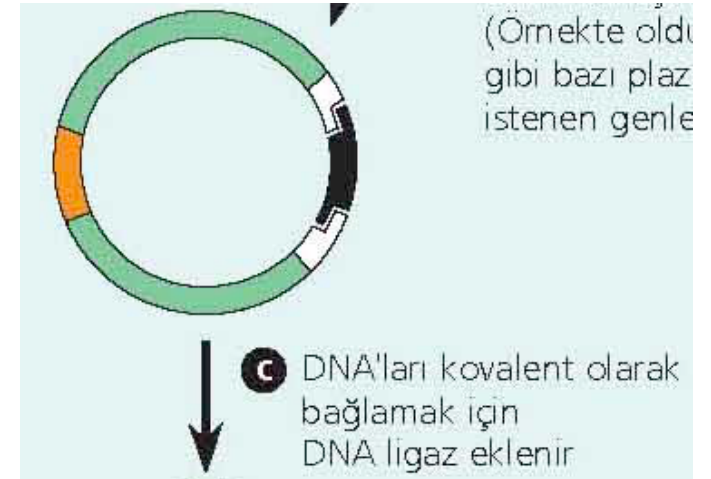
## 2. DNA'nın vektöre aktarılması

- Hem plazmit hem de yabancı DNA aynı restriksiyon enzimle kesilir.
- Enzim, plazmit DNA'yı lacZ geni içerisindeki bölgeden keserek bu genin yapısal bütünlüğünü bozar.
- Daha sonra yabancı DNA fragmentleri ile plazmit karıştırılır.



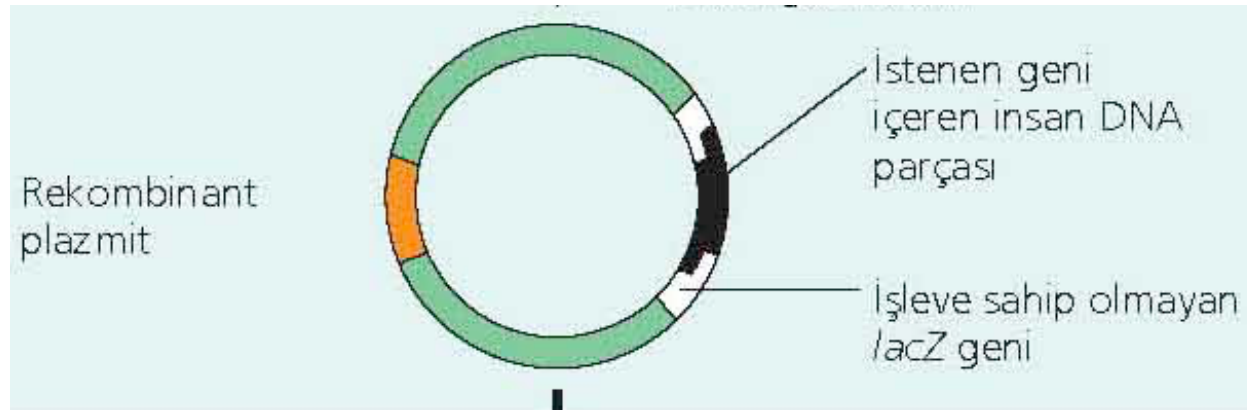
## 2. DNA'nın vektöre aktarılması

- Plazmitin yapışkan uçları ile yabancı DNA'nın yapışkan uçları baz çiftleri oluşturur.
- DNA moleküllerini kovalent bağ ile birleştirmek için DNA ligaz kullanılır.
- Sonuçta rekombinant (yeni bir kompozisyona sahip) bir plazmit molekülü oluşur.



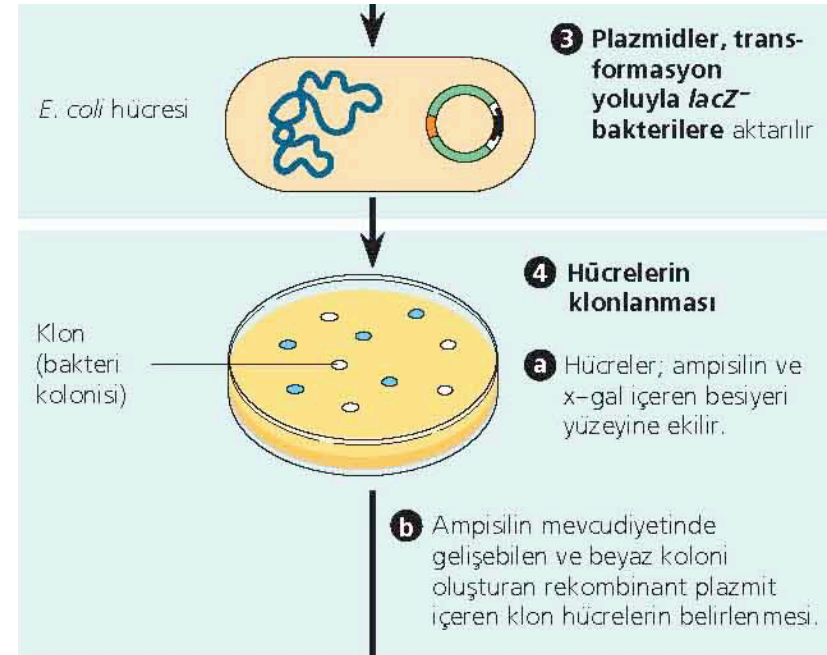
### 3. Klonlama vektörünün hücrelere aktarılması

- Bakteri hücreleri, transformasyonla rekombinant plazmitleri içeri alır.
- Rekombinant plazmit taşıyan bakteri artık lacZ- olup, bu genin yapısal bütünlüğünün bozulmasından dolayı laktozu parçalayamaz.



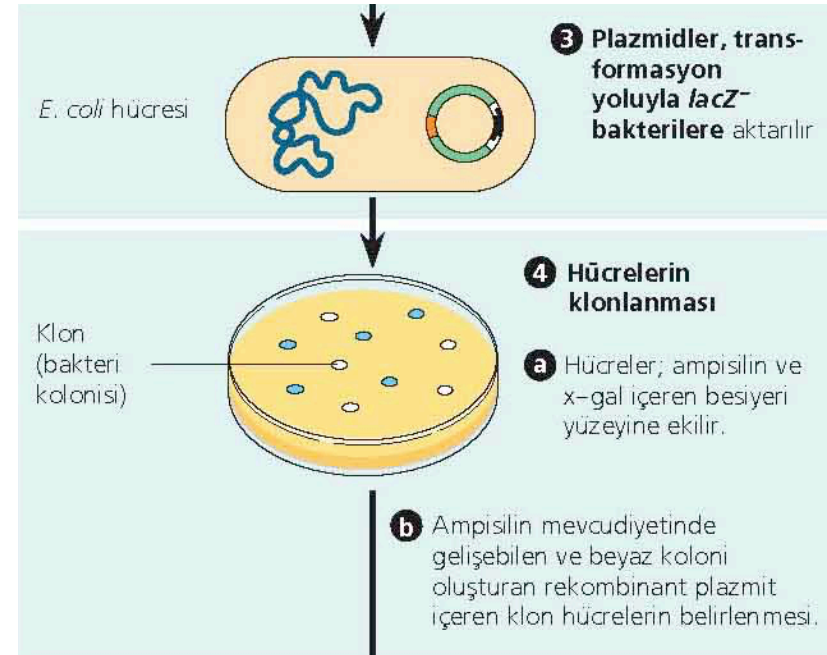
## 4. Hücrelerin klonlanması

- Transforme edilen bakteriler, ampisilin ve X-gal adlı şeker bulunan kati besiyerine ekilir.
- Çoğalan her bakteri, besiyerinde koloni olarak görülen bir hücre klonu oluşturur.
- Besiyerinde bulunan ampisilin, yalnızca plazmit içeren (plazmitler amp<sup>R</sup> geni taşıdığından) hücrelerin çoğalmasına izin verir.



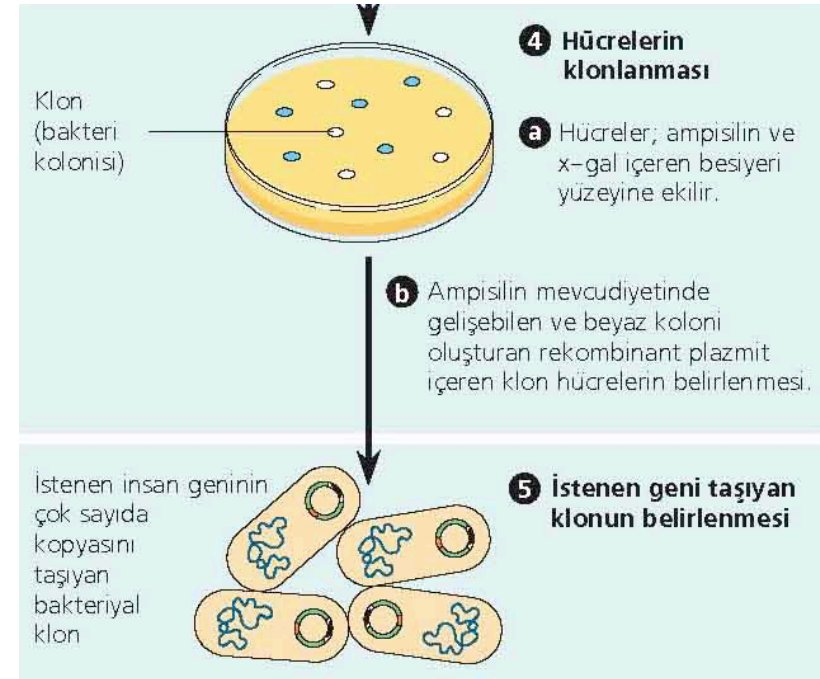
## 4. Hücrelerin klonlanması

- X-gal ise, yalnızca yabancı DNA'yı taşıyan plazmitlere sahip bakterilerin seçimini kolaylaştırır.
- İşlevsel lacZ geninin ürünü olan  $\beta$ -galaktosidaz enzimi, X-gal'i hidroliz ederek mavi renkli bir ürün meydana getirir.



## 4. Hücrelerin klonlanması

- Ancal lacZ geninin içine yabancı DNA yerleştirme işlemi başarılı olmuşsa, bu durumda lacZ geni çalışmayacak ve  $\beta$ -galaktosidaz enzimi üretemeyecektir.
- Bu durumda X-gal parçalanamayacak ve mavi renk oluşmayacaktır (renk beyaz kalır).



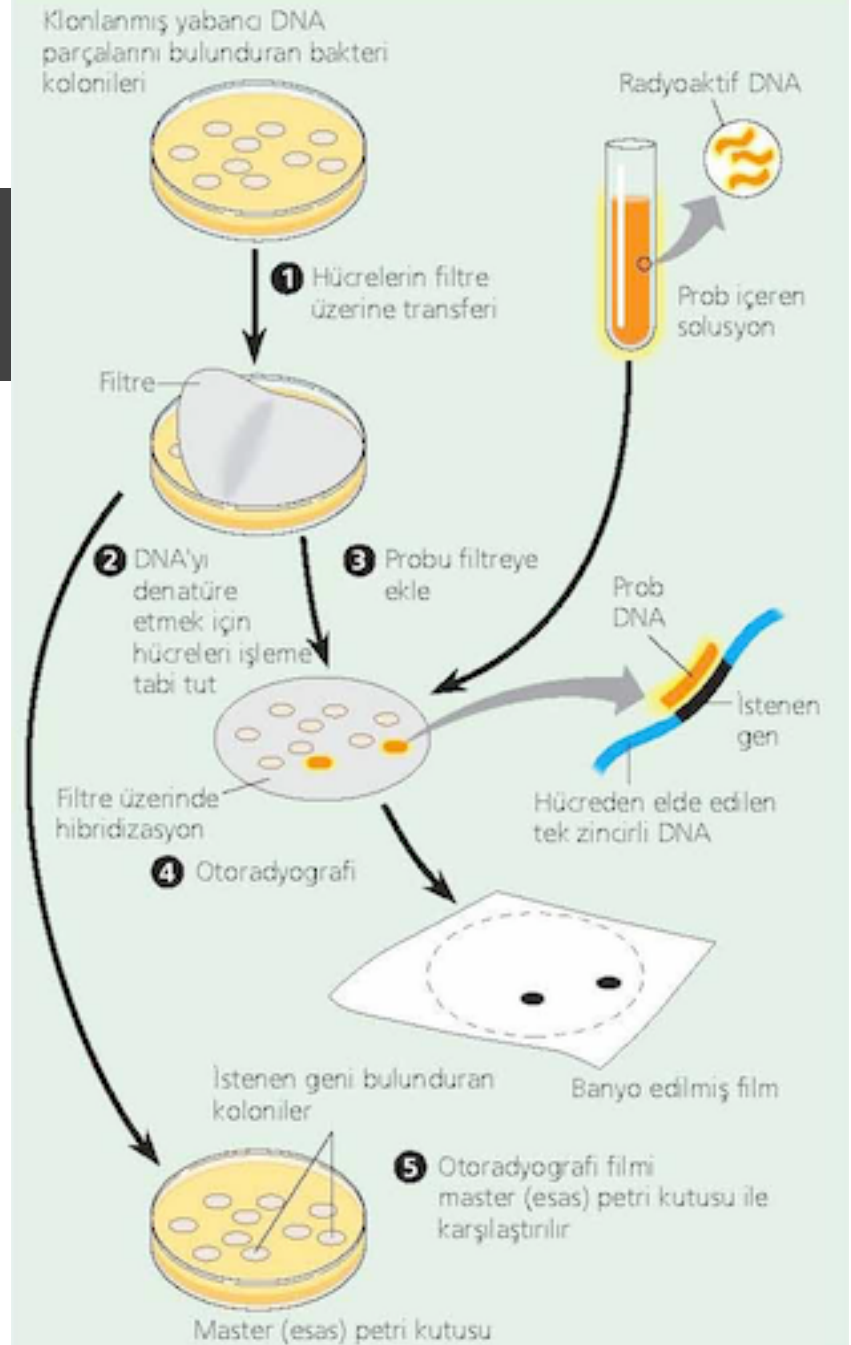
## 5. İstenen geni taşıyan hücre klonlarının seçimi

- Başlangıç basamağında yabancı DNA'nın restriksiyon enzimi ile kesimi sırasında çok sayıda fragment meydana gelecektir.
- İstenilen geni içeren fragment plazmite aktarılabildiği gibi, diğer fragmentler de aktarılmış olabilir.
- Bu aşamada en önemli işlem, istenilen DNA parçasını bulunduran plazmitleri taşıyan bakteri kolonisinin diğerlerinden ayrıt edilmesidir.



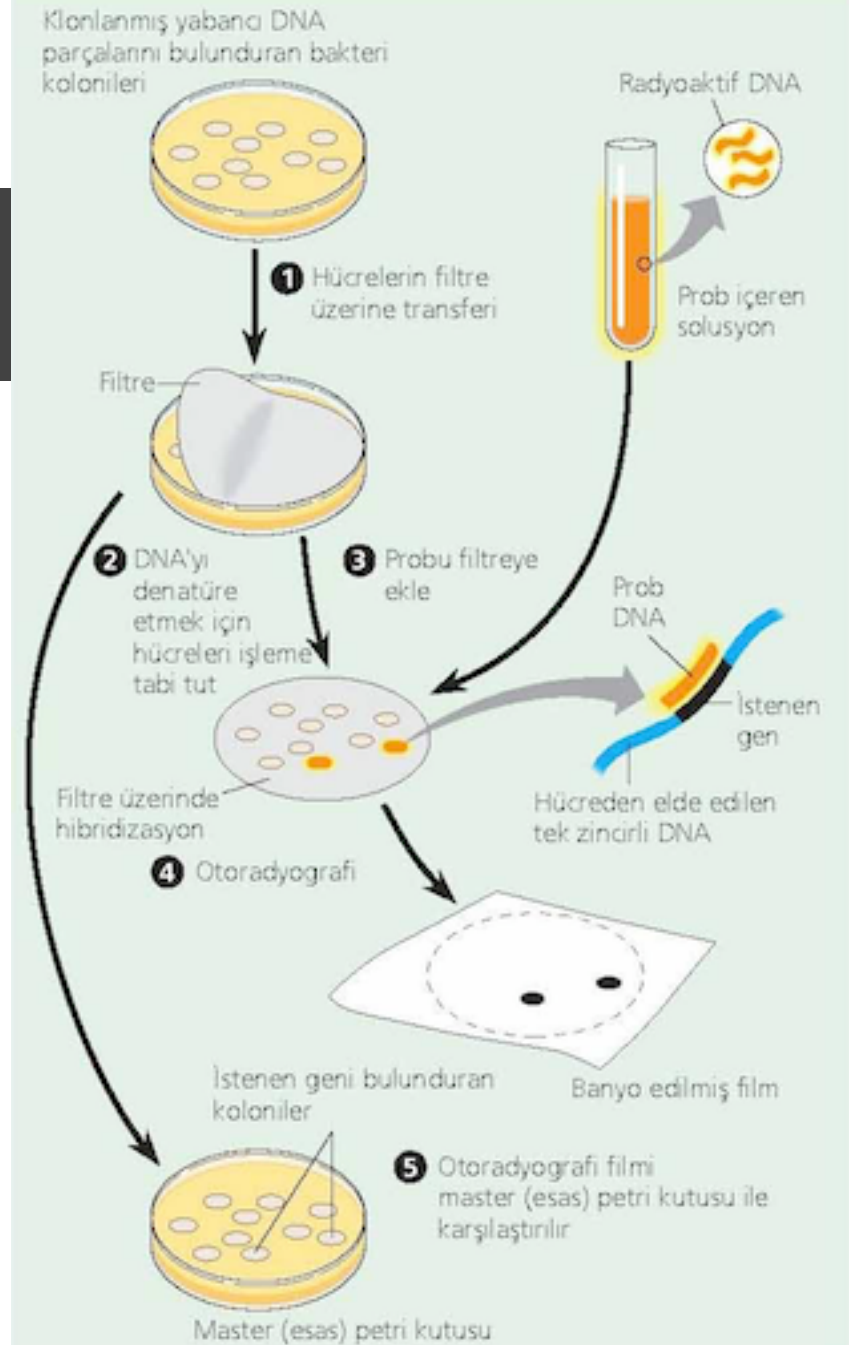
## 5. İstenen geni taşıyan hücre klonlarının seçimi

- Bunun için en etkili yöntem nükleik asit hibridizasyonudur.
- Bu işlem, aranan gen ile ona komplementer bir dizi arasında baz eşleşmesi meydana gelmesi esasına dayanır.
- Komplementer molekül DNA ya da RNA olabilir, tek zincirlidir ve nükleik asit probu olarak adlandırılır.



## 5. İstenen geni taşıyan hücre klonlarının seçimi

- Hazırlanan prob, radyoaktif bir izotopla ya da floresan olarak işaretlenerek izlenebilir.
- Prob ile plazmit üzerindeki genin hibrit oluşturabilmesi için, ısı uygulanarak çift zincirli plazmit DNA'sının denatüre edilmesi gerekir.

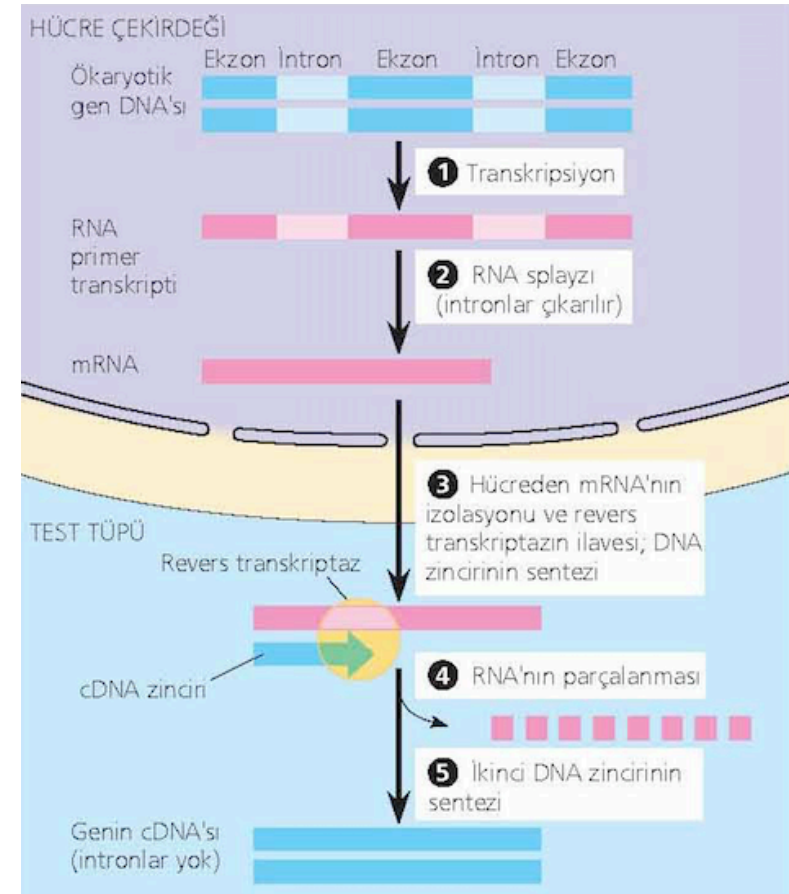


# Ökaryotik genlerin prokaryotlara aktarılmasında yaşanan problemler!

- Pekçok ökaryotik gende kodlama yapmayan bölgeler (intronlar) bulunmaktadır.
- Herhangi bir ökaryotik gen, intronları ayrıştırılmadan prokaryotik bir canlıya aktarılırsa, anlamsız bir protein meydana gelir.
- Çünkü bakteriler RNA-splicing mekanizmasına sahip değillerdir.

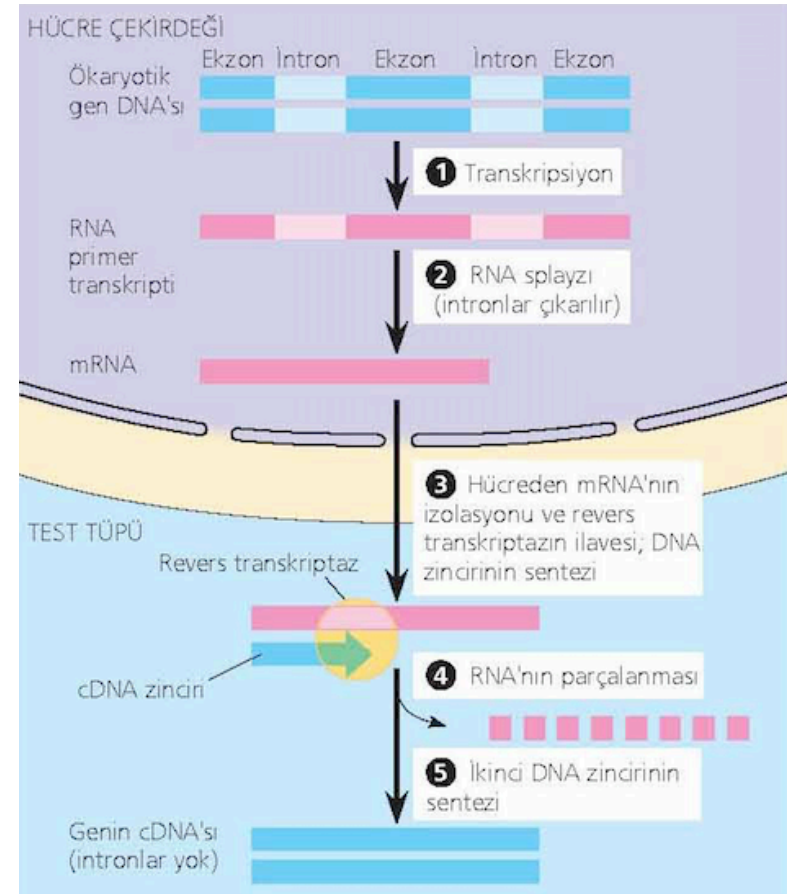
# İntron içermeyen yapay ökaryotik genlerin yapımı!

- Burada başlangıç materyali, işlenmemiş mRNA molekülüdür.
- Splicing işleminden geçen mRNA'daki intronlar uzaklaştırılarak son şekli verilir.
- Daha sonra retrovirüslerden elde edilen reverstranskriptaz enzimi ile bu mRNA'nın DNA kopyası elde edilir.



# İntron içermeyen yapay ökaryotik genlerin yapımı!

- Bu DNA'ya komplementer DNA ya da kısaca cDNA adı verilir.
- Ardından cDNA vektör içine yerleştirilerek ifadesi için bakteriye transforme edilir.



## Ökaryotik hücrelerle klonlama yapmak daha avantajlıdır!

- Araştırmacılar yine de, ökaryot-prokaryot uyumsuzluğundan uzak durmak için klonlama çalışmalarında ökaryotik hücreleri kullanırlar.
- Klonlamada en sık kullanılan ökaryotik canlı, tek hücreli bir fungus olan mayadır (*Saccharomyces cerevisiae*).

## Ökaryotik hücrelerle klonlama yapmak daha avantajlıdır!

- Maya hücreleri iki önemli avantaja sahiptir.
  - Bakteriler gibi hızlı ürerler.
  - Ökaryotlar arasında nadir bulunan plazmitlere sahiptirler.
- Hatta araştırmacılar, maya ve bakteriyel DNA'nın biraraya getirildiği rekombinant plazmitler üretmişlerdir.
- Bu plazmitler her iki tip hücrede de replike olabilir.



## Maya yapay kromozomları (YACs)

- Araştırmacılar ökaryotik kromozomun temel bileşenlerini biraraya getirerek maya yapay kromozomları (YACs) adı verilen vektörleri tasarlamışlardır.
- Burada sözü edilen ökaryotik kromozom temel bileşenleri şunlardır:
  - Replikasyon orijini
  - Sentromer
  - Telomerler

## Maya yapay kromozomları (YACs)

- Bu bileşenler yabancı DNA ile birleştirilerek yapay kromozomlar hazırlanır.
- Bu kromozomlar mitotik kromozomlar gibi davranır.
- YACs, bakteriyel plazmitlerden daha fazla DNA taşıma kapasitesine sahiptir.

## Klonlamada ökaryotik hücreleri kullanmanın diğer önemli nedeni!

- Ökaryotik bir genin ifadesinde, ökaryotik konak hücreleri kullanmanın bir diğer nedeni de proteinin translasyon sonrası modifikasyonlarıdır.
- Prokaryotik hücreler, ökaryotik proteince translasyon sonrası modifikasyon uygulayamazlar.
- Pekçok ökaryotik protein bu modifikasyonları geçirmeden (örn; doğru üç boyutlu katlanma, karbohidrat veya lipit gruplarının takılması) aktifleşemez.
- O nedenle bazı durumlarda konak hücre olarak bitki ya da hayvan hücresi kullanılır.

# DNA'nın hücre içine alınması

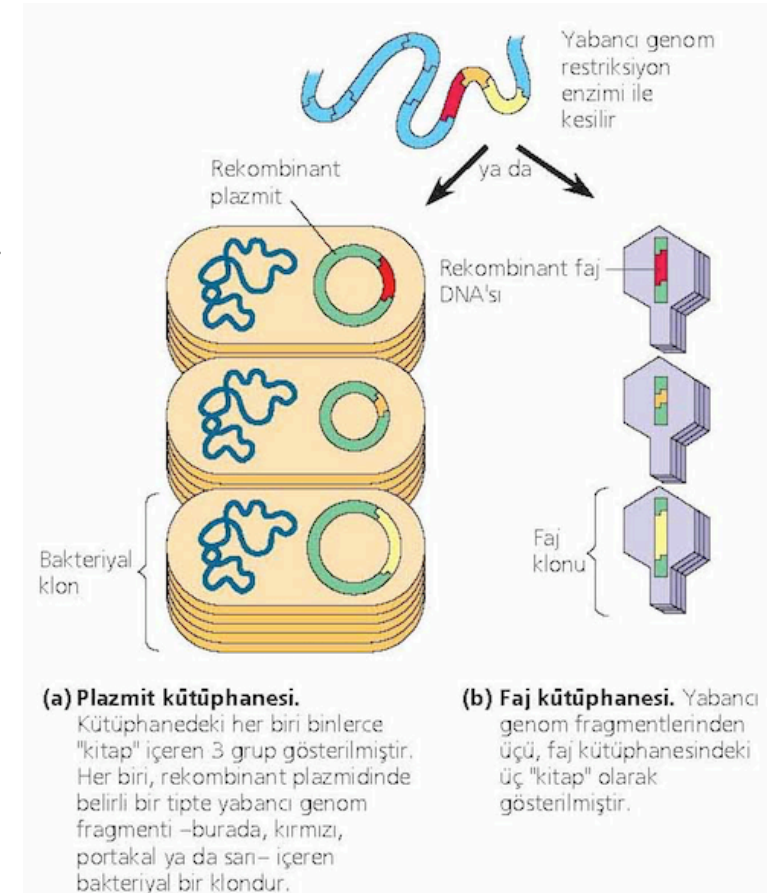
- Hem prokaryotlar (bakteriler) hem de ökaryotlar çevrelerindeki yabancı DNA'yı hücre içine alabilirler.
- Ancak bu olay bazen yeterince etkin olmayabilir.
- O nedenle araştırmacılar elektroporasyon adı verilen bir yöntem geliştirmişlerdir.
- Hücrelerin bulunduğu çözeltiliye kısa elektrik akımları verilir.
- Akım, plazma zarında geçici açıklıklar oluşturarak DNA'nın girişini sağlar.

## DNA'nın hücre içine aktarılmasında kullanılan diğer teknikler

- DNA, ökaryotik hücrelere, mikroskobik boyuttaki ince iğneler kullanılarak da aktarılabilir (mikroenjeksiyon).
- Bitki hücreleri söz konusu olduğunda ise DNA mikroskobik metal parçacıklarına tutturulur ve bir tabanca yardımıyla hücre içine gönderilir (partikül bombardımanı).

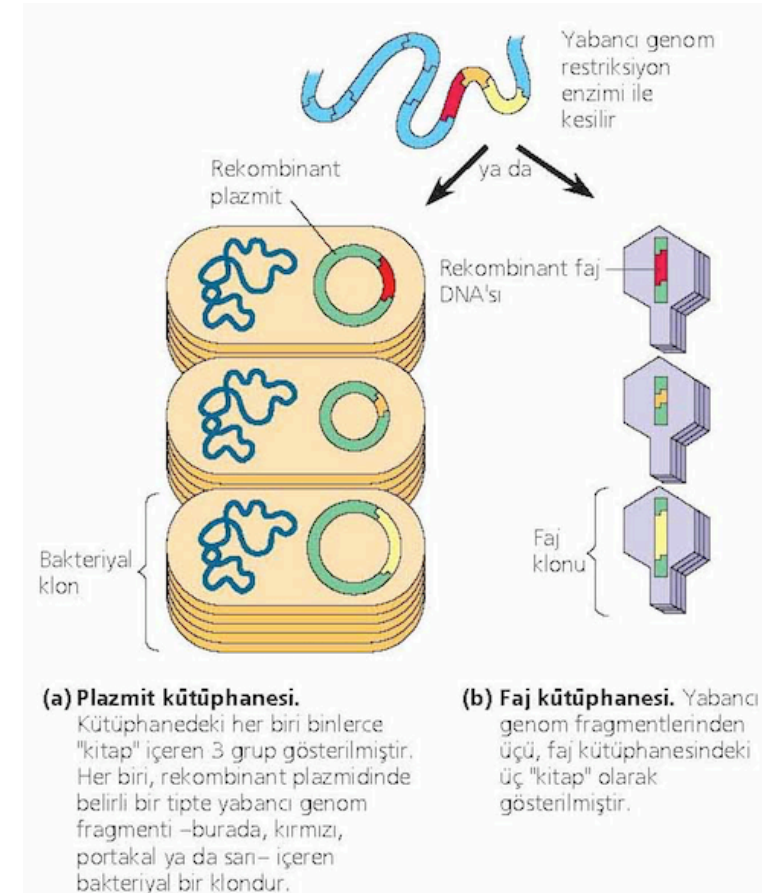
# Genomik kütüphane

- DNA'nın restriksiyon enzimler ile kesimi sonucunda çok sayıda fragment oluşmaktadır.
- Sonuçta her biri farklı bir fragmenti taşıyan binlerce farklı plazmit meydana gelir.
- İşte bu plazmit koleksiyonunun tümüne, ilgili canlının genomik kütüphanesi adı verilir.



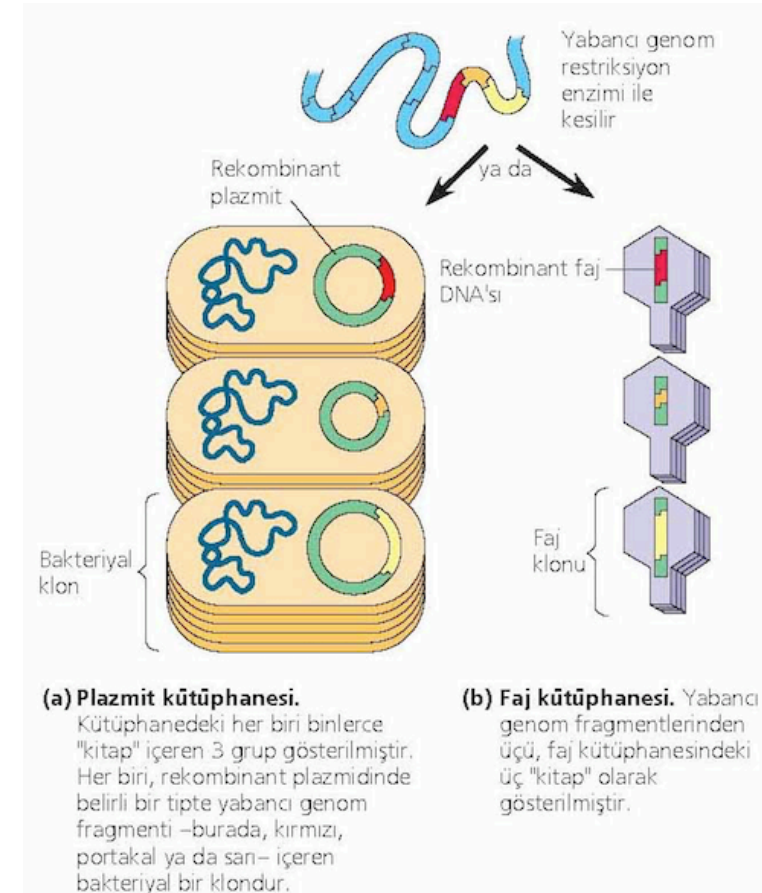
# Bakteriyofajların klonlama vektörü olarak kullanılması

- Plazmitler dışında bakteriyofajlar da genomik kütüphane yapımında klonlama vektörü olarak kullanılabilir.
- Yabancı DNA segmentleri plazmitlerde olduğu gibi faj genomuna yerleştirilir.
- Rekombinant faj DNA'sı daha sonra bir kapsit ile paketlenir ve enfeksiyon yoluyla bakteriyel hücreye aktarılır.



# Bakteriyofajların klonlama vektörü olarak kullanılması

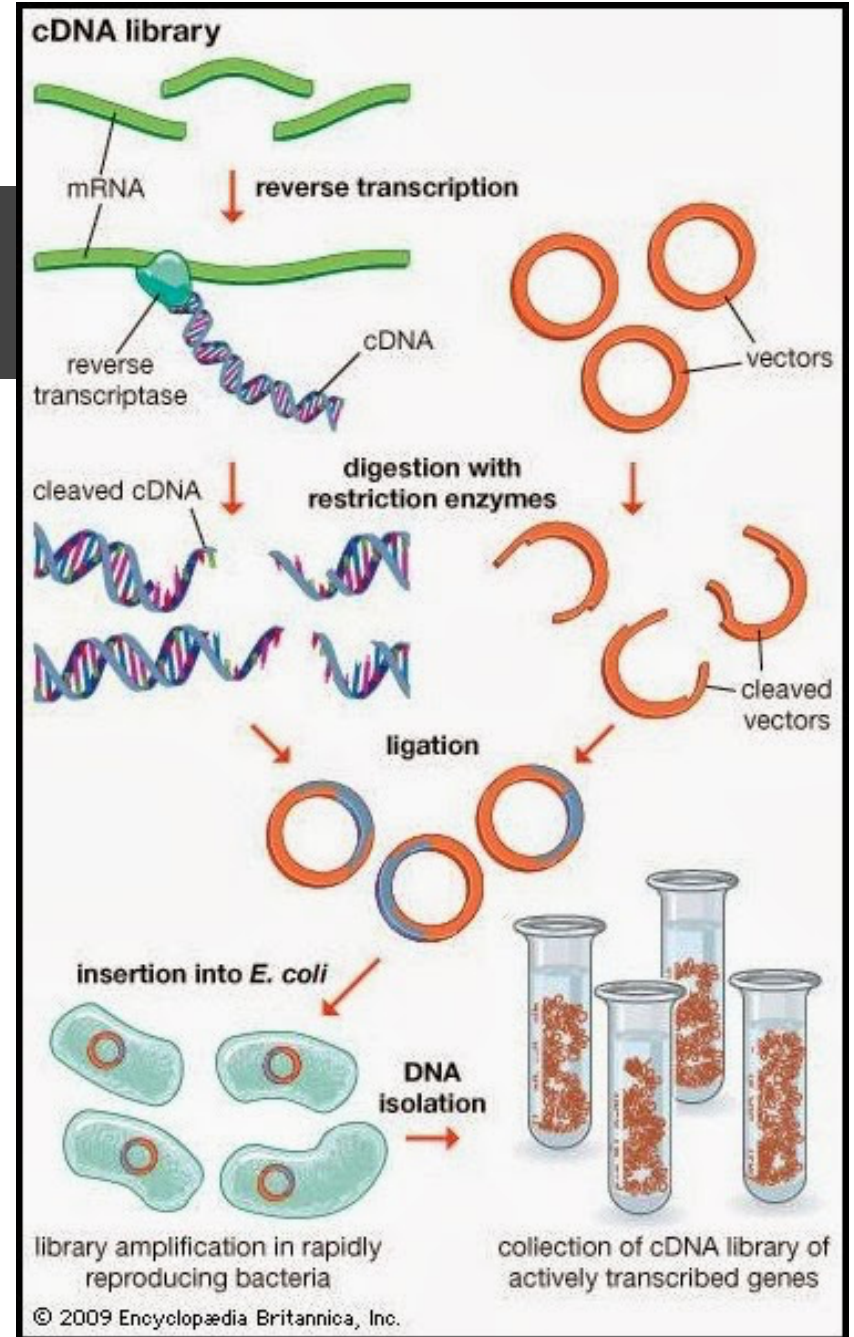
- Konak hücre içinde çoğalan faj DNA'sı çok sayıda yeni rekombinant faj oluşturur.
- Faj kullanılarak yapılan genomik kütüphane, faj klonu koleksiyonu olarak saklanır.





# cDNA kütüphaneleri

- Komplementer DNA (cDNA) kullanılarak daha sınırlı tipte gen kütüphaneleri oluşturulabilir.
- Öncelikle hücrede bulunan tüm mRNA'lar izole edilir.
- Daha sonra revers transkriptaz enzimi ile bu mRNA'ların cDNA kopyaları hazırlanır.
- Bu genlerin klonlanması ile elde edilen kütüphanelere cDNA kütüphanesi adı verilir.

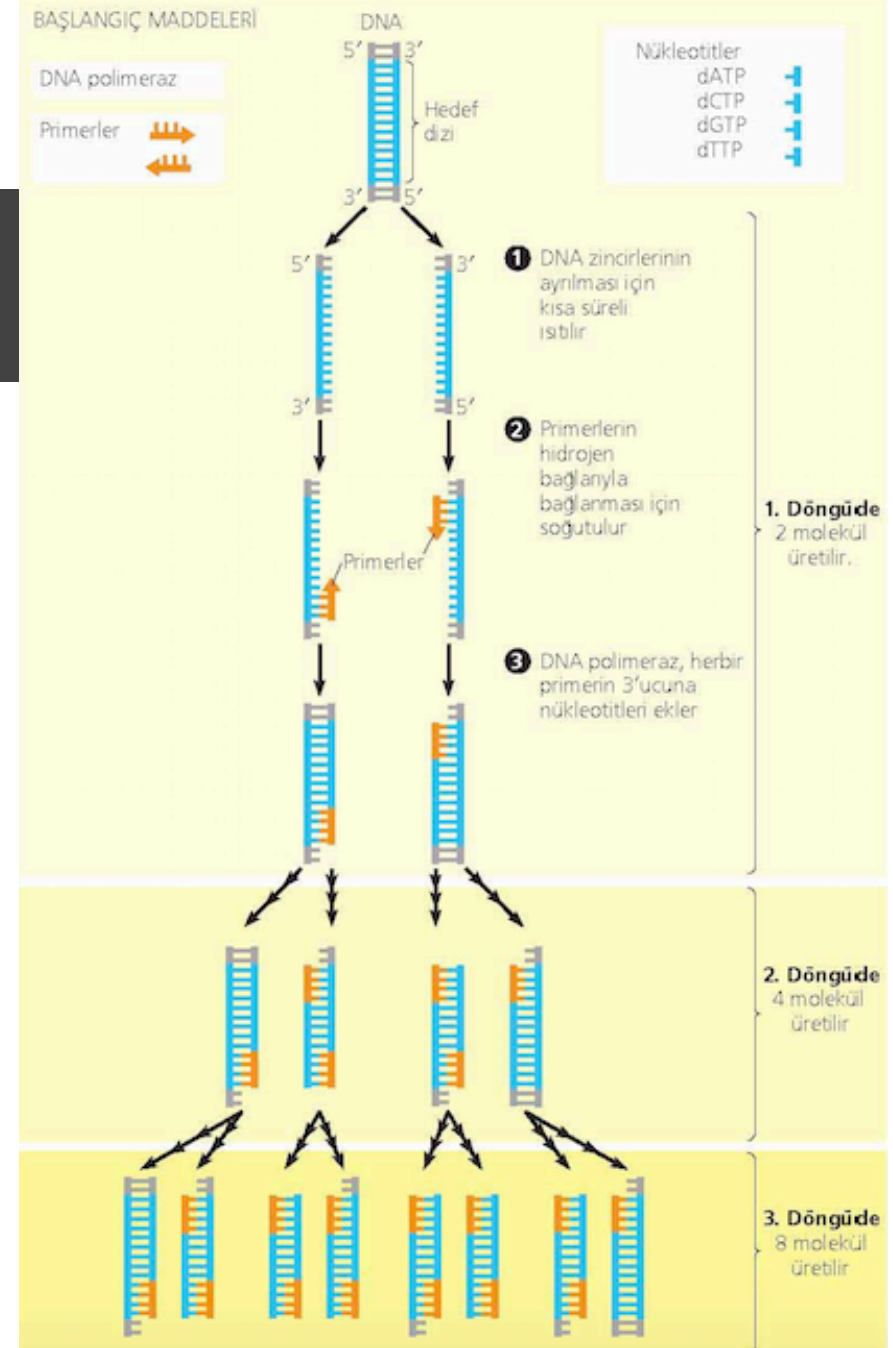


## cDNA kütüphaneleri neden tercih edilir?

- Bu kütüphanelerde genomun kodlama yapmayan bölgeleri de dahil olmak üzere tüm bölgeleri yerine, yalnızca kodlama yapan bölgeler bulunur.
- Eğer araştırmacı beyin veya karaciğer hücresi gibi spesifik hücrelerin özelleşmiş işlevlerinden sorumlu genleri çalışmak istiyorsa, bu kütüphaneleri kullanabilir.
- Çünkü cDNA kütüphanelerinde yalnızca belirli bir dokuda, belirli bir zaman diliminde transkripsiyonu yapılan genler yer alacaktır.

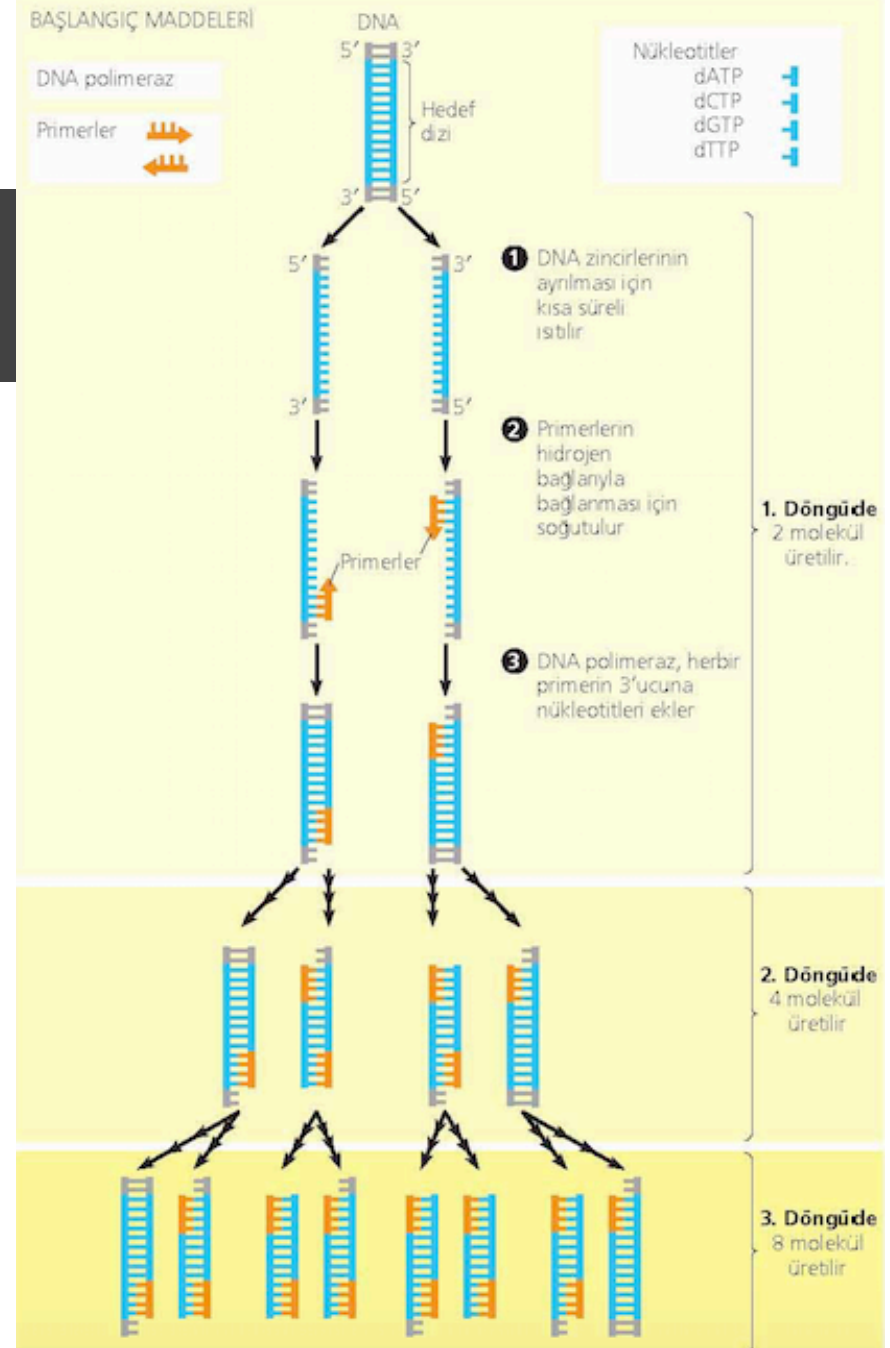
# Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- Kaynak DNA sınırlı miktarda ve saf değil ise, çoğaltmak için en uygun yöntem PCR'dir.
- Bu yöntemde herhangi bir DNA parçası, hücre kullanılmadan kısa sürede istenildiği kadar çoğaltılabilir.



# Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

- PCR için deney tüpü içinde şu bileşenlerin bulunması gerekmektedir:
  - Kalıp DNA
  - DNA polimeraz
  - Primer
  - Nükleotitler (dNTP'ler)



# Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

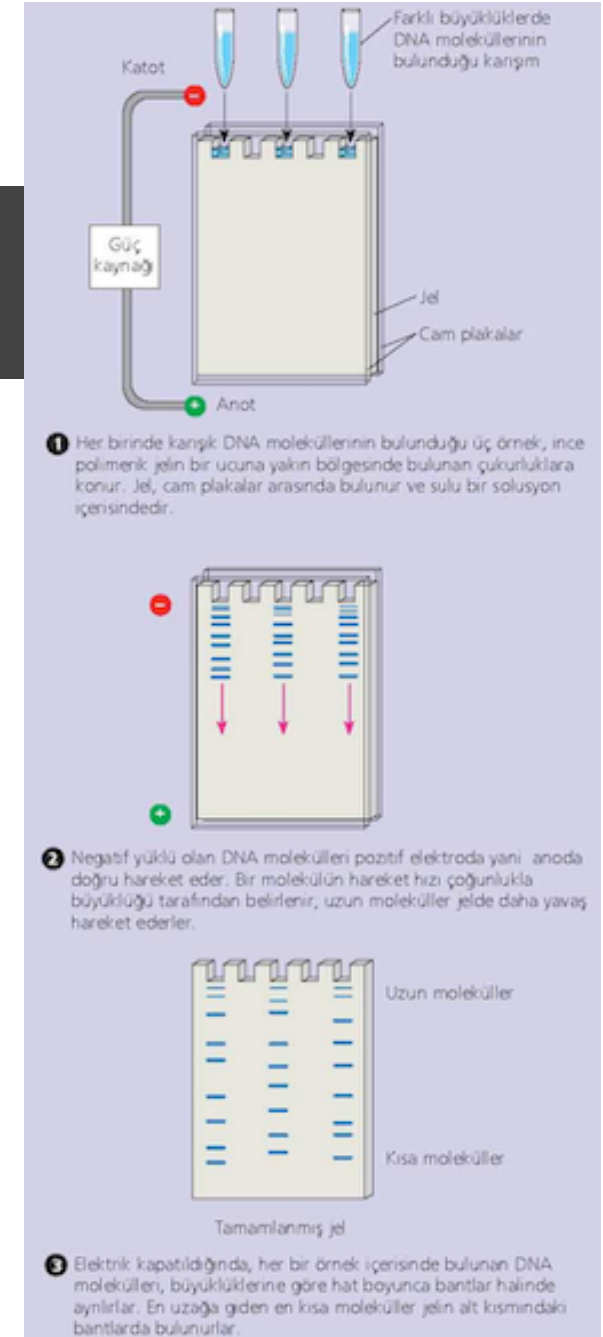
- Bu yöntemde kullanılan DNA polimeraz, DNA zincirlerinin ayrılması için ihtiyaç duyulan yüksek sıcaklıklara dayanıklıdır.
- Kullanılan spesifik primerler sayesinde, çok sayıda genin birlikte bulunduğu bir DNA parçasının ilgili kısmı spesifik olarak çoğaltılabilir.

## PCR hangi alanlarda kullanılabilir?

- Bu teknik, aşağıdaki durumlarda DNA örneklerinin çoğaltılması için kullanılabilir:
  - Donmuş durumdaki 40.000 yaşında mamut DNA'sı
  - Cinayet yerindeki az miktarda kan, doku ya da spermden elde edilen DNA
  - Doğum öncesi genetik tanılamada embriyonik hücrelerden elde edilen DNA
  - HIV gibi tespit edilmesi güç virüslerle enfekte hücrelerden elde edilen viral genetik materyal

# Jel elektroforezi

- Makromoleküllerin (nükleik asitler ya da proteinler), elektriksel yük ya da diğer fiziksel özelliklerine göre ayrılmasıdır.
- Doğrusa formdaki DNA molekülleri, büyükliklerine bağlı olarak bantlar şeklinde ayrılırlar.



# Restriksiyon fragment analizi (RFLP)

- Bu yöntem ile DNA'daki nükleotit dizisi farklılıkları saptanabilir.
- Uzun DNA molekülü öncelikle bir restriksiyon enzimi ile kesilerek çok sayıda fragment elde edilir.

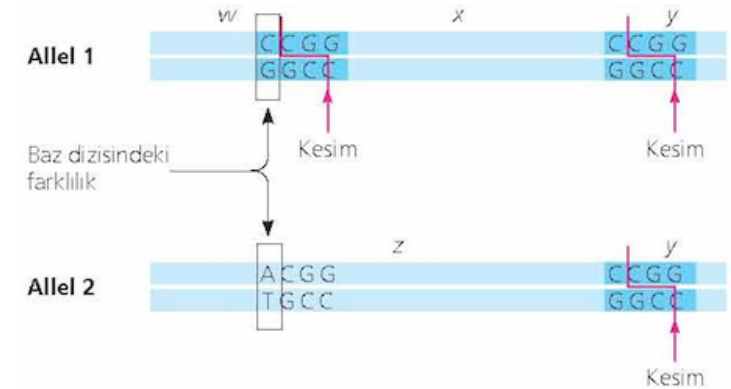


## Restriksiyon fragment analizi (RFLP)

- Daha sonra fragmentler elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrılır.
- Elektroforezde, başlangıç molekülüne ve kullanılan restriksiyon enzimine özgü bir bant profili oluşacaktır.
- DNA, jelden izole edilebildiği için her bir fragmente ait saf örnekler hazırlanabilir.

# Restriksiyon fragment analizi (Örnek)

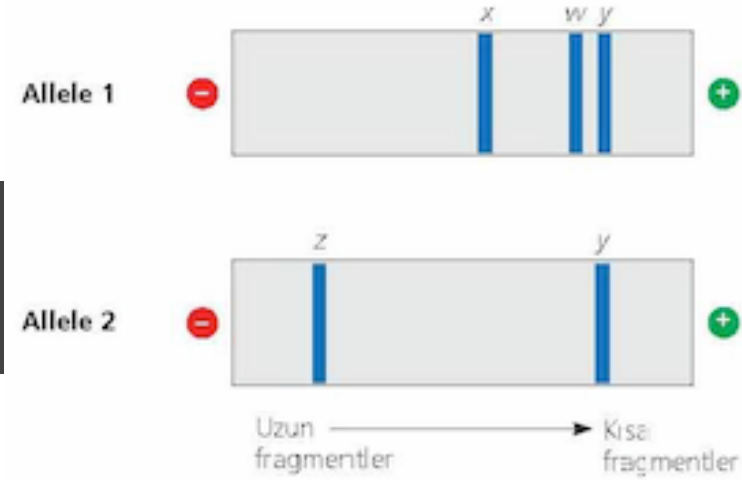
- Yandaki şekilde, bir genin iki farklı allelik versiyonu bulunmaktadır.
- Öncelikle her bir örnek aynı restriksiyon enzim ile kesilir.
- Alleller arasında nükleotit dizisi farklılıkları bulunduğundan, restriksiyon (kesim) bölgeleri değişiklik gösterecektir.



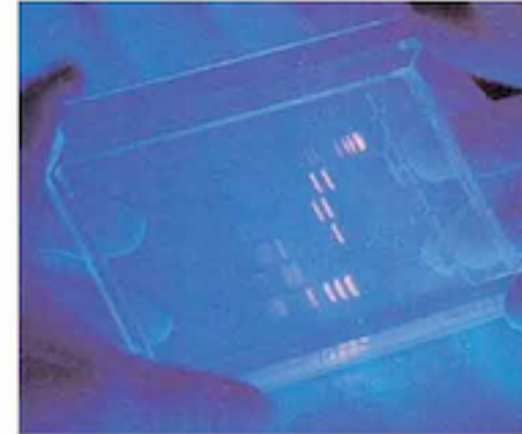
(a) İki allele ait DNA. Bir genin farklı allellerini taşıyan iki homolog DNA segmenti çizilmiştir; sadece ilgili bazlar gösterilmiştir. Allel 2'deki tek baz çiftlik bir farklılık, belirli bir restriksiyon enzimine karşı tanıma dizisinin (restriksiyon bölgesi) bir adet azalmasına neden olur. Bu enzim allel 1'e ait DNA'yı üç parçaya (w, x ve y) ayırırken, Allel 2'ye ait DNA'yı sadece iki parçaya (z ve y) ayırır.

## Restriksiyon fragment analizi (Örnek)

- Buna bağlı olarak kesim sonucunda farklı uzunlukta fragmentler oluşacaktır (allel 1 üç parçaya, allel 2 iki parçaya ayrılır).
- Bu durumda her bir allelin elektroforezde oluşturduğu bant profili farklı olacaktır.



(b) **Restriksiyon fragmentlerinin elektroforezi.** Elektroforez, her bir allelden ortaya çıkan restriksiyon fragmentlerini ayırır. İki allel arasındaki kesim farklılığı, jeldeki bant modelleriyle gösterilmiştir. Allel 1, w, x ve y fragmentlerinin karşılığı olan üç adet bantla sahiptir; allel 2 ise, z ve y fragmentlerinin karşılığı olan iki bantla sahiptir.



(c) **Tamamlanmış jel.** DNA'ya bağlanan bir boyanın ilave edilmesinden sonra, bantlar ultraviyole ışık altında floresan pembe renk verir. Burada gösterilen jelde, herbiri, restriksiyon enzimi ile kesilmiş karşık DNA fragmentlerini içeren altı adet örnek yürütülmüştür. Pembe bantlar, farklı büyüklüklerdeki DNA'nın restriksiyon fragmentlerine karşılıktır.

# Southern blotting

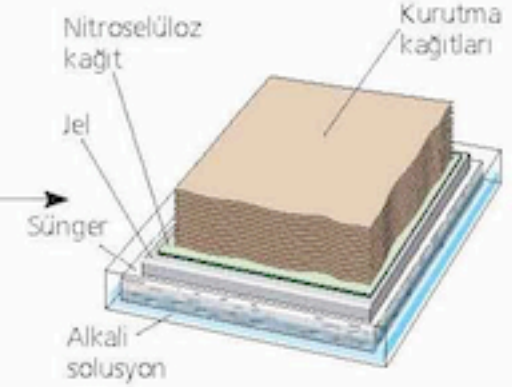
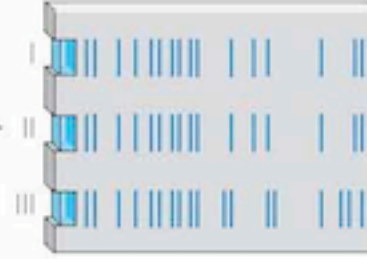
- Elektroforez işlemi sonucunda çok sayıda bant meydana gelir.
- Bazen bu bantlar içerisinde özellikle spesifik bir nükleotit dizisini taşıyan fragmenti seçmemiz gerekebilir.
- Bu durumda, aradığımız diziye komplementer tek zincirli radyoaktif nükleik asit problrarı kullanılır.

# Southern blotting

- Bu prob, hedef DNA dizisi ile özgül hidrojen bağları yapar.
- Daha sonra hibritleşen bölgeler otoradyografi ile tespit edilir.
- Bu yönteme Southern blotting adı verilir.



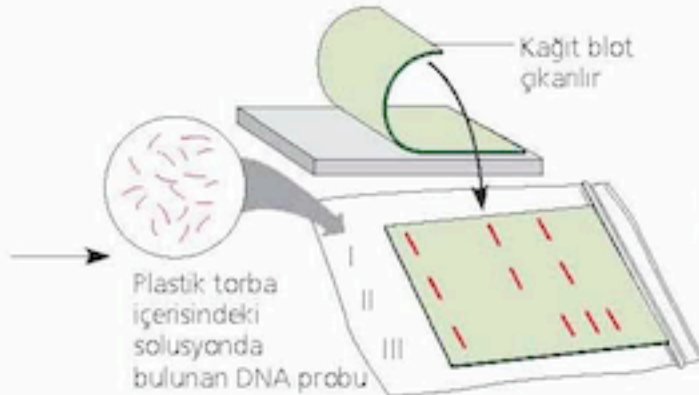
Restriksiyon fragmentleri



**1 Restriksiyon fragmentlerinin hazırlanışı.** Test edilecek DNA örnekleri. (bu örnekte, örnek I, II ve III olarak belirlenmiştir) uygun olan kaynaklardan elde edilir. Her üç örneğe bir restriksiyon enzimi ilave edilir, DNA'dan restriksiyon fragmentleri oluşturulur.

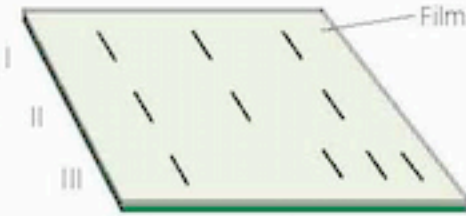
**2 Elektroforez.** Herbir örneğe ait restriksiyon fragment karışımı elektroforezle ayrılır. Her bir örnek karakteristik bir bant modeli meydana getirir. (Aslında, burada gösterilenden çok daha fazla sayıda bant olacaktır ve boyanmadığı sürece gözükmeyeceklerdir.

**3 Transfer.** Alkali bir solusyon, jelin üst tarafına doğru kapiler etkiyle çekilir ve DNA, denatüre halde jelin üstünde bulunan nitroselüloz kağıt tabaka üzerine aktarılır. Tek zincirli DNA'lar tamamen jeldeki konumlarında kağıt üzerine tutunurlar.



**4 Radyoaktif proba hidridizasyon.** Kağıt blot, radyoaktif olarak işaretlenmiş prob içeren bir solusyona maruz bırakılır. Prob, istenen DNA dizisine komplementer olan tek zincirli DNA'dır ve bu prob komplementer dizinin restriksiyon fragmentlerine baz eşleşmeleriyle bağlanır.

Bağlanmamış probu uzaklaştırmak için yapılan yıkama



**5 Otoradyografi.** Bir tabaka fotoğraf filmi kağıt üzerine yerleştirilir. Bağlanan probdaki radyoaktivite, özgül DNA bantlarının karşısında görüntü oluşturmak üzere filmi ışınlar-proba baz eşleşmesi yapan DNA'yı içeren bantlar. Örnek I ve II'nin band modelleri birbirinin aynısıdır, fakat III farklıdır.

# Tüm genomun haritalanması (İnsan Genom Projesi)

- İnsan genom projesi resmi olarak 1990 yılında başlamıştır.
- Amaç, genomun tümünün haritalanması ve tüm kromozomların nükleotit dizisinin belirlenmesidir.
- Yoğun çaba gerektiren bu proje üç aşamada gerçekleştirilmiştir:
  - Genetik (ya da linkaj) haritalaması
  - Fiziksel haritalama
  - DNA dizi analizi

# Genetik (ya da linkaj) haritalaması

- Bu teknik, büyük bir genomun haritalanmasında ilk aşamadır.
- Kromozomlar boyunca dağılmış binlerce marker bölgenin genetik haritası çıkarılır.
- Bu bölgelerin rekombinasyon frekanslarına dayalı olarak kromozomlar üzerindeki sıraları belirlenir.
- Araştırmacılar, insan genomunda bol bulunan ve farklı uzunluktaki allellere sahip mikrosatellitlere dağılmış yaklaşık 5.000 marker ile insan gen haritasını birkaç yıl içerisinde tamamlamışlardır.



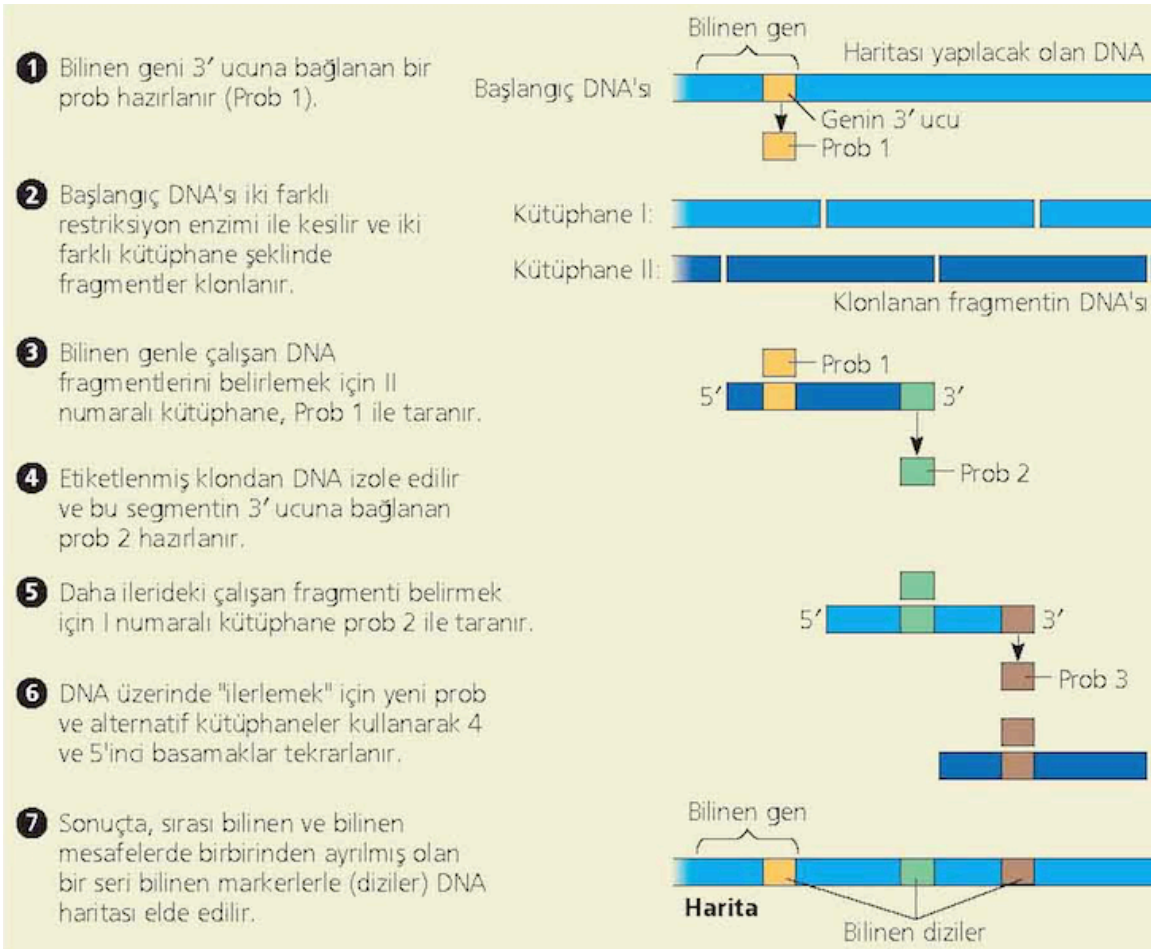
# Fiziksel haritalama

- Bu haritalama yönteminde genlerin birbirine uzaklığı, nükleotit sayısı cinsinden ifade edilir.
- Öncelikle her kromozomun DNA'sı belli sayıda ve teşhis edilebilen restriksiyon fragmentlerine bölünür.
- Daha sonra bu parçaların, kromozom DNA'sındaki orijinal sıraları saptanır.

# Fiziksel haritalama

- Fragmentleri doğru sıraya dizebilmek için bu fragmentlerin üstüste çakışan bölgelerindeki nükleotit benzerliklerini tespit etmek gerekmektedir.
- Kromozom yürümesi (chromosome walking) adı verilen bu yöntemde problar kullanılmaktadır.

# Fiziksel haritalama (kromozom yürümesi)



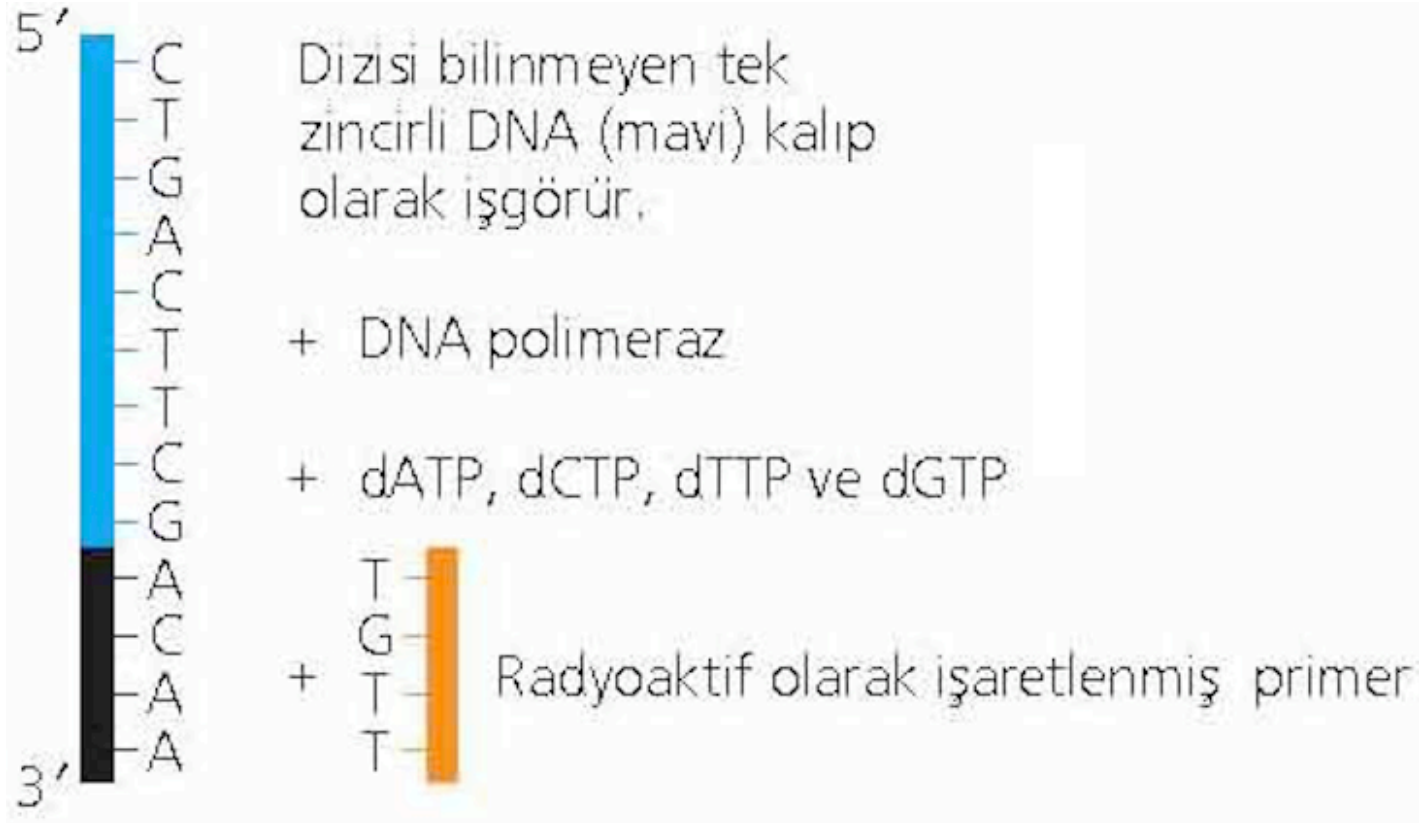
# DNA dizi analizi

- DNA dizi analizi için önceleri Sanger metodu ya da zincir sonlanma metodu adı verilen yaklaşım kullanılmıştır.
- Kalıp olarak kullanılan ve dizisi bilinmeyen DNA'ya komplementer zincir sentezlenmesi esasına dayanır.
- Sentez sırasında ortamdaki dNTP'ler ve ddNTP'ler monomer olarak kullanılır.
- Ancak bu işlem sırasında yeni zincire dNTP yerine zincir sonlandırıcı ddNTP (dideoksiNTP) girerse sentez durur.


# DNA dizi analizi

- Bu Şekilde farklı uzunluklarda çok sayıda fragment meydana gelir.
- Kalıp dizinin hemen hemen tüm nükleotit pozisyonlarına denk gelecek Şekilde sonlandırılarak oluşan fragmentler, kılcal bir tüp içerisinde hazırlanmış yüksek çözünürlüklü jel elektroforezinde yürütölür.
- Oluşan bantların lazer ışınları yoluyla okunması sonucunda nükleotit dizisi tespit edilir.

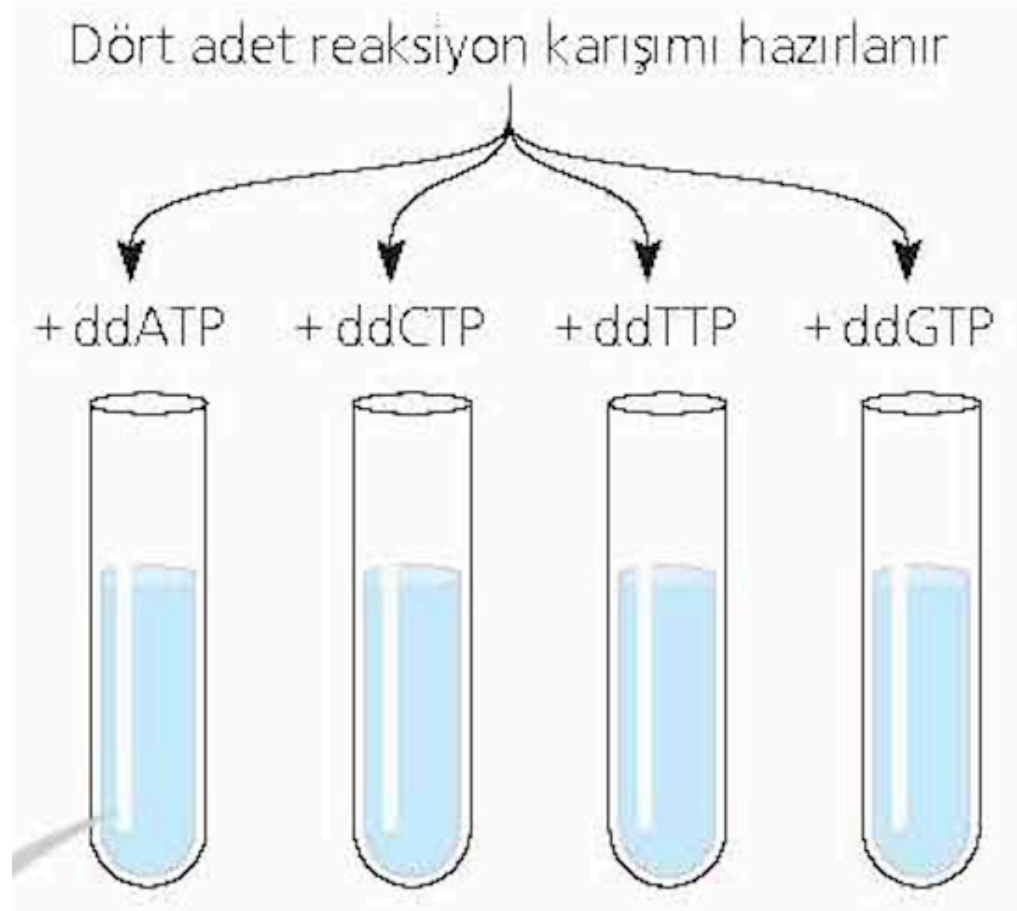
# DNA dizi analizi



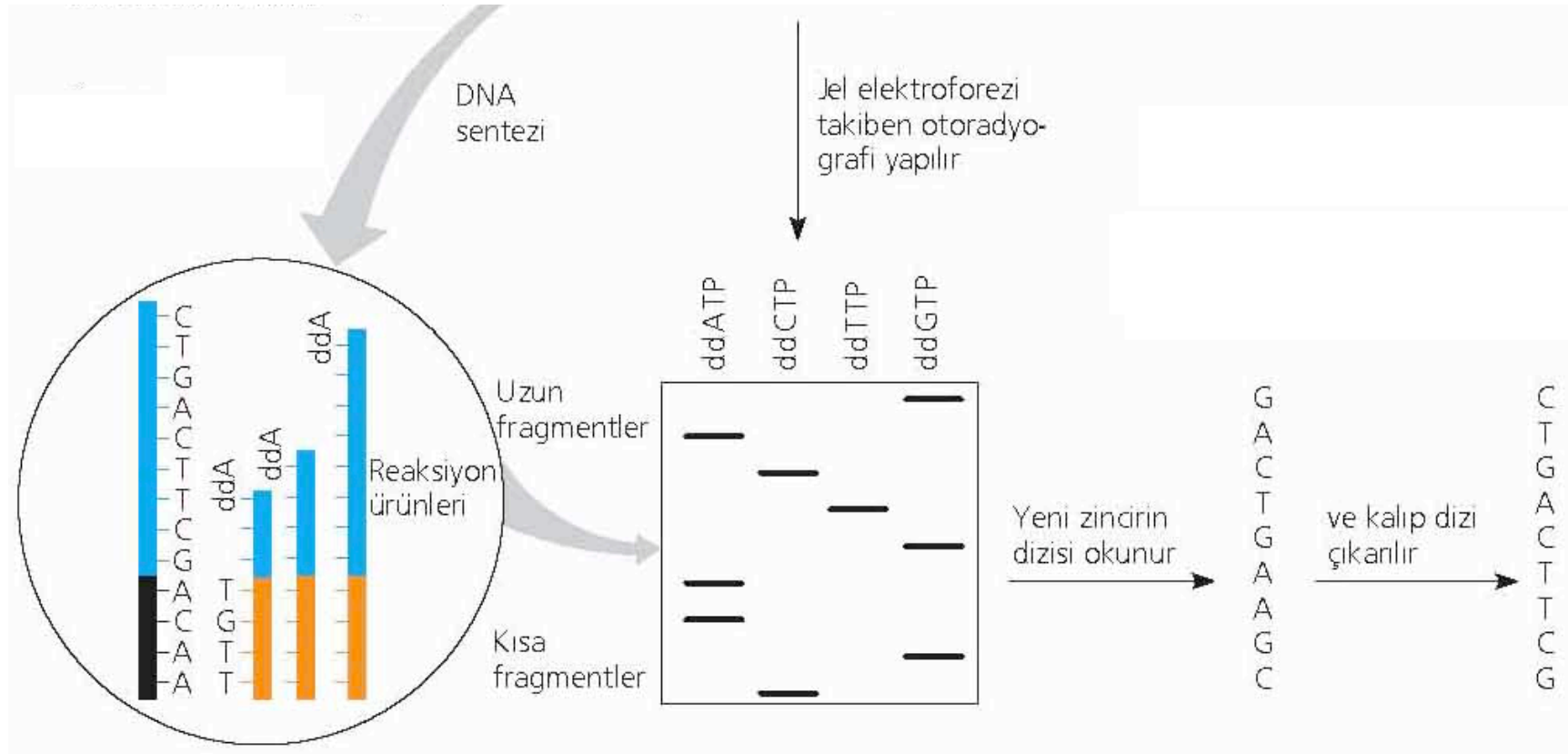
The diagram illustrates the components for DNA sequencing. On the left, a vertical DNA strand is shown with a blue segment at the top (5' end) and a black segment at the bottom (3' end). The sequence of the blue segment is C, T, G, A, C, T, T, C, G, and the sequence of the black segment is A, C, A, A. To the right of the strand, the following text and components are listed:

- Dizisi bilinmeyen tek zincirli DNA (mavi) kalıp olarak işgörür.
- + DNA polimeraz
- + dATP, dCTP, dTTP ve dGTP
- +  Radyoaktif olarak işaretlenmiş primer

# DNA dizi analizi



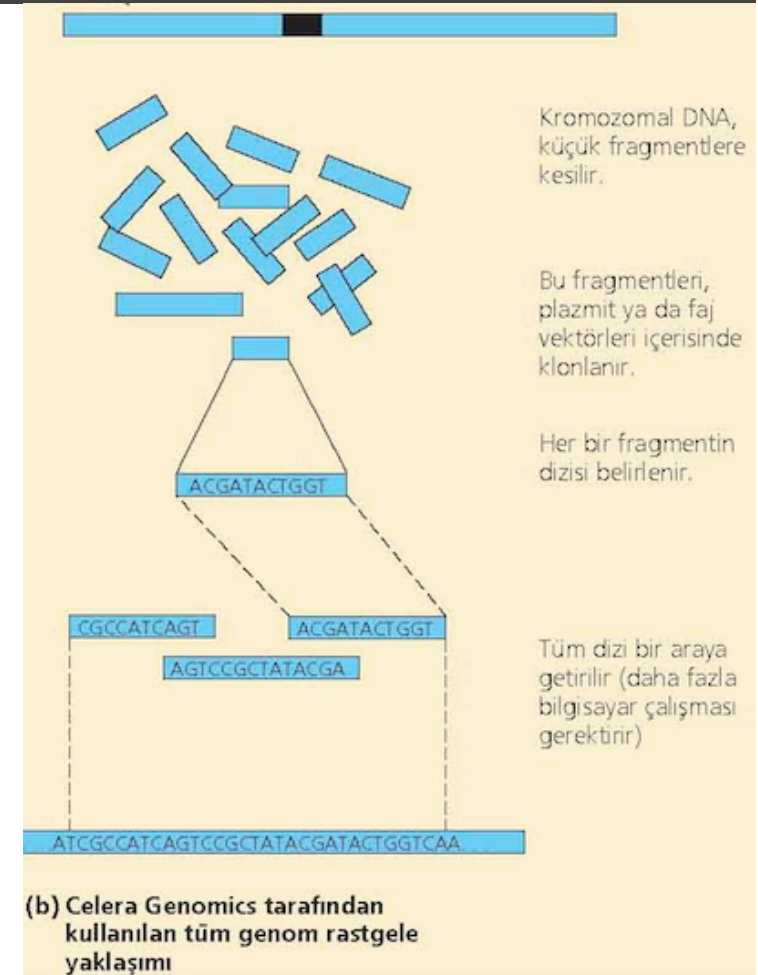
# DNA dizi analizi





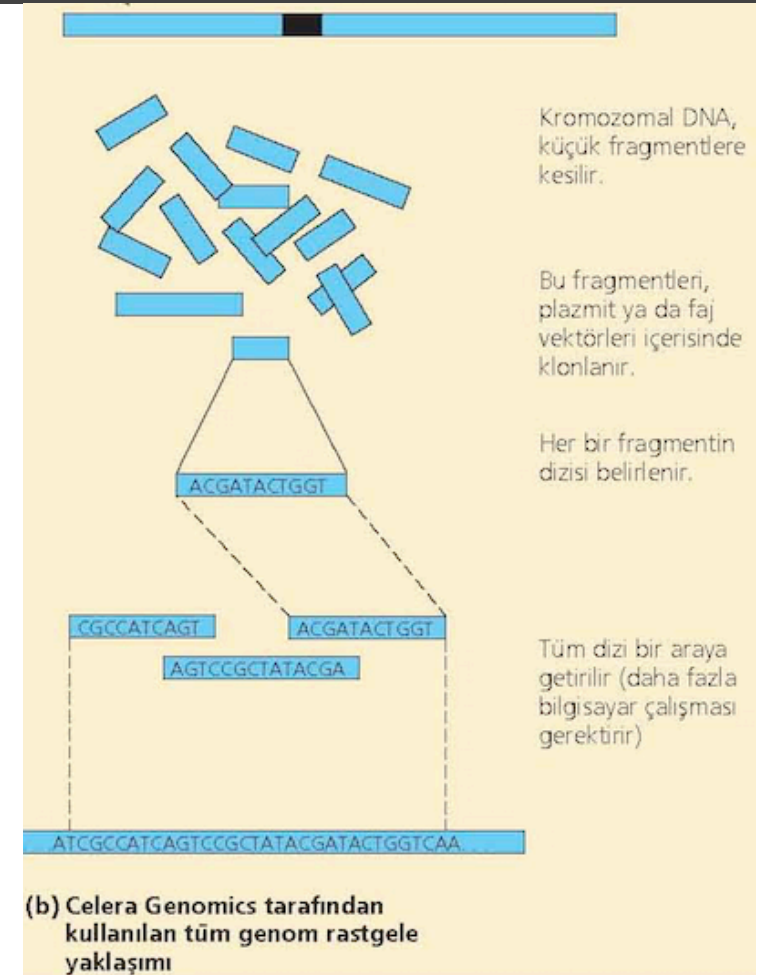
# Tüm genom dizi analizi için alternatif bir yaklaşım

- Bilgisayar teknolojisindeki ilerlemelerden cesaret alan moleküler biyolog J. Craig Venter, 1992 yılında alternatif bir yaklaşım ileri sürdü.
- Araştırmacı, genetik haritalama ve fiziksel haritalama aşamalarını atlayarak, rastgele elde edilen DNA fragmentlerinin analizi ile işe başlamıştır.



# Tüm genom dizi analizi için alternatif bir yaklaşım

- Aynı DNA zincirinden elde edilen kopyaların her birini farklı restriksiyon enzimleri ile kesmiş ve çok sayıda fragment elde etmiştir.
- Daha sonra tüm fragmentlerin nükleotit dizilerini tek tek belirlemiştir.
- Güçlü bilgisayar programları kullanarak bu fragmentlerin üstüste çakışan kısımlarını yakalayıp başlangıçtaki DNA zincirinin tüm dizisini belirlemiştir.



# Venter konsorsiyumdan ayrılıyor!

- Başlangıçta insan genom projesi için kurulan uluslararası konsorsiyumda yer alan Venter, kendi yöntemini kullanarak bağımsız bir şekilde dizi analizi yapabilmek için konsorsiyumdan ayrılmıştır.
- Venter ve ekibi, 1995 yılında *Haemophilus influenzae*'nin tüm genom dizisini bu teknik ile yayınlamıştır.
- Araştırıcı Mayıs 1998'de Celera Genomics adlı şirketi kurmuş ve insan genom projesini 3 yılda tamamlama sözü vermiştir.

# Venter konsorsiyumdan ayrılıyor!

- Aynı yöntem kullanılarak Mart 2000'de *Drosophila melanogaster*'in genom dizisi belirlenmiştir.
- Celera Genomics Şubat 2001'de insan genom dizisinin %90'dan fazlasının belirlendiğini duyurmuştur.



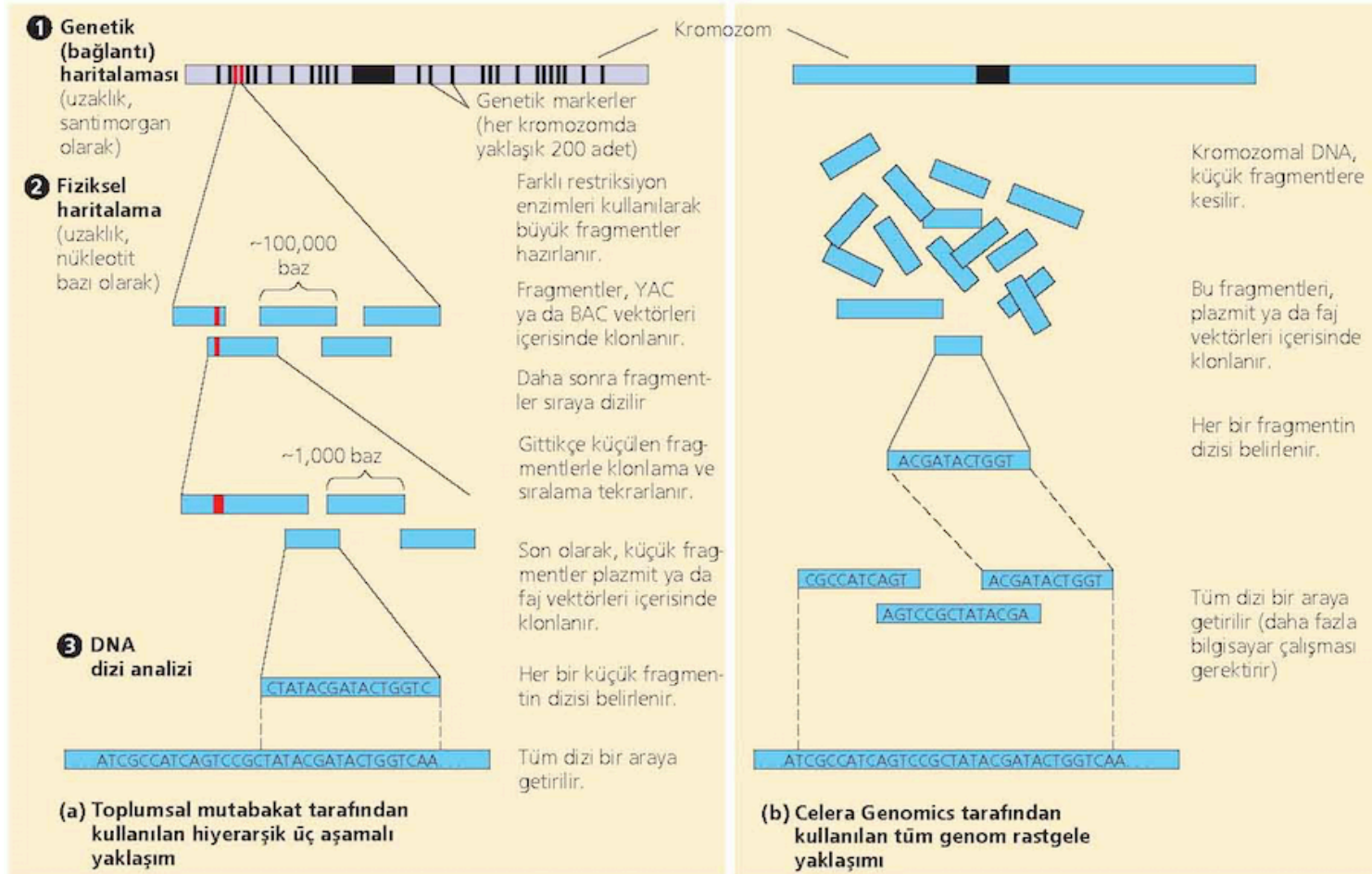
## Gen dizisi belirlenen diğer organizmalar

- 2001 yılı ortalarına kadar yaklaşık 50 türün genom dizisi belirlenmiştir.
- Bu organizmaların birçoğu prokaryottur.
- Genomu tamamlanan ilk ökaryot *Saccharomyces cerevisiae* iken, ilk çok hücreli canlı *Caenorhabditis elegans*'tır.
- Bunu, bir diğer çok hücreli canlı olan *Arabidopsis thaliana* izlemiştir.

# Dizi analizindeki zorluklar

- Tekrarlı DNA'nın varlığından dolayı bazı bölgelerin ayrıntılı haritalarının yapılması zordur.
- Daha fazla canlının dizi bilgisi biriktikçe iş daha da kolaylaşmaktadır.
- Örneğin, insan genomuna %85 oranında benzerlik gösteren fare genom dizisi belirlenirken büyük oranda insan genom dizisinden faydalanılmıştır.

# Genom haritalamasına genel bakış (tekrar)



# İnsan gen sayısı beklenenden az çıkmiştir!

- İnsan genom projesinin en şaşırtıcı sonuçlarından birisi, beklenenden daha az sayıda genin tespit edilmiş olmasıdır.
- Projeden önce 100.000 civarında proteine karşılık, aynı sayıda gen bulunduğu tahmin edilirken, proje sonunda 30.000-40.000 genimizin olduğu tespit edilmiştir.



# İnsan gen sayısı beklenenden az çıkmıştır!

Tablo 20.1 Genom Büyüklüğü ve Gen Sayıları

Organizma	Genom Boyutu	Belirlenen Gen Sayısı	Mb* başına Gen
<i>H. influenzae</i> (bakteri)	1.8 Mb*	1,700	940
<i>S. cerevisiae</i> (maya)	12 Mb	6,000	500
<i>A. thaliana</i> (bitki)	100 Mb	26,000	260
<i>C. elegans</i> (nematod)	97 Mb	19,000	200
<i>D. melanogaster</i> (sirke sineği)	180 Mb	13,000	72
<i>H. sapiens</i> (insan)	3,200 Mb	30,000–40,000	~10

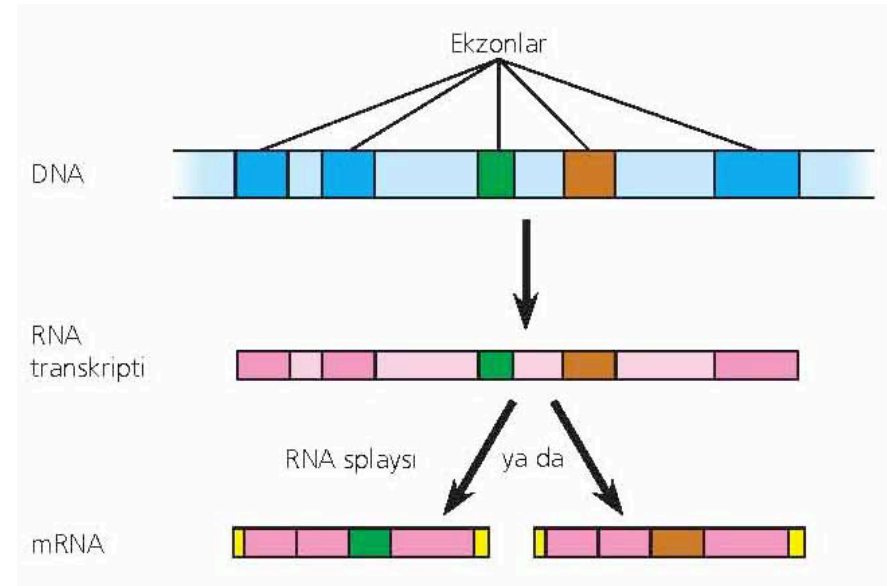
\*Mb=—milyon baz çifti

# İnsan gen sayısı beklenenden az çıkmiştir!

- İnsan DNA'sının çok küçük bir bölümü gendir.
- Büyük bir kısmı;
  - Tekrarlanmış dizilerden ve
  - Alışılmışın dışında uzun intronlardan oluşur.
- İnsan intronları sinek ya da halkalı solucaninkinden yaklaşık 10 kat daha uzundur.

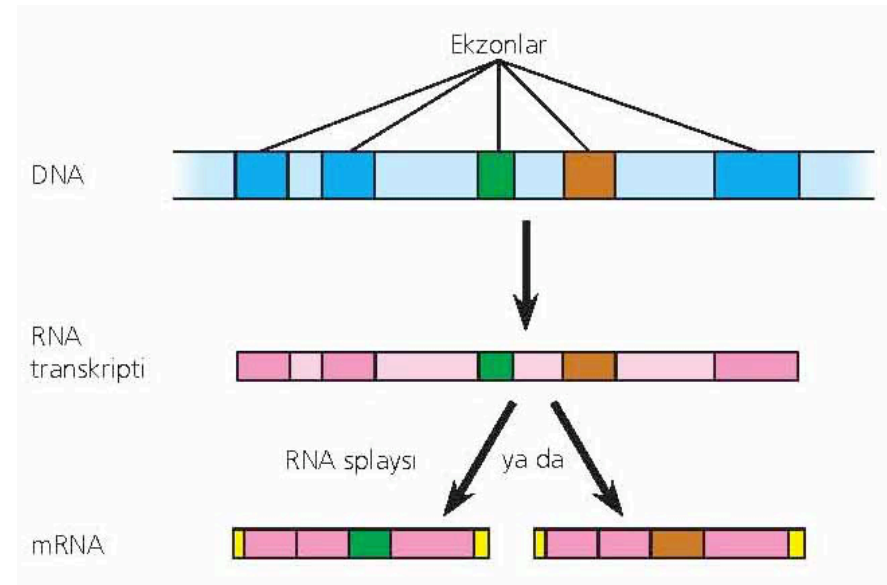
# Peki, insanı sinek ya da solucandan daha kompleks yapan güç nedir?

- İnsan (ve genel olarak omurgalı hayvanlar) genomunun kodlama yapan dizilerinden, 'daha az yatırım ile daha çok kazanç' elde ederler.
- Çünkü insan genlerinin RNA transkriptleri alternatif RNA splicing işlemine tabi tutulmaktadır.



# Peki, insanı sinek ya da solucandan daha kompleks yapan güç nedir?

- Ekzonların farklı kombinasyonları kullanılarak aynı genden çok sayıda farklı polipeptit sentezlenebilir.
- Polipeptit zincirlerine karbohidrat gruplarının ilavesi gibi ekstra işlemlerle protein çeşitliliği daha da artar.

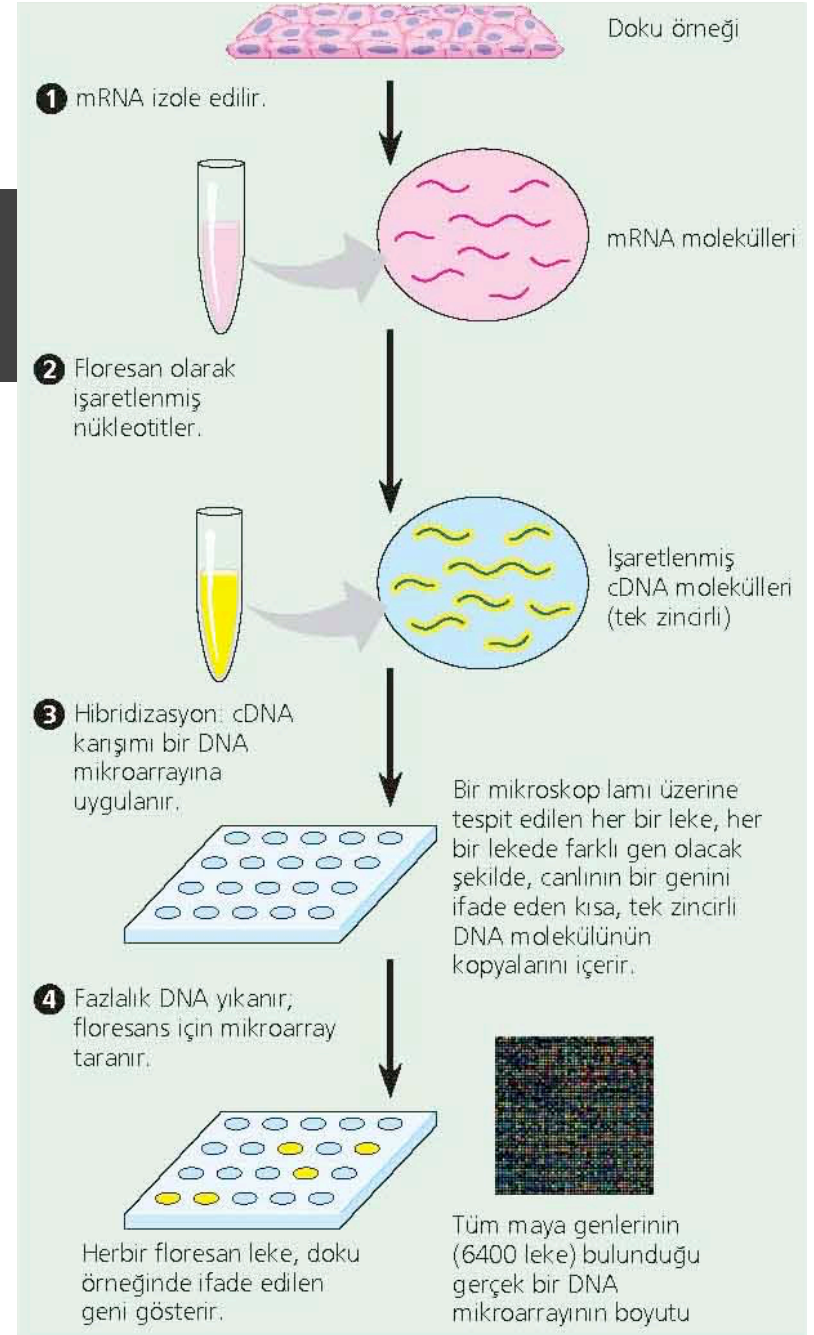


# Bilinmeyen neydi?

- İnsan genlerinin yaklaşık yarısı insan genom projesinden önce de biliniyordu.
- Peki, o zaman bilinmeyen neydi?
- Yeni tespit edilen gen dizileri, diğer canlıların genleri ile karşılaştırılır.
- Bazen yeni gen dizisi, işlevi çok iyi bilinen bir gen dizisi ile kısmen de olsa eşleşebilir.
- Bu durumda, yeni tespit edilen genin de aynı ya da benzer bir aktiviteye sahip olabileceği düşünülür.

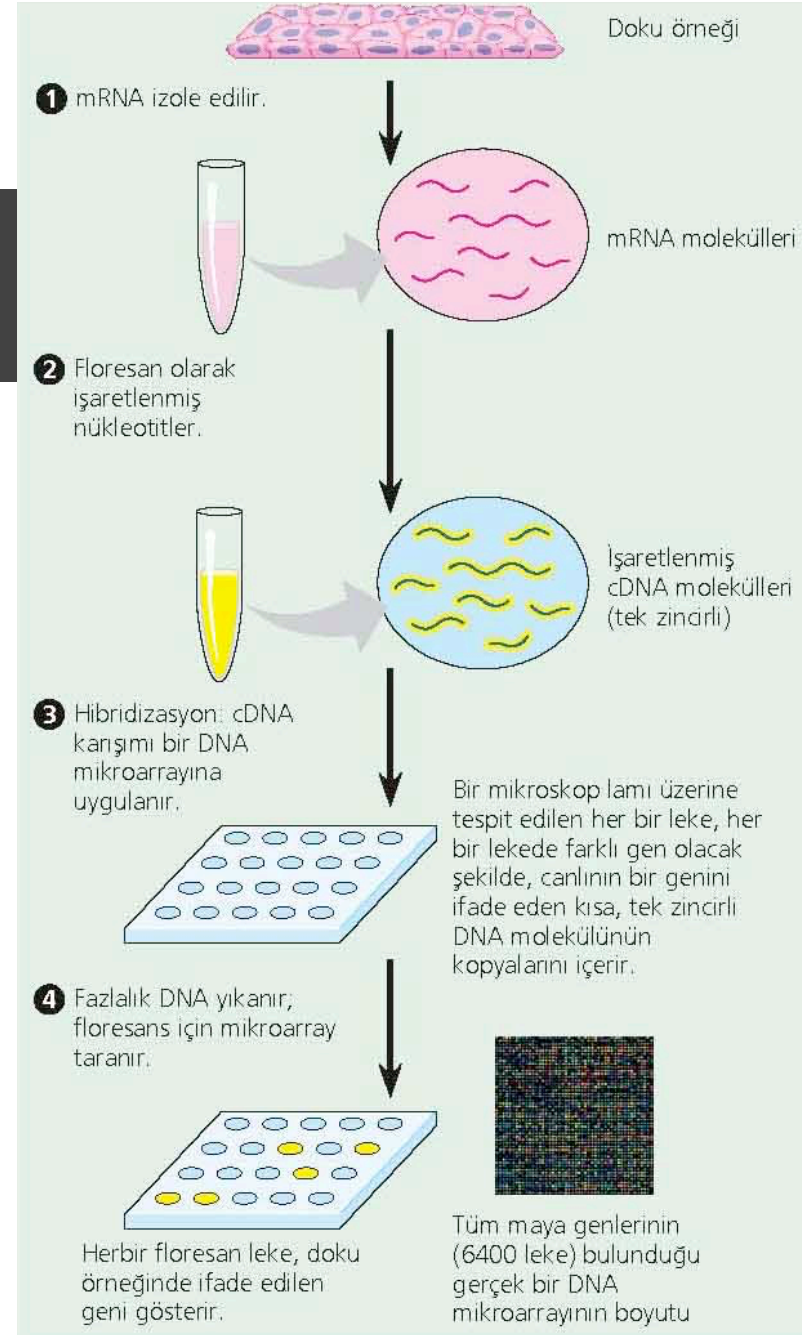
# DNA mikroarray

- Değişik koşullar altında hangi genlerin transkribe edildiği merak uyandıran bir konudur.
- Bunun belirlemek için ilgili hücrelerden mRNA izolasyonu gerçekleştirilir.
- Daha sonra revers transkriptaz ile bu mRNA'ların cDNA kopyaları sentezlenir.



# DNA mikroarray

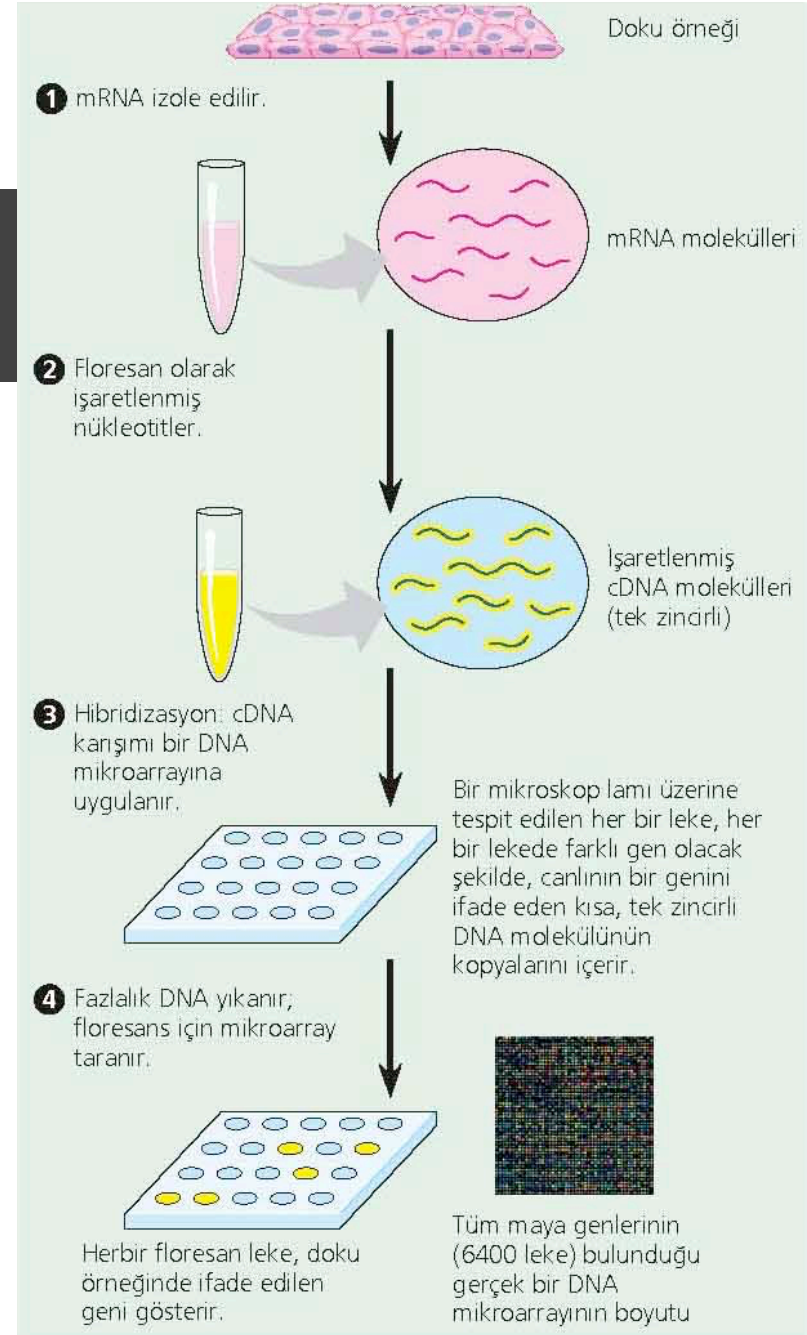
- Ardından bu kopyalar, aranan DNA dizilerine komplementer olacak şekilde hazırlanmış floresan etiketli problemlerle hibridizasyon işlemine tabi tutulurlar.





# DNA mikroarray

- Fazla prob yıkanarak uzaklaştırılır ve kalan floresan lekeler değerlendirilir.





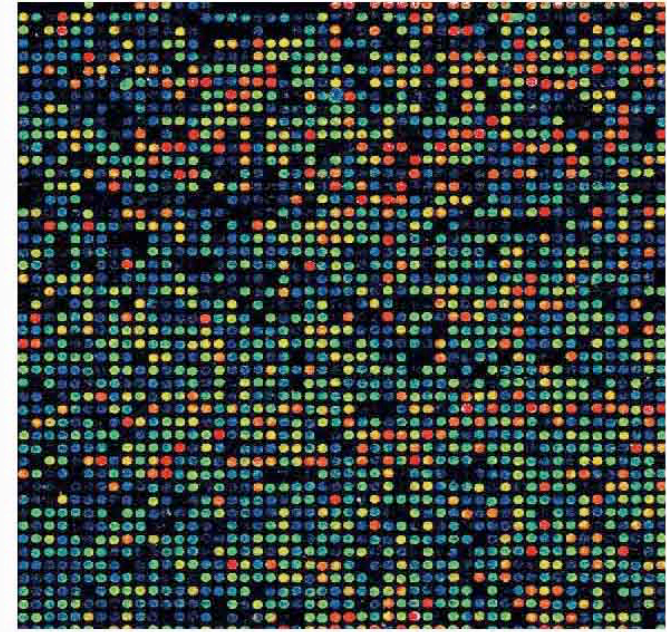
# DNA mikroarray teknolojisi ile;

- Gelişimin farklı evrelerinde,
- Farklı dokularda,
- Ya da sağlık açısından farklı fizyolojik evrelerdeki dokularda

hangi genlerin aktivite gösterdiği belirlenebilir.

# Aynı anda binlerce genin ifadesi tespit edilebilir

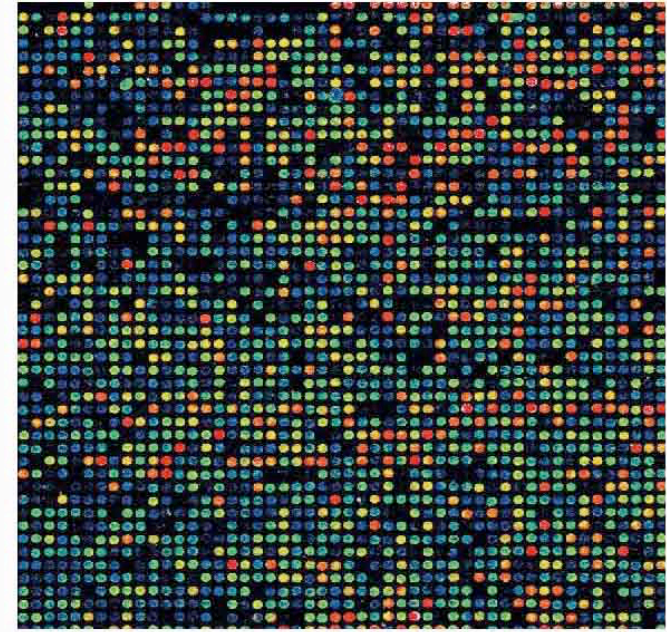
- Farklı genlere ait çok sayıda tek zincirli DNA fragmentlerini içeren çok az miktardaki örnek, bir lam üzerinde çok sıkı aralıklarla dizilir.
- Bu preparatlara DNA çipi adı verilmektedir.



(b) 2400 adet insan genini gösteren bir mikroarray büyütülmüş fotoğrafı

# Aynı anda binlerce genin ifadesi tespit edilebilir

- Bu fragmentler, floresan boyalarla işaretlenmiş cDNA molekülleri ile hibridizasyona uğratılarak test edilir.
- DNA çipleri ile normal ve kanserli hücreler arasındaki gen ifadesi farklılıkları tespit edilebilir.



(b) 2400 adet insan genini gösteren bir mikroarray büyütülmüş fotoğrafı

# Gen fonksiyonunun belirlenmesi (*In vitro* mutagenез)

- Araştırmacılar genlerin işlevlerini nasıl belirler?
- En temel yaklaşım *in vitro* mutagenез'dir.
- Genin baz dizisinde çeşitli değişiklikler yapılarak (yani mutasyon) tekrar hücreye aktarılır.
- Bu mutasyon proteinin fonksiyonunu değiştirebilir ya da ortadan kaldırabilir.

## Gen fonksiyonunun belirlenmesi (*In vitro* mutagenез)

- Mutant fenotip incelenerek kaybolan protein fonksiyonu tespit edilebilir.
- Hatta araştırmacılar mutant geni, erken evre fare embriyo hücrelerine aktararak embriyonik gelişimdeki rolünü incelemeye çalışırlar.

# RNA interferans (RNAi)

- Bu yöntem, gen ifadesini baskılayarak ortaya çıkan fenotipik değişikliği test etmenin etkili bir yoludur.
- Bu yöntemde, genin ürettiği mRNA'nın parçalanması için, ona komplementer sentetik RNA molekülleri kullanılır.
- Sentetik RNA molekülleri ile mRNA'nın oluşturduğu çift zincirli hibritler hücre tarafından yıkıma uğratılır.
- Böylelikle mRNA'nın taşıdığı mesaj ortadan kaldırılarak ilgili proteinin sentezi durdurulmuş olur.

## Çift zincirli RNA'nın yıkımı doğal bir savunmadır!

- Çift zincirli RNA'nın sitoplazmik yıkımı aşağıdaki biyolojik olayları gerçekleştirmek için geliştirilmiş doğal bir savunma mekanizmasıdır:
  - Hücrenin virüslerden korunması
  - Retrotranspozonların hareketinin engellenmesi

## Genomik araştırmalarının bir basamak ötesi (Proteomik)

- RNA'nın alternatif splicing işlemine tabi tutulması ve proteinlerin tranlasyon sonrası modifikasyonlara uğraması nedeniyle protein sayımız gen sayımızdan daha fazladır.
- Hücredeki anlık protein kompozisyonu, hücre tipine ve hücrenin o anki fizyolojik durumuna bağlı farklılıklar gösterecektir.
- Proteinlerin, hücresel aktiviteleri bizzat yöneten moleküller olmaları nedeniyle, hücre ve canlıların nasıl işlev gösterdiğini anlamak için proteinleri çalışmak zorundayız.



# Biyoinformatik

- Gerek genetik gerekse biyolojinin diğer alanlarında biriken bilgiler gün geçtikçe katlanarak artmaktadır.
- Bu kadar büyük bir bilgi yığınını anlamalı bir bütün haline getirmek için yetenekli bilgisayar yazılımlarına ihtiyaç vardır.
- Elde edilen biyolojik bilgilere bilgisayar biliminin ve matematiğin uygulanması ile ortaya çıkan alana biyoinformatik adı verilmektedir.

## İnsan türünün tarihsel geçmişi oldukça kısadır!

- Muhtemelen hepimiz, Afrika'da 150.000-200.000 yıl önce yaşayan küçük bir populasyondan gelmekteyiz.
- İnsan DNA'sındaki varyasyon miktarı, diğer türlerle kıyaslandığında oldukça küçüktür.
- Farklılıklarımızın büyük bir bölümü tek nükleotit polimorfizmlerinden (SNPs) kaynaklanmaktadır.

# İnsanlar birbirine benzer mi?

- SNP'lerin insan genomunda ortalama olarak her 1.000 baz çiftinde bir ortaya çıktığı düşünölmektedir.
- Yani kendi DNA dizimiz, yanımızda duran arkadaşımızinki ile yaklaşık olarak %98.0 oranında benzeşmektedir.

# SNP'lerin önemi

- Araştırmacılar insan genomundaki SNP'leri tanımlamak için büyük uğraş vermektedir.
- Bu bilgiler sayesinde, insan popülasyonları arasındaki farklılıklar tespit edilebilecek ve Afrika'dan diğer bölgelere olan göç yolları tanımlanabilecektir.
- Ayrıca, hastalıklardan sorumlu genler teşhis edilebilecek, çevresel toksinlere ya da ilaçlara duyarlılığı belirleyen genetik mekanizmalar aydınlatılabilecektir.

# DNA TEKNOLOJİSİNİN PRATİK UYGULAMALARI

# Hastalıkların tanısı

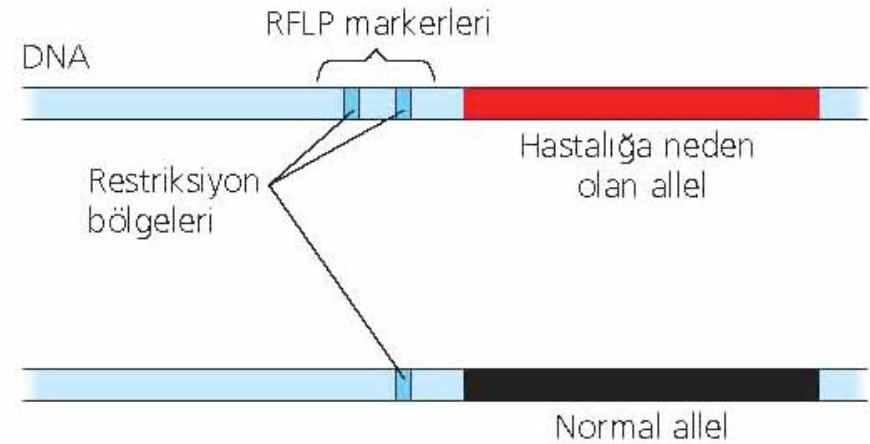
- PCR ya da işaretli nükleik asit problrarı kullanılarak herhangi bir dokudaki patojen DNA'sı tespit edilebilir.
- DNA teknolojisi sayesinde artık yüzlerce genetik bozukluk henüz belirti vermeden, hatta doğumdan önce bile tespit edilebilmektedir.
- Hemofili, kistik fibrozis, Duchenne kas distrofisi gibi genetik hastalıkların teşhisi bu duruma örnektir.

## PCR marker'ları kullanarak mutant allelin tespiti

- Genomumuzda çok sayıda RFLP marker'ı bulunmaktadır.
- Bunlar, restriksiyon enzimleri için spesifik kesim bölgeleridir.
- Kesim sonrasında elde edilen bantlar elektroforezde yürütülerek normal ve hasta kişilerin bant profilleri karşılaştırılır.

# PCR marker'ları kullanarak mutant allelin tespiti

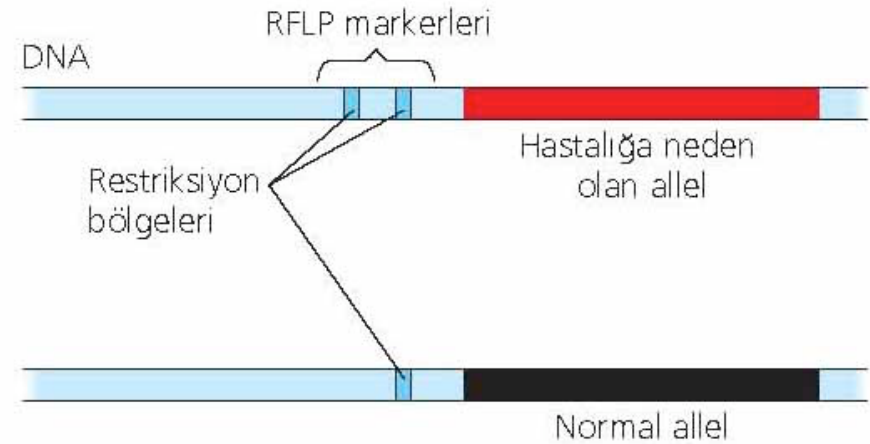
- Yandaki şekilde, bir genin yukarı kısmında bulunan RFLP marker'ları görülmektedir.
- Marker'lar, ilgili genlere çok yakın bölgelerde bulunduğundan, krossing-over sırasında ayrı düşme olasılıkları oldukça düşüktür.





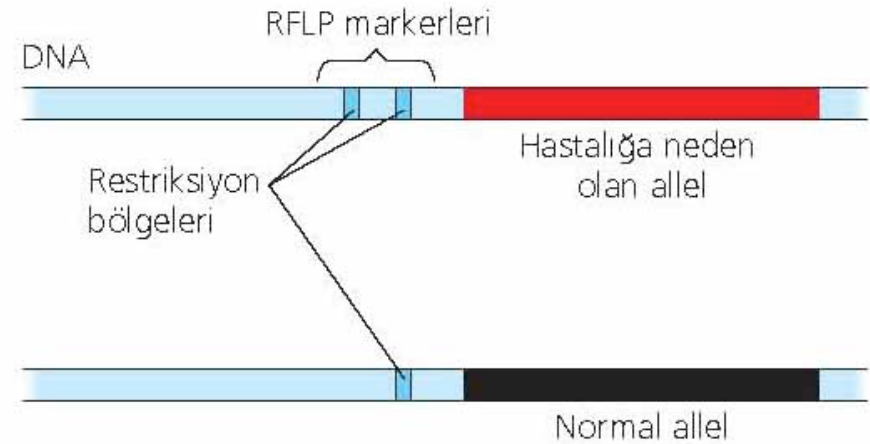
# PCR marker'ları kullanarak mutant allelin tespiti

- Bu nedenle çoğunlukla kromozom üzerindeki konumlarını koruma eğilimindedirler.
- Üstteki DNA'da genin yukarı kısmında iki kesim bölgesi bulunurken, alttaki DNA'da bir kesim bölgesi vardır.



# PCR marker'ları kullanarak mutant allelin tespiti

- Kesim uygulandığında üstteki DNA'dan daha fazla fragment oluşurken, alttakinden daha az fragment meydana gelecektir.
- Böylelikle elektroforezdeki bant profili farklılığından bireydeki genetik farklılık tespit edilebilir.

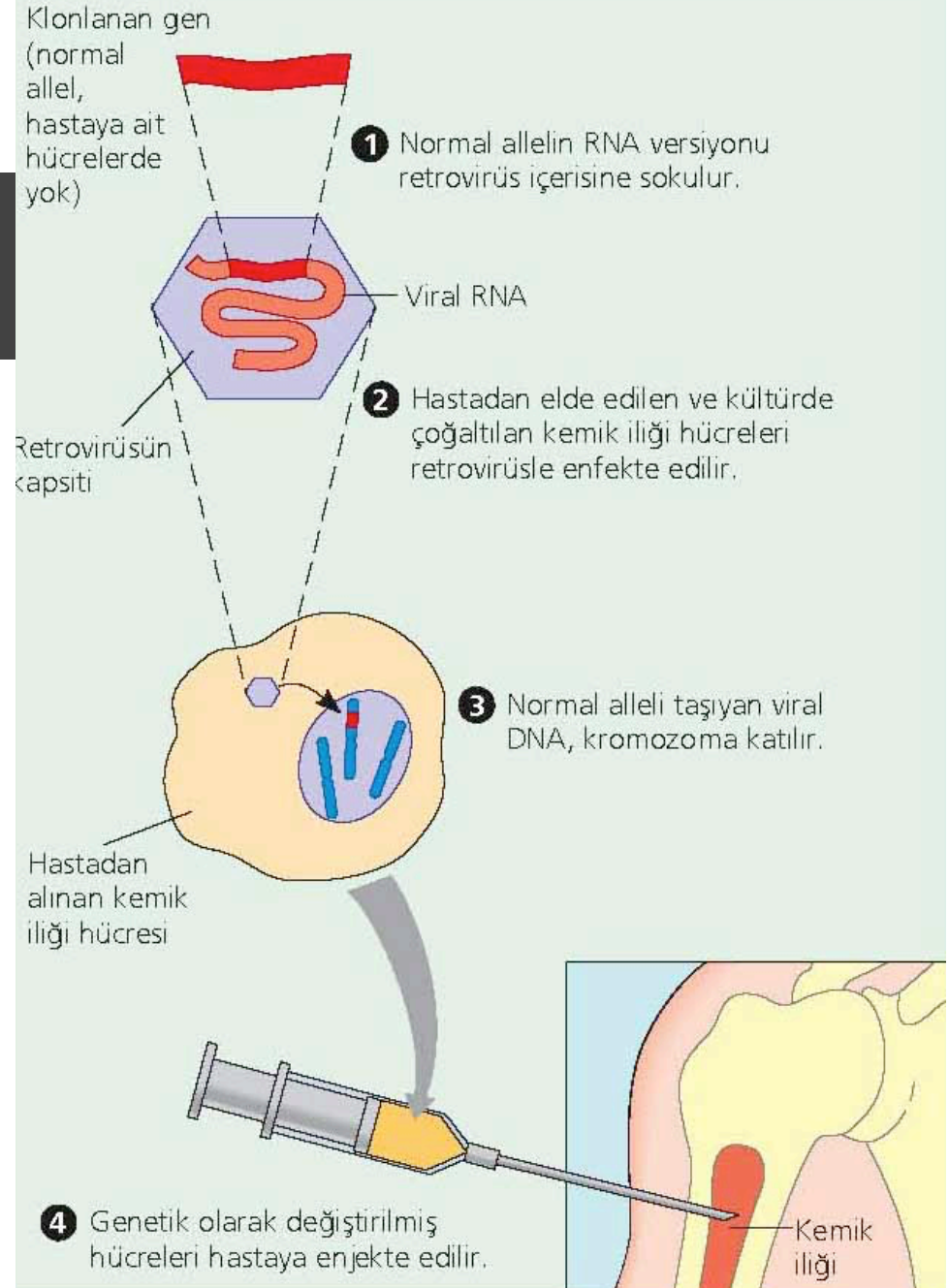


# Gen tedavisi

- Gen tedavisi, genetik hastalıkların tedavisinde önemli bir noktadır.
- Teorik olarak tek bir gene bağlı bozukluğu, sorunlu genin değiştirilmesi ile gidermek mümkündür.
- Günümüzde yalnızca somatik hücrelere gen aktarımına sınırlı ölçüde izin verilmektedir.
- Ancak tedavinin sürekli olabilmesi için, transgenik hücrelerin, hastanın yaşamı boyunca çoğalabilmesi gerekmektedir.

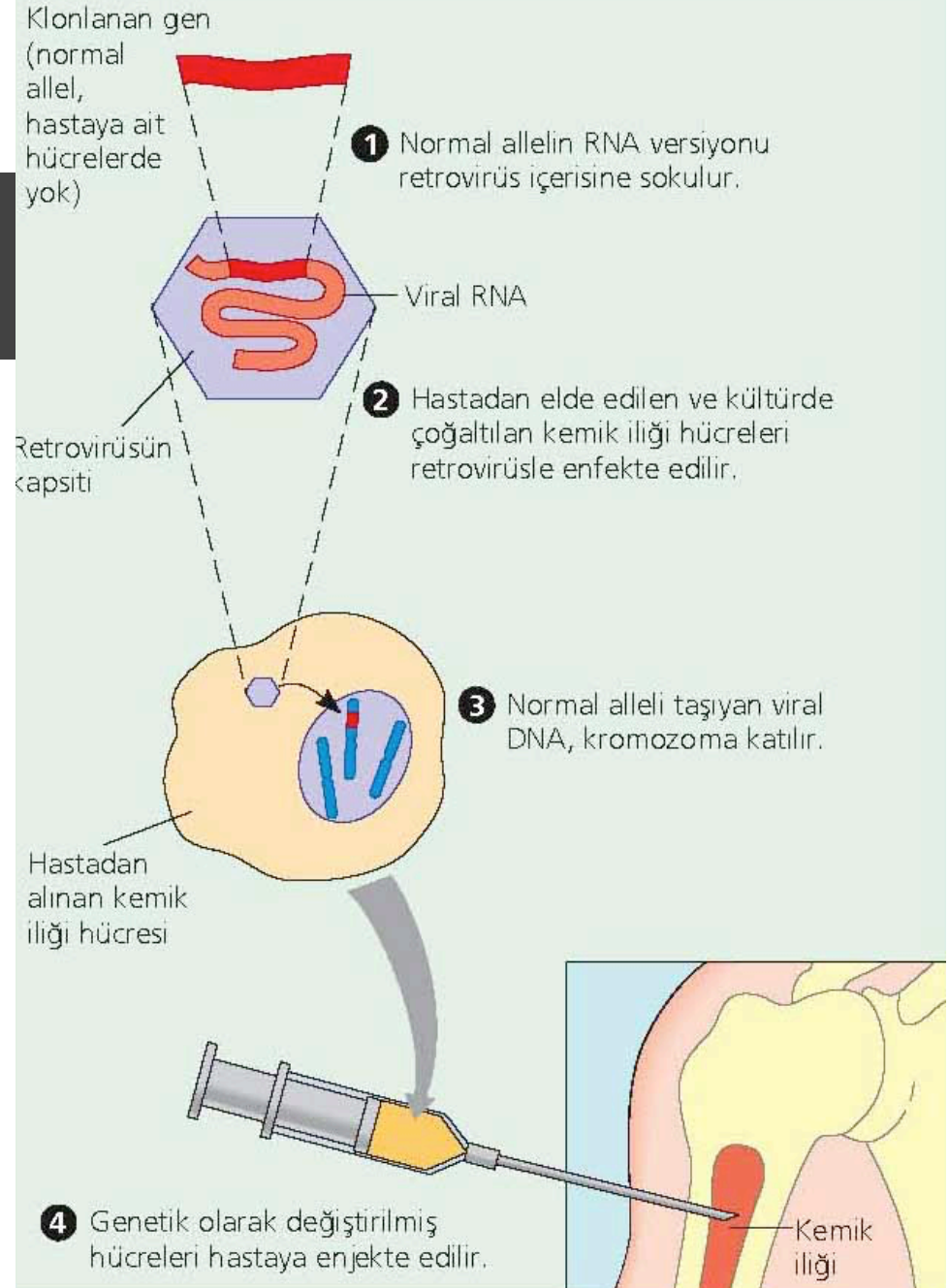
# Gen tedavisi

- Kemik iliği hücreleri bu konuda mükemmel birer adaydır.
- Yandaki şekilde, tek bir gendeki bozukluk nedeniyle önemli bir enzimi üretemeyen kemik iliği hücreleri örnek olarak verilmiştir.



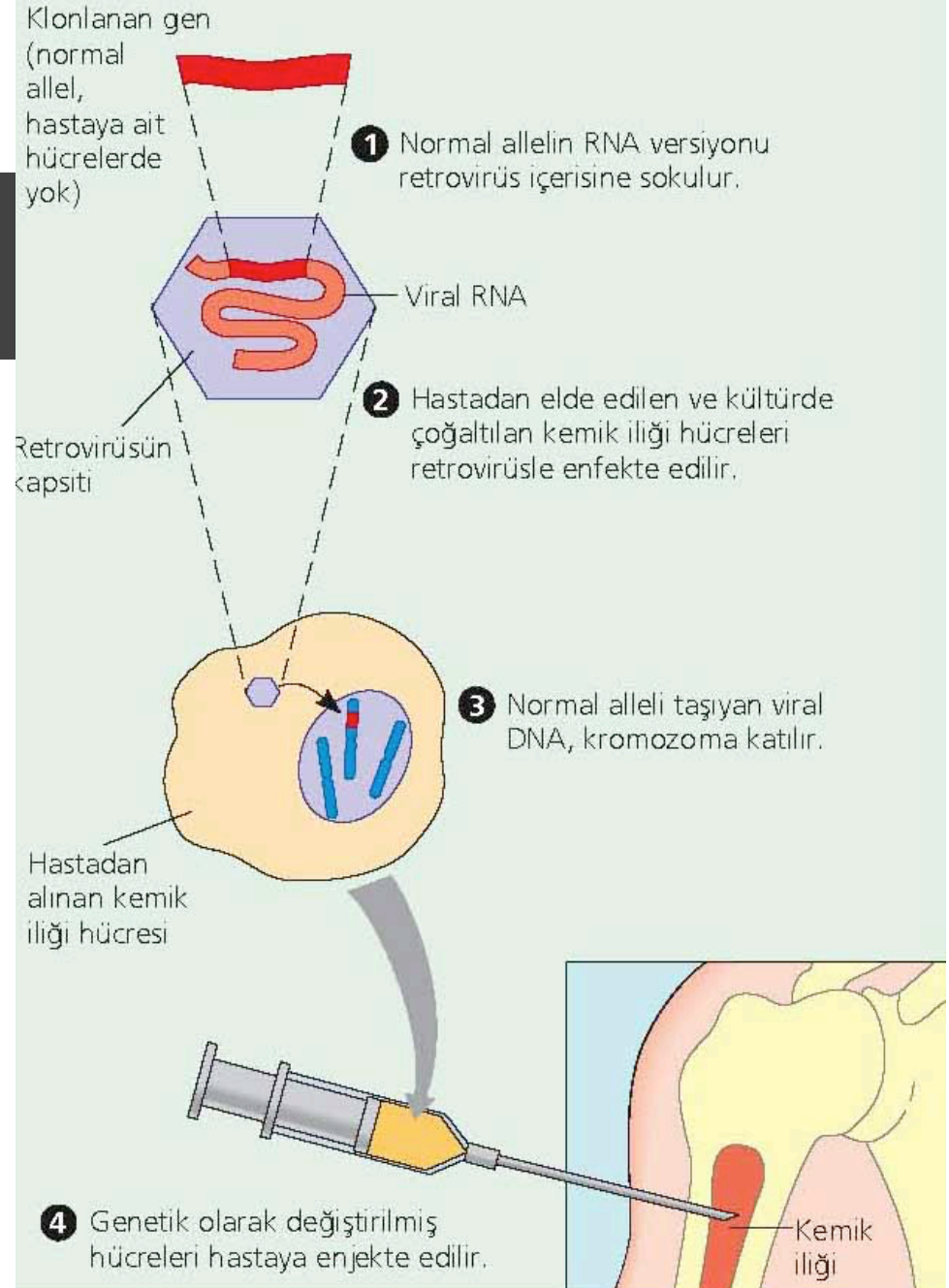
# Gen tedavisi

- Mutasyon taşıyan kemik iliği hastadan alınır.
- Bu hücreler, normal genin RNA kopyası ile manüple edilmiş virüslerle enfekte edilir.



# Gen tedavisi

- Virüs, ilgili RNA kopyasının cDNA'sını konak kromozomuna entegre eder.
- Eğer işlem başarılı olursa, bu hücreler hastanın yaşamı boyunca çoğalacak ve normal geni ifade edecektir.



# Gen terapisi ile koroner arter hastalığının tedavisi

- Son yıllarda araştırcılar, bloke olmuş arterler etrafında yeni kan damarlarının gelişimini uyaran büyüme faktörü geni üzerinde çalışmaktadırlar.
- Temel hedef, bu geni kalp kası hücrelerine aktararak kriz geçirmiş hastalarda yeni arter oluşumunu teşvik etmektir.
- Domuzlar üzerinde yapılan çalışmalar oldukça ümit vaat etmektedir.
- Gen aktarımı, yeni kan damarlarının gelişimini uyaran geni içeren adenovirüsleri ile gerçekleştirilmektedir.



# Gen tedavisinin etik ve sosyal boyutu

- Bazı kesimler, somatik hücrelere uygulansa bile, insan genleri ile oynamanın doğru olmadığını düşünmektedir.
- Bu kesimler, gen terapisi yoluyla insanın genetik açıdan islah edilmek istendiğini öne sürmektedir.
- Dolayısıyla insan popülasyonlarının genetik yapısının kontrol edilmesinin sakıncalı olduğu düşünölmektedir.
- Gen tedavisindeki en sıcak tartışma konusu ise üreme hücrelerine ya da embriyolara müdahale edilmesidir.



# Gen tedavisinin etik ve sosyal boyutu

- Çünkü germ hattına yapılan her müdahale, aynı zamanda insanın evrimine yapılan müdahaledir.
- İstenmeyen allellerin populadyondan ayıklanması biyolojik açıdan geri tepebilir.
- Çünkü bazı mutant genler, farklı çevresel koşullar altında fayda sağlayabilmektedir.
- Orak hücre anemisi hastalarının sıtmaya karşı doğal dirençli olması buna güzel bir örnektir.

## Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen eczacılık rnleri

- ▣ Bu teknoloji, çoğunluğu protein olmak üzere pekçok eczacılık ürününün üretilmesine olanak vermiştir.
  - ▣ İnsülin hormonu
  - ▣ İnsan büyüme hormonu (HGH)
  - ▣ Doku plazminojen aktivatörü (TPA)
  - ▣ Taklit reseptörler
  - ▣ Alt nite aşıları

# İnsülin hormonu

- Şeker hastalarının tedavisinde kullanılan insülin hormonu önceleri sığır veya domuz pankreasından elde ediliyordu.
- Ancak bu kaynaklardan temin edilen insülin ile insan insülini arasında birkaç aminoasitlik farklılık bulunduğundan, bazen immün yanıt gelişebiliyordu.
- İnsan insülin geni klonlanarak kültürde kolaylıkla üretilebilen bir mikroorganizmaya aktarılmış ve bol miktarda üretimi sağlanmıştır.

# İnsan büyüme hormonu (HGH)

- Büyüme hormonu seviyesi düşük doğan çocuklar cücelik (hipopituitarizm) hastalığından muzdariptirler.
- Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen büyüme hormonu bu hastalar için nimet olmuştur.
- Bu hormon aynı zamanda yaraların hızlı iyileşmesinde de kullanılmaktadır.

## Doku plazminojen aktivatörü (TPA)

- Bu madde, kalp krizi vakalarında son derece önemlidir.
- İlk kriz atağından kısa bir süre sonra alınırsa, kan pıhtısını çözer ve sonraki kalp krizlerinin meydana gelme riskini azaltır.
- Ancak TPA'nın üretim maliyeti yüksek ve market hacmi oldukça sınırlıdır.

# Taklit reseptörler

- Son yıllarda, hücre yüzeyinde bulunan reseptörleri bloke eden ya da onları taklit eden proteinlerin üretimi üzerinde çalışılmaktadır.
- Bu amaçla geliştirilmiş olan deneysel bir ilaç molekülü, HIV'in beyaz kan hücrelerine girmek için bağlandığı bir reseptör proteini taklit eder.
- Bu durumda HIV, beyaz kan hücrelerine bağlanmak yerine, ilaç moleküllerine bağlanır ve hücrelere giremez.

## Alt ünite aşıları

- Aşılar, hastalık etkenlerine karşı vücuda hazırlıklı hale getirmek için kullanılan önleyici tıbbi ajanlardır.
- Mikroorganizmalar öldürülerek ya da patojeniteleri zayıflatılarak aşı olarak kullanılabilir.
- Ancak bu aşıların saklanmaları zordur, koruyuculukları kısa sürebilmekte ya da hastada şiddetli immün yanıt gelişebilmektedir.
- Rekombinant DNA teknolojisi ile üretilen alt ünite aşıları bu alanda devrim niteliğindedir.

## Alt ünite aşıları

- Örneğin hepatit B virüsüne karşı bağışıklık oluşturmak için virüsün tamamının kullanılması yerine, rekombinant DNA teknolojisi yoluyla alt ünitesi olan kapsitinin kullanılması önemli bir gelişmedir.
- Virüsün tamamı kullanılmadığı için, hastalık gelişim riski olmamakta ve antijenik reaksiyonun oluşmasını sağlayan kapsit kısmı ile yeterli bağışıklık yanıtı elde edilebilmektedir.

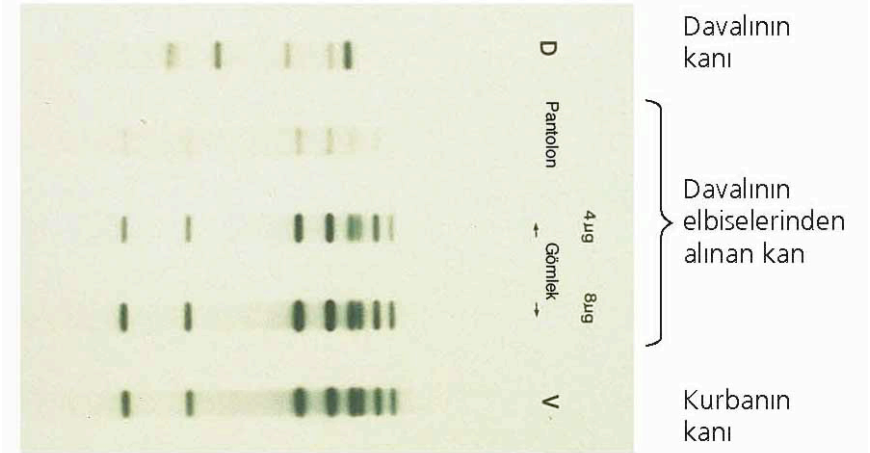


# DNA parmak izi adli açıdan önemli bir delildir!

- Tek yumurta ikizleri hariç, her bireyin DNA'sı kendine özgü bir dizilime sahiptir.
- RFLP analizi, DNA örneklerindeki benzerlik ya da farklılıkların kriminal tespitinin yapılabilidiği güçlü bir yöntemdir.
- Cinayet durumunda şüpheliden, kurban ve olay yerinden elde edilen az miktardaki kan, vücut sıvısı veya doku örneğinin DNA'sı bu yöntemle karşılaştırılabilir.

# DNA parmak izi adli açıdan önemli bir delildir!

- Her birey kriminal açıdan kendine özgü bir bant profili modeli oluşturur.
- Buna, o bireyin DNA parmak izi adı verilir.



**ŞEKİL 20.17 Bir cinayet olayından elde edilen DNA parmak izleri.** RFLP analizinin gösterdiği gibi, davalının giyecekleri üzerindeki kan lekelerinden elde edilen DNA, kurbanının DNA parmak izine uymakta, ancak davalının DNA parmak izinden farklılık göstermektedir. Bu, davalının giyecekleri üzerindeki kanın kurbandan geldiğinin, davalıya ait olmadığını kanıtlar. Buradaki "otorad" (otoradyograf) üzerinde farklı yerlerde on farklı RFLP markerinin olduğu görülmektedir. Günümüzde, test edilen her bir marker için ayrı ayrı otoradların yapılması daha yaygındır. Elektroforez sonucu meydana gelen DNA bantları, bir sonraki uygulanmadan önce bir önceki prob yıkılarak sırayla değişik problarla reakte edilir.

Cellmark Diagnostics, Germantown, MD

# Babalık kaosunun çözümünde DNA parmak izi!

- Bu teknikte annenin, çocuğun ve babası olduğu düşünülen kişinin DNA'ları karşılaştırılarak babalık konusu kesin olarak çözülebilir.
- Örneğin, Thomas Jefferson'un kölesi olan Sally Hemings'in çocuklarından en az birisinin babasının Thomas Jefferson olduğu DNA parmak izi yöntemiyle kanıtlanmıştır.



**Thomas Jefferson**  
**(ABD'nin üçüncü başkanı)**

## DNA parmak izi çalışmalarında uydu (satellite) DNA'nın kullanımı

- Günümüzde DNA parmak izi çalışmalarında satellit DNA sıklıkla kullanılmaktadır.
- Satellit DNA, genom içinde birbiri ardına dizilmiş çok sayıda baz dizisinden oluşur.
- Kriminal açıdan en kullanışlı olan diziler mikrosatellitler'dir.
- Birkaç baz çiftlik tekrarlar halinde 10-100 baz çifti uzunluğundadırlar.

## DNA parmak izi çalışmalarında uydu (satellite) DNA'nın kullanımı

- Örneğin, bir birey belirli bir mikrosatellit lokusunda 65 kez tekrarlanmış ACA dizisine sahip iken, diğer bireyde bu sayı değişebilir.
- Genetik açıdan polimorfik olan bu lokuslar, basit artarda tekrarlar (STR'ler) olarak adlandırılır.
- Tekrar sayısı farklılıklarından dolayı bireyler arasındaki STR uzunlukları değişiklik gösterecektir.
- Bu durum, elektroforezde görülen DNA parmak izinin farklı olmasına yol açacaktır.

## Hangisi daha kuvvetli delildir? Görgü tanığı mı yoksa DNA mı?

- İki farklı kişinin aynı DNA parmak izine sahip olma olasılığı 100.000'de 1 ile milyonda 1 aralığında değişmektedir.
- Bu durum, kişiler arasında karşılaştırılan RFLP marker'ı sayısına ve bu marker'ların populasyondaki sıklığına bağlıdır.
- Bazı çevreler, bu olasılıktan dolayı DNA'dan elde edilen bilgiden ziyade, görgü tanıklarının ifadelerinin daha değerli olduğunu düşünmektedir.

# DNA teknolojisinin çevresel yonden kullanımı

- Mikroorganizmaların kimyasal maddeleri değişikliğe uğratma yetenekleri önemlidir.
- Araştırmacılar, evresel problemlerin çözümüne yardımcı olabilecek canlılar dizayn etmeye çalışmaktadır.
- Örneğin, pekçok bakteri bakır, kurşun ve nikel gibi ağır metalleri çevreden alarak bakır sülfat ya da demir sülfata dönüştürür.

# Mikroorganizmalarla detoksifikasyon

- Lağım sularının artıldığı sistemlerde, toksik organik bileşikleri, toksik olmayan forma parçalayan mikroorganizmalardan faydalanılır.
- Her geçen gün çevreye daha fazla miktarda bırakılan klorlu hidrokarbonlar da yine mikroorganizmalar tarafından detoksifiye edilebilir.



# Mikroorganizmalarla detoksifikasyon

- Ayrıca bakteriler petrol atıklarının parçalanması konusunda da yeteneklidir.
- Bu özellik diğer canlılara da aktarılarak, onların da çevresel felaketlerin neden olduğu zor koşullar altında hayatta kalmaları sağlanmaya çalışılmaktadır.



# Hayvan yetiştiriciliğinde DNA teknolojisi

- Bu teknoloji günümüzde çiftlik hayvanları yoluyla aşı ve diğer değerli proteinlerin üretiminde kullanılmaktadır.
- Bir başka türün genlerini taşıyan canlıya transgenik canlı adı verilmektedir.
- DNA teknolojisi sayesinde ayrıca;
  - Daha iyi kalitede yöne sahip koyun
  - Az yağlı ete sahip bir domuz veya
  - Daha hızlı büyüyen bir inek elde edilebilir.

# Hayvan yetiştiriciliğinde DNA teknolojisi

- Transgenik hayvanlar az miktarda bulunan biyolojik bir maddeyi fazla miktarda üretmek üzere programlanabilir.
- Bu maddelere hormon ya da kan pıhtılaşma faktörleri örnek verilebilir.



**ŞEKİL 20.18 "Eczacılık" hayvanları.** Bu transgenik koyunlar, bir insan kan proteini için gen taşımaktadırlar; bu koyunlar, bu proteini kendi sütlerinin içerisine salgırlar. Bu protein, sistik fibrozis ve diğer bazı kronik akciğer hastalıklarına sahip hastalarda, akciğer harabiyetine katkı yapan bir enzimi etkisiz hale getirmektedir. Koyunların sütünden kolayca saflaştırılan bu protein, günümüzde, sistik fibrozisin tedavisinde deneme kabiline kullanılmaktadır.

## Transgenik bir hayvan nasıl elde edilir?

- Öncelikle dişi bir hayvandan yumurta hücresi alınır ve *in vitro* koşullarda döllendir.
- Oluşan zigot ilk mitoz bölünmeyi geçirmeden önce aktarılmak istenen gen mikroenjeksiyon ya da başka bir yöntemle aktarılır.
- Daha sonra embriyo gelişiminin belirli bir aşamasında bulunan bu embriyo taşıyıcı annenin rahmine yerleştirilir.
- Eğer embriyo başarılı bir şekilde gelişirse, tüm hücrelerinde yabancı DNA'yı taşıyan transgenik bir yavru canlı oluşur.

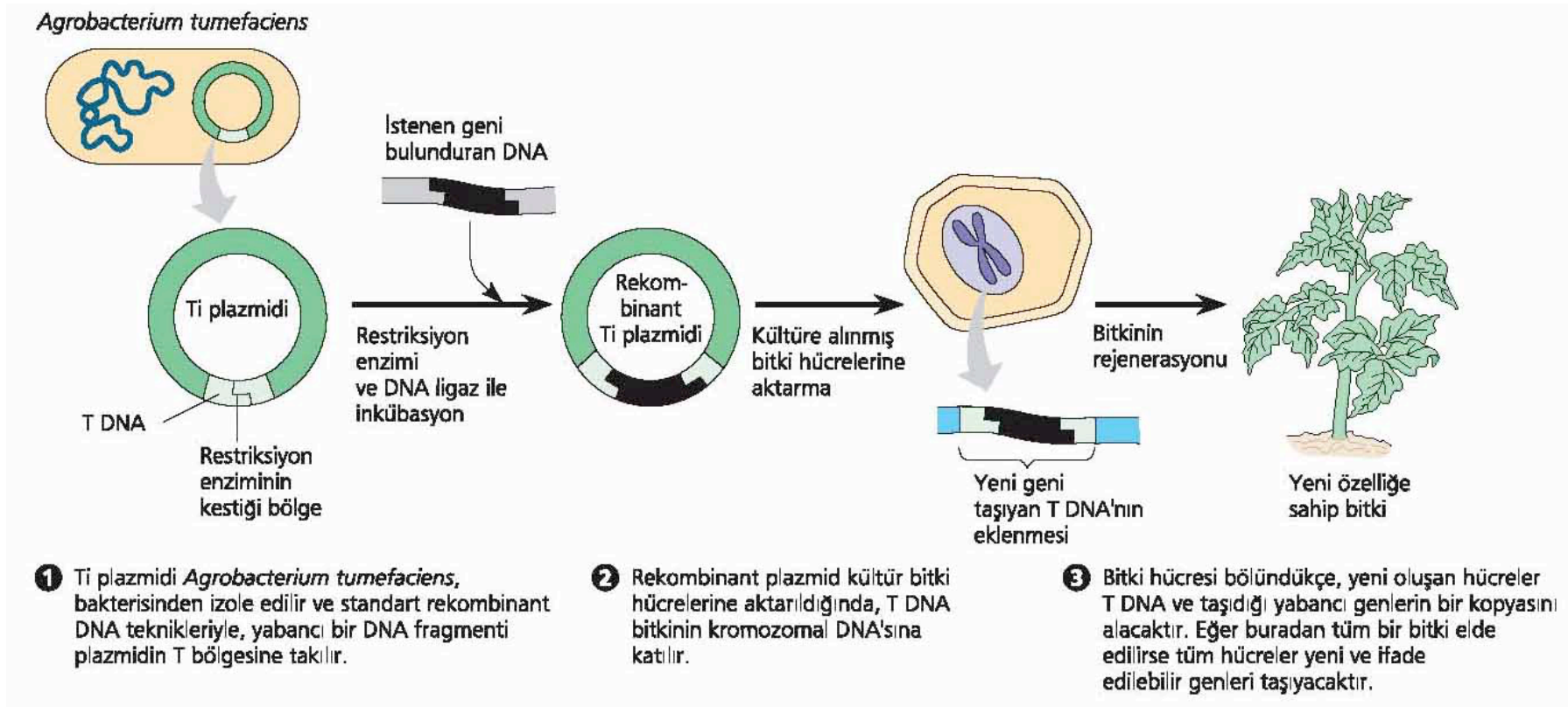
# Bitkilerde genetik mühendislik

- Bitkileri genetik olarak değiştirmek pekçok hayvana göre daha kolaydır.
- Bitkilere gen aktarımında genellikle bir toprak grubu bakterisi olan *Agrobacterium tumefaciens*'in Ti plazmidi kullanılır.
- Ti plazmidi içinde T-DNA adı verilen bir bölge bulunur.
- *Agrobacterium* tarafından enfekte edilen bitki hücrelerine, Ti plazmidi içinde bulunan bu T-DNA bölgesi aktarılır.

# Bitkilerde genetik mühendislik

- Eğer T-DNA bölgesine yabancı bir DNA parçası eklenecek olursa, bakterinin bitkiyi enfeksiyonu sırasında bu DNA da bitkiye taşınacaktır.
- Aktarılan T-DNA bitki hücresinin kromozomuna entegre olur.
- Böylelikle genetiği değiştirilmiş başlangıç hücresinden meydana gelen yeni bitkinin tüm hücreleri aktarılan geni taşıyacaktır.

# Bitkilerde genetik mühendislik



## Ti plazmidinin kullanımına ilişkin sınırlamalar

- *Agrobacterium* enfeksiyonuna sadece dikotiledon bitkiler duyarlıdır.
- Ancak mısır ve buğday gibi önemli monokotiledonlar *Agrobacterium* ile enfekte olmazlar.
- Bu tip hücrelere DNA aktarımı elektroporasyon ya da DNA tabancası gibi yöntemlerle gerçekleştirilebilir.



# Genetiği değiştirilmiş bitkiler

- Son yıllarda Amerikan menşeli soya ve mısır ürünlerinin yarısından fazlasının genetiği değiştirilmiştir.
- Transgenik bitkilerin pek çoğuna herbisit dirençlilik genleri aktarılmaktadır.
- Bu sayede yabancı otları öldürmek için kullanılan kimyasallar, kültür bitkisine zarar vermemektedir.
- Bitkilere ayrıca böceklerle dirençlilik genleri aktarılarak kimyasal insektisit kullanımı azaltılmaktadır.

# Altın pirinç

- Gen aktarımı aynı zamanda kültür bitkilerinin besinsel kalitesinin artırılması için de uygulanmaktadır.
- Altın pirinç bunun en çarpıcı örneklerinden birisidir.



**ŞEKİL 20.20 Doğal pirince benzemeyen “altın” pirinç.** Fotoğrafta görülen altın pirinç tanelerindeki beta-karoten, hem renk oluşumundan ve hem de pirincin besin değerinin artışından sorumludur. Bitkilere taneleri içerisinde bu vitamini yapabilme yeteneğini veren genler, nergisten ve bir bakteriden gelmektedir. Vektör, olarak *Agrobacterium fascians*'ın Ti plazmidini kullanılmıştır.

# Altın pirinç

- Altın pirinç aslında transgenik bir pirinç bitkisidir.
- Bu pirinç A vitamini yapımında kullandığımız beta karoten'i yüksek miktarda içerdiğinden sarı renklidir.



**ŞEKİL 20.20 Doğal pirince benzemeyen “altın” pirinç.** Fotoğrafta görülen altın pirinç tanelerindeki beta-karoten, hem renk oluşumundan ve hem de pirincin besin değerinin artışından sorumludur. Bitkilere taneleri içerisinde bu vitamini yapabilme yeteneğini veren genler, nergisten ve bir bakteriden gelmektedir. Vektör, olarak *Agrobacterium fascians*'ın Ti plazmidini kullanılmıştır.

# Altın pirinç

- A vitamini eksikliğine bağlı görme bozukluklarının tedavisinde önemli bir alternatiftir.
- Çünkü Güneydoğu Asya'da 5 yaşın altındaki çocukların %70'i A vitamini eksikliğinden mustarıptir.



**ŞEKİL 20.20 Doğal pirince benzemeyen "altın" pirinç.** Fotoğrafta görülen altın pirinç tanelerindeki beta-karoten, hem renk oluşumundan ve hem de pirincin besin değerinin artışından sorumludur. Bitkilere taneleri içerisinde bu vitamini yapabilme yeteneğini veren genler, nergisten ve bir bakteriden gelmektedir. Vektör, olarak *Agrobacterium fascians*'ın Ti plazmidini kullanılmıştır.

# Azot fiksasyonunun artırılması

- Bitkilerin fizyolojik gelişimi için atmosferdeki azot gazının fikse edilmesi gerekir.
- Bitkiler azotlu bileşikleri aminoasitler gibi azot içeren bileşiklere dönüştürürler.
- Azot fiksasyonu, toprakta ya da bitkinin köklerinde bulunan bazı bakteriler tarafından gerçekleştirilir.

# Azot fiksasyonunun artırılması

- Yeterli azot sağlanamadığı durumda azotlu gübrelerin kullanılması gerekir.
- Ancak bu gübrelerin maliyeti yüksektir ve su kirliliğine yol açar.
- DNA teknolojisi sayesinde azot fiksasyon yeteneği daha yüksek olan bakteri türleri dizayn edilebilir.

# Güvenlik ve etik kaygılar

- DNA teknolojisindeki yeteneklerimiz arttıkça, potansiyel tehlikeleri konusundaki kaygılarımız da artmaya başlamıştır.
- Ortaya çıkabilecek sorunların önüne geçebilmek için ülkeler tarafından bazı yasalar çıkarılmıştır.
- Genetiği değiştirilmiş mikroorganizmaların kontrolsüz bir şekilde laboratuvardan yayılmasını engellemek için sıkı laboratuvar kuralları geliştirilmiştir.

# Güvenlik ve etik kaygılar

- Ayrıca, bu mikroorganizmaların laboratuvar dışında canlılığını sürdürmemesi için genetik yapıları bozulmaktadır.
- Tehlikeli olduğu açıkça bilinen türlerle çalışmak ise yasaklanmıştır.
- Asıl toplumsal endişe, mikroorganizmalardan ziyade genetiği değiştirilmiş (GM) gıdalara yöneliktir.



# Güvenlik ve etik kaygılar

- 1999 yılında İngiltere'de GM gıdalara yönelik bir tartışma patlak vermiş ve kısa sürede tüm Avrupa'ya yayılmıştır.
- Yeni yasal düzenlemeler yapılana dek Avrupa Birliği'ne GM gıdaların girişi durdurulmuştur.
- Günümüzde GM gıdaların işaretlenmesi tartışılmaktadır.

# Biyogüvenlik protokolü

- 2000'li yıllarda 130 ülke, ihracatçıların gemilere yükledikleri gıdalarda bulunan GM ürünleri etiketlemeleri konusunda görüş birliğine varmışlardır.
- Böylelikle ürünü alan ülke, çevresel ya da sağlık açısından risk altında olup olmadığını belirleyebilecektir.

# Süper yabancı otlar

- Herbisitlere, hastalıklara ya da zararlı böceklere direnç genleri taşıyan kültür bitkileri, yabancı bir bitkiyle tozlaşırsa bu özellikleri o bitkilere aktarabilirler.
- Bu durumda kontrolü zor 'süper yabancı otlar' meydana gelebilir.
- Bu tip tozlaşmaların engellenmesi için araştırmacılar tarafından gerekli biyolojik önlemlerin alınması gerekmektedir.

## Bazı kritik sorularla bitirelim!

- İnsan genomunun haritalanması bazı önemli etik soruları gündeme getirmiştir:
  - Birilerinin genlerini inceleme hakkına kimler sahip olmalıdır?
  - Bu bilgiler nasıl kullanılacaktır?
  - Bir kişinin genomu, bir işe uygunluk ya da sigorta şirketleri açısından belirleyici bir faktör olarak değerlendirilmeli midir?