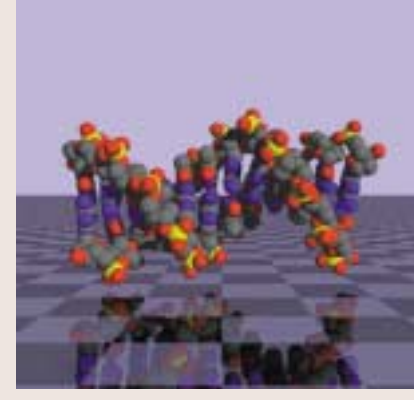


DNA

DEOKSİRİBONÜKLEİK ASİT



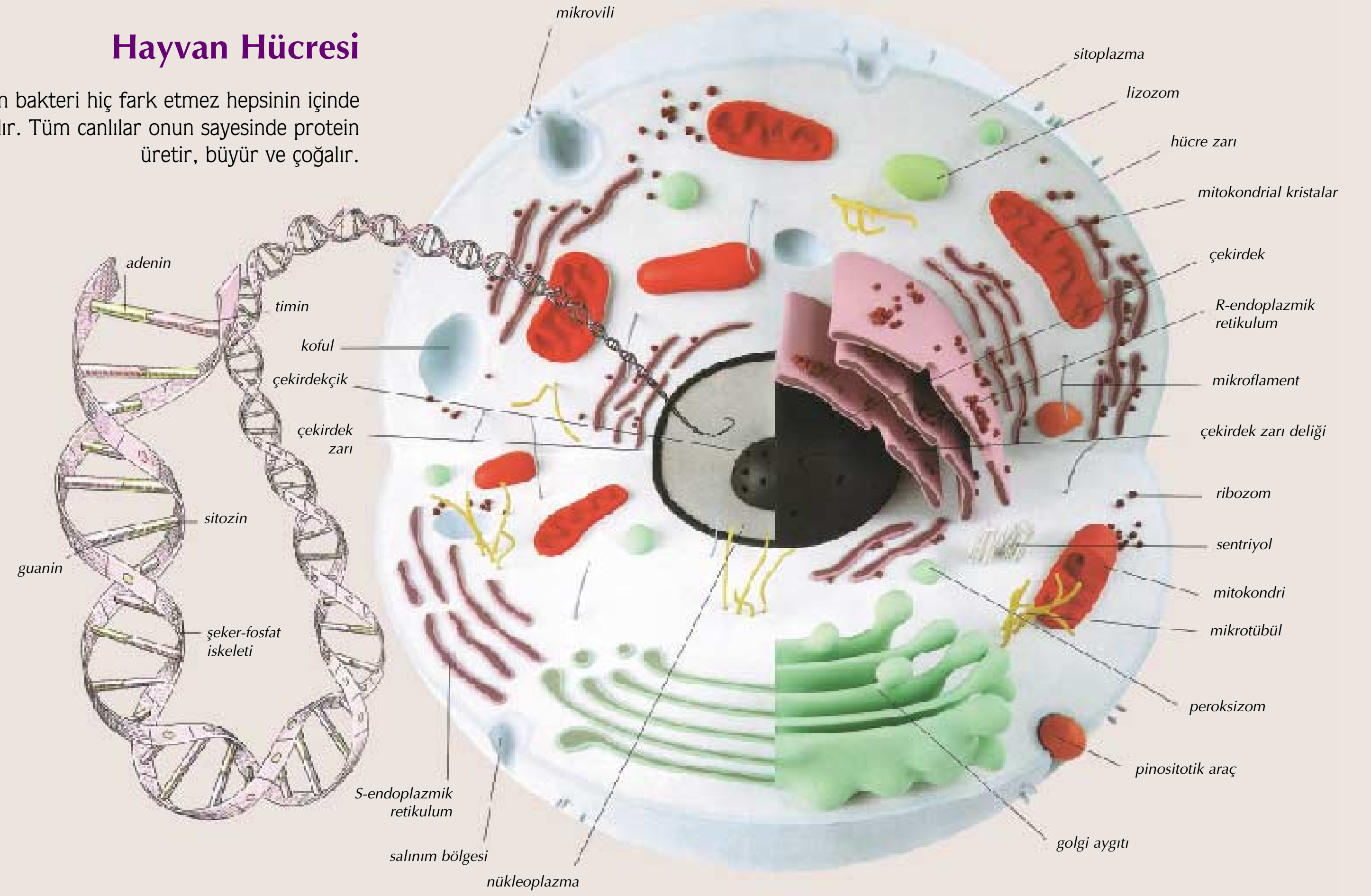
Deoksiribonükleik asit, DNA, hücrelerin bilgi deposudur. Bir hücreyi ya da organizmayı oluşturmak için gerekli tüm bilgileri içerir. Diğer pek çok iletişim sisteminde olduğu gibi bu bilgiler de kodlanmış olarak taşınır. DNA'nın yapı taşları nükleotid denilen moleküllerdir. Nükleotidler üç bölümden oluşur: Bir fosfat grubu, beş karbonu bulunan bir şeker ve bir organik baz (adenin, guanin, sitozin ya da timin). Nükleotidin şeker parçasındaki karbonlar, baz ve fosfat gruplarının bağlanması için gereklidir.

Bu şekerin 1' numaralı karbonu baz molekülüyle, 5' ucundaki grubuyla fosfatla bağlanır. Böylece oluşan nükleotidler birbirleriyle özel bir şekilde birleşerek, polinükleotid zincirlerini oluştururlar. Bu birleşimde her zaman ilk nükleotidin şekerinin 3' grubuyla, buna eklenecek nükleotidin 5' ucunda bulunan fosfat grubu birleşir. Bu nedenle polinükleotid zincirleri belli bir yöne sahip olur (5' dan 3' a doğru). DNA molekülü, iki polinükleotid zincirinin birbirine sarılmasıyla oluşur. Şeker ve fosfattan oluşan iskelet bu ikili sarmalın dış bölümünü oluştururken, bazlar da sarmalın iç bölgesinde birbirleriyle karşılıklı olarak birleşirler. Bu baz çiftleri, sarmalda birbiri üzerine gelen paralel düzlemler oluştururlar. Sarmalı oluşturan polinükleotid zincirlerinin yönleri zıttır; birinin 5' ucu, diğerinin 3' ucuyla aynı yöndedir. Bu iki zincir, hidrofobik etkileşimlere ek olarak, karşılıklı dizilmiş bazlar arasında oluşan hidrojen bağları sayesinde bir arada tutulur. Adenin (A) her zaman timinle (T) birleşir ve aralarında 2 hidrojen bağı kurulur; guaninse (G) sitozinle (C) birleşir ve aralarında 3 hidrojen bağı kurulur.



Hayvan Hücresi

Bitki, hayvan bakteri hiç fark etmez hepsinin içinde DNA vardır. Tüm canlılar onun sayesinde protein üretir, büyür ve çoğalır.



DNA'nın Üç Farklı Formu

DNA'yı oluşturan polinükleotid zincirleri ya sağ ya da sol vida yönünde dönen sarmallar oluştururlar. Şeker-fosfat iskeletinin yapısının geometrisi bunlardan birincisine daha çok uyar. Bu yüzden normal DNA, sağ sarmal yönündedir. DNA'nın bu haline B-DNA denir.

B-DNA'da ikili sarmalın üst üste gelen baz çiftlerinin arası 0.34 nm'dir. Sarmalın tam bir dönüşüne karşılık gelen adımıysa 3.4 nm'dir, yani B-DNA'da her dönüşte 10 baz bulunur.

Bu formdaki DNA'da sarmalın dış kısmında düzenli olarak sıralanmış bir büyük bir küçük girinti vardır. Böylece buralara DNA'nın işlevini yapabilmesi için gereken moleküller bağlanabilir.

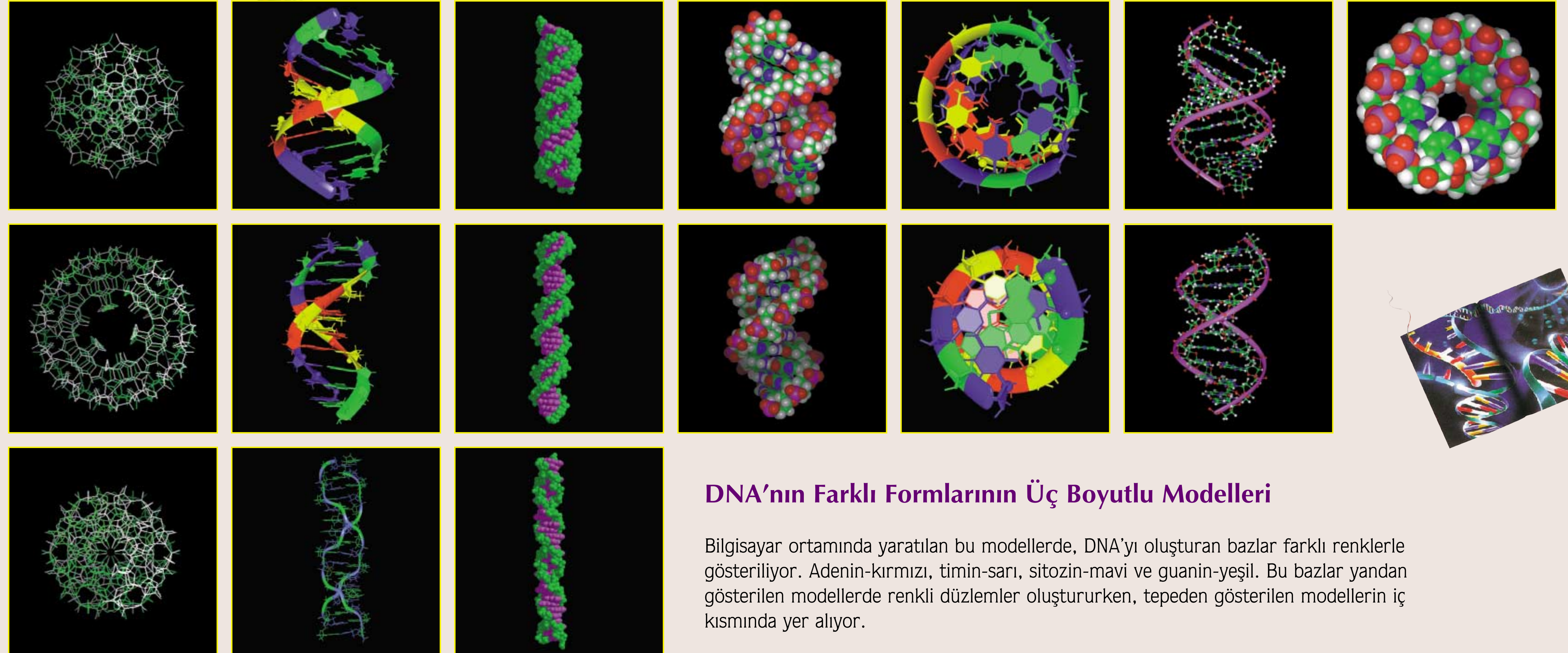
Yine sağ sarmal yapısında olan A-DNA, B-DNA'ya göre biraz daha sıkışık bir moleküldür. Sarmalın adımı 2.3 nm'dir ve 11 baz içerir. DNA bazı ortamlarda bu formda bulunabiliyor.

Z-DNA sol vida yönünde yapılanmış bir sarmaldır. Burada bazlar zikzak çizmiş gibi görünürler. Bu formun doğada bulunup bulunmadığı henüz bilinmiyor. Bu formda sarmallar iki yerine bir derin girinti oluşturuyor.

A-DNA

B-DNA

Z-DNA



DNA'nın Farklı Formlarının Üç Boyutlu Modelleri

Bilgisayar ortamında yaratılan bu modellerde, DNA'yı oluşturan bazlar farklı renklerle gösteriliyor. Adenin-kırmızı, timin-sarı, sitozin-mavi ve guanin-yeşil. Bu bazlar yandan gösterilen modellerde renkli düzlemler oluştururken, tepeden gösterilen modellerin iç kısmında yer alıyor.

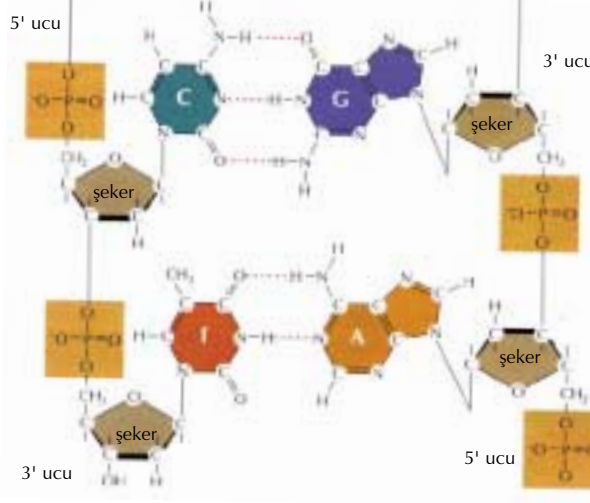
Genetik Mühendisliği



Genetik mühendisliği, canlıların genetik materyalinin, DNA kodunun, değiştirilmesini, organizma içinde ya da farklı organizmalar arasında nakledilmesini sağlayan teknikleri açıklamak için kullanılan bir terimdir. Bütün canlılar hücrelerinde DNA taşırlar. Bu nedenle söz konusu teknoloji, türü ne olursa olsun herhangi bir canlı üzerinde uygulanabilir. Yalnızca tarım ve hayvancılıkta değil, tıp alanında da yeni seçenekler sunan genetik mühendisliği, bozuk genleri düzeltme, bir organizmada normalde bulunan bir özelliği daha da geliştirme, hastalık ya da çevresel etkilere karşı direnci artırma ya da bir organizmaya normalde yapamadığı bir işi yaptırma gibi amaçlarla kullanılıyor. Bu teknolojiye kullanılan temel yöntem, istenilen genin çok miktarda üretilmesini sağlayan moleküler klonlamadır. Bu yöntemde çoğaltılacak gen, vektör adı verilen ve kendini kopyalayabilme özelliği olan başka bir DNA molekülüne birleştirilir. Böylece oluşan rekombinant molekül uygun bir taşıyıcı hücreye sokularak çoğaltılır. Moleküler klonlama, genlerin daha detaylı karakterizasyonunu ya da gen ürünlerinin çok miktarda üretilmesini olanaklı kılar. Bu posterde genetik mühendisliğinin bazı temel tekniklerini sunuyoruz.

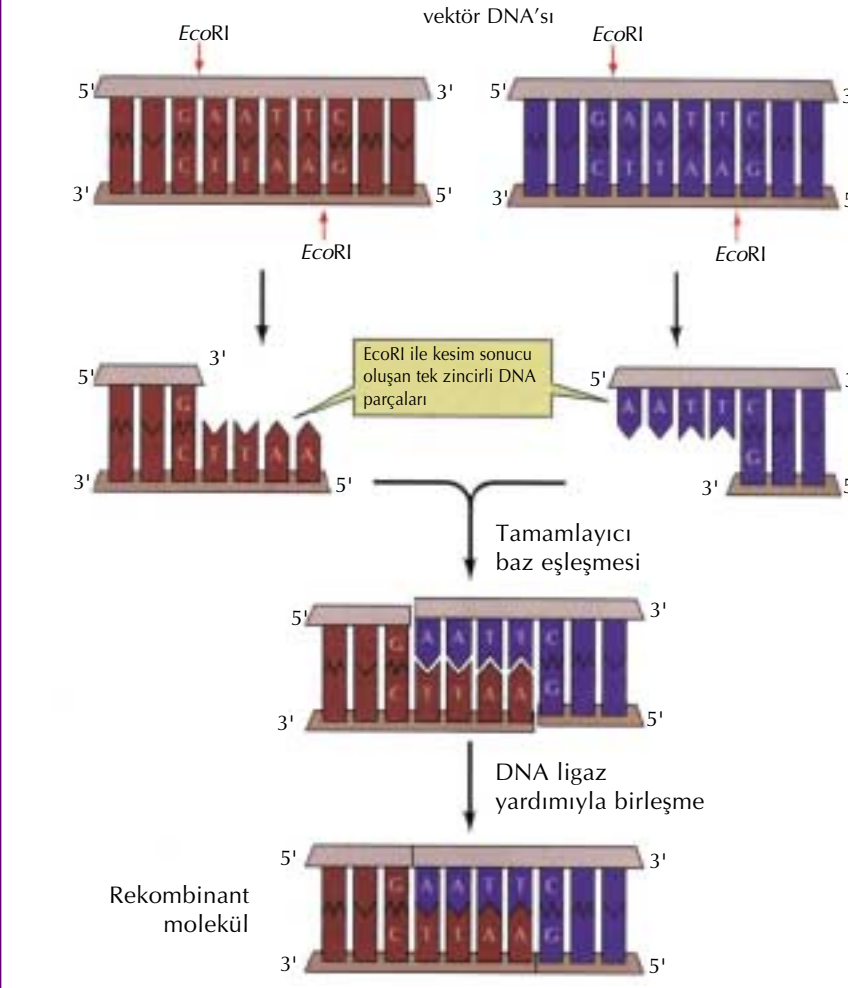
DNA Molekülü

DNA, iki zincirin oluşturduğu sarmal biçiminde bir moleküldür. İçi karşılıklı olarak eşleşmiş dört bazdan, dışıysa şeker-fosfat iskeletinden oluşur. Karşılıklı zincirlerdeki bazlar birbirlerine hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Adenin (A) daima timinle (T), guanin de (G) sitozinle (C) bağ yapar. Bu moleküllerin



dizilimlerini ve ikili ve üçlü bağ yapılarını görüyorsunuz.

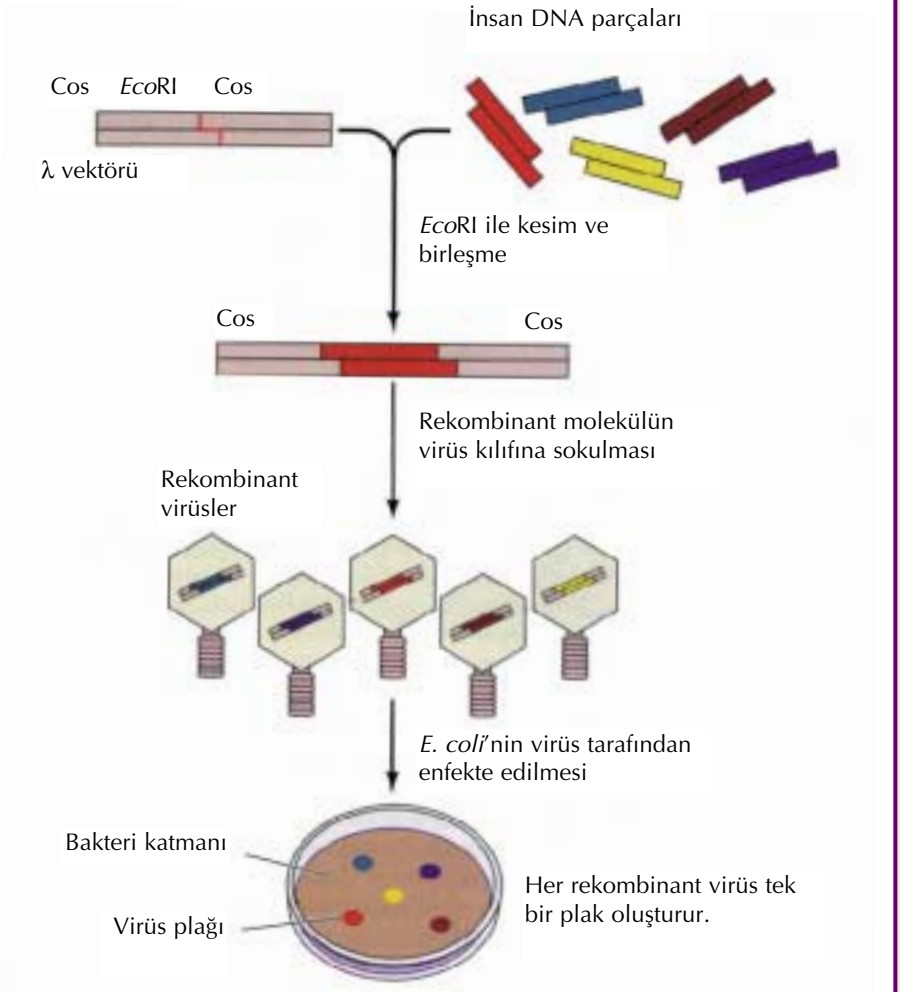
Rekombinant (melez) DNA Parçalarının Hazırlanması



Rekombinant bir DNA molekülü oluşturmak için kullanılacak DNA parçaları, genellikle "restriksiyon" enzimleri kullanılarak elde edilir. Bu enzimlerin çoğu kesim yaptıkları bölgede tek zincirden oluşan bir DNA parçası oluştururlar. İki farklı DNA molekülünün bir birbirini tamamlayan tek zincirleri, karşılıklı bazların eşleşmesi yoluyla birleşir. Bu birleşme, DNA iplerindeki kırıkları birleştiren DNA ligaz enzimiyle sağlanmaktadır.

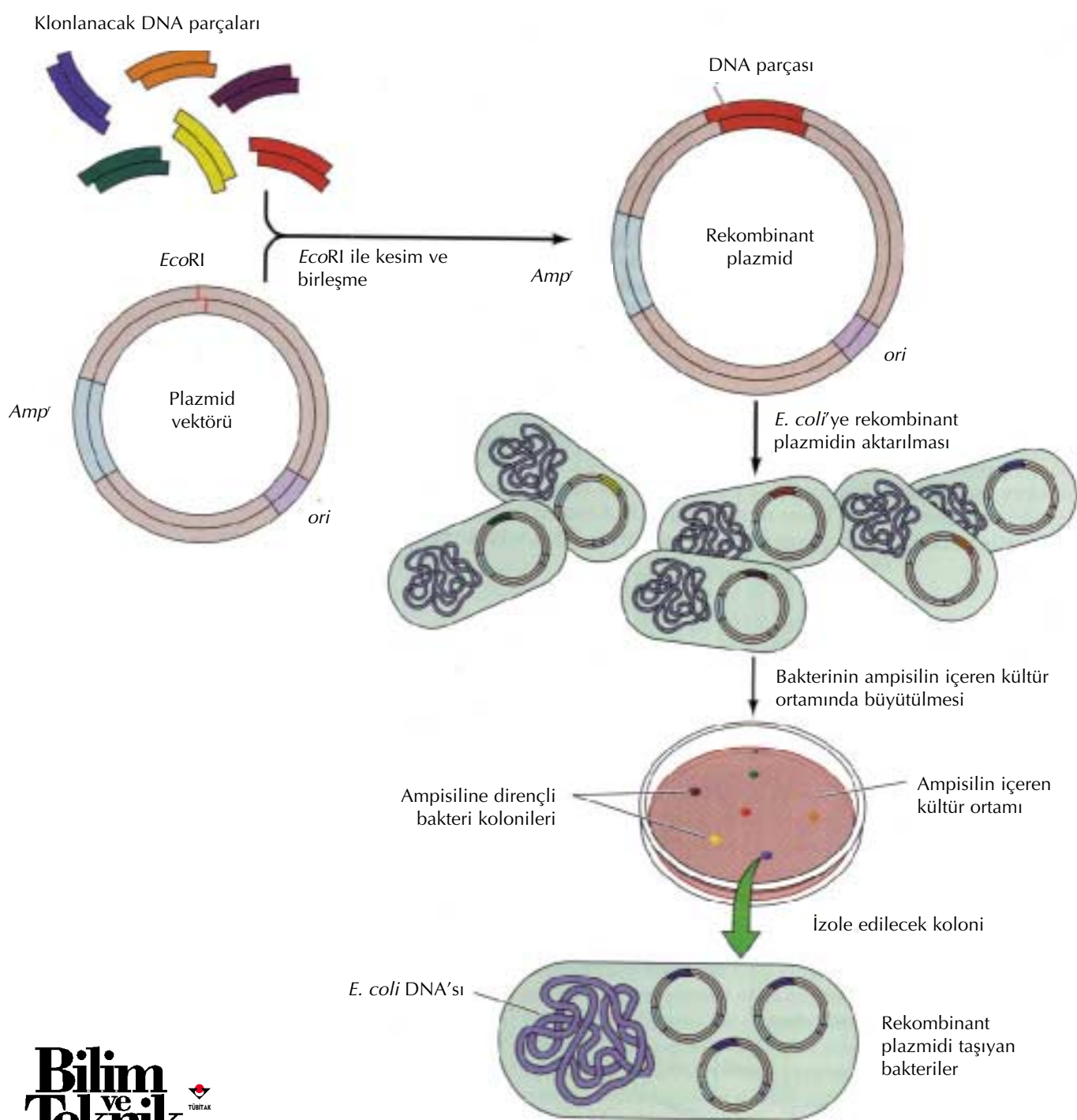
λ Virüs Vektörlerinde Klonlama

Bakteriyofaj λ, bakterileri doğal olarak enfekte edebilen bir virüstür. Bu virüs kullanılarak oluşturulan vektörde, virüsün çoğalması için gerekemeyen genler çıkarılarak, bunların yerine restriksiyon enzim bölgeleri yerleştirilir. Yaklaşık 15 kilobaz (kb) büyüklüğünde DNA parçalarını taşıyabilme kapasitesi olan bu vektörlerin ürettiği rekombinant moleküller, virüs kılıfları içine de sokulabilir. λ vektöründe iki önemli bölge vardır. Bunlardan ilki klonlanmak istenilen genin sokulacağı restriksiyon enzimi kesim bölgesidir. (Burada EcoRI denilen bir enzimin kesim bölgesi bulunuyor.) İkinci de, vektörün her iki ucunda bulunan ve "cos" denilen bölgedir. Bu uçlar, DNA parçasının vektör kılıfına sokulması için gerekir. Klonlanacak DNA (burada insan DNA'sı) restriksiyon enzimiyle küçük parçalara ayrılır. Vektör de bu enzimle kesilerek, insan DNA'sının herhangi bir parçasıyla birleşir ve virüs kılıfına sokulur. Daha sonra bu virüsler, koli basilli olarak bilinen *Escherichia coli* yi enfekte etmek için kullanılır. Bakteri kültür ortamında oluşan her bir virüs plağı, insan DNA parçalarından sadece birini taşır. İnsan DNA'sından çıkarılmak istenilen özel DNA parçasının oluşturduğu plak, özel teknikler kullanılarak diğer plaklar arasından kolayca seçilebilir. Daha sonra da, ayrı olarak istenildiği kadar çoğaltılabilir.



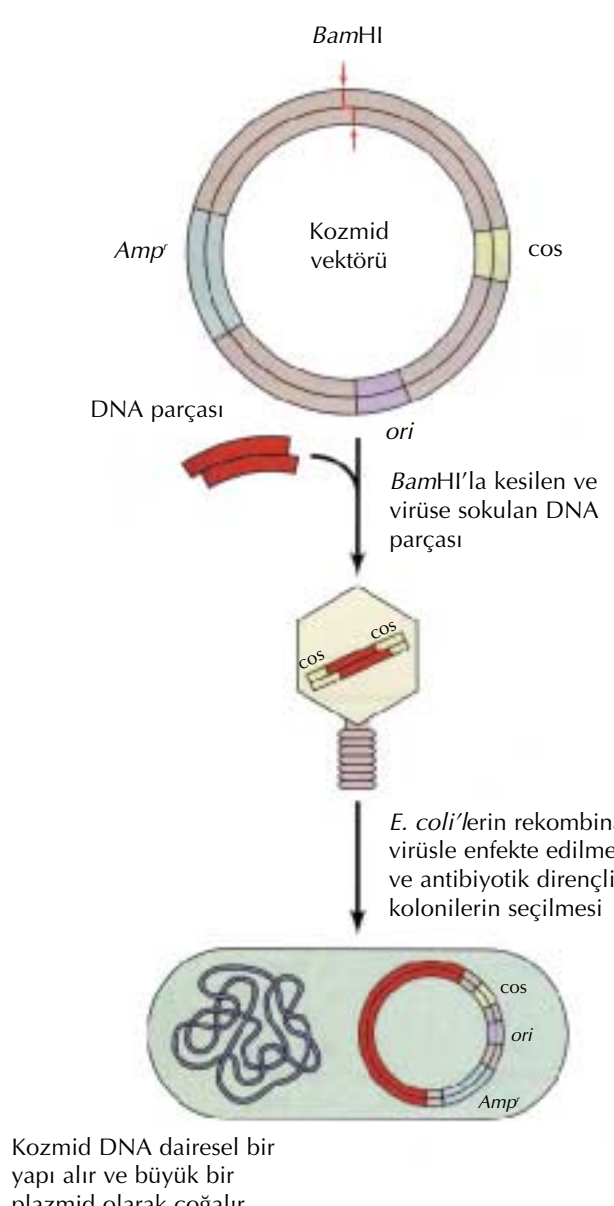
Plazmid Vektöründe Klonlama

Plazmid vektörleri, virüs vektörlerine göre, klonlanan DNA'nın daha kolay kullanılabilmesi olanağını sunar. Plazmidler, küçük dairesel DNA parçalarıdır. Bunlar bakterilere sokulduklarında kendi başlarına çoğalabilirler. Bakteriden bağımsız çoğalmalarını sağlayacak gen parçasının (*ori*) yanı sıra, bir antibiyotik dirençlilik geni (burada ampisilin dirençlilik geni, *Amp^r*), bir de restriksiyon enzimi kesim bölgeleri içerirler. Klonlanmak istenilen DNA parçası bu vektöre yerleştirilir. Elde edilen vektör bakteriyeye sokulur. Bakteri, içinde antibiyotik bulunan ortamda çoğaltılır ve böylece sadece bu plazmidi, dolayısıyla DNA parçasını, taşıyan bakterilerin büyümesi sağlanır. Oluşan her bir koloni izole edilip üretilerek, klonlanmış DNA parçasından büyük miktarda elde edilir.



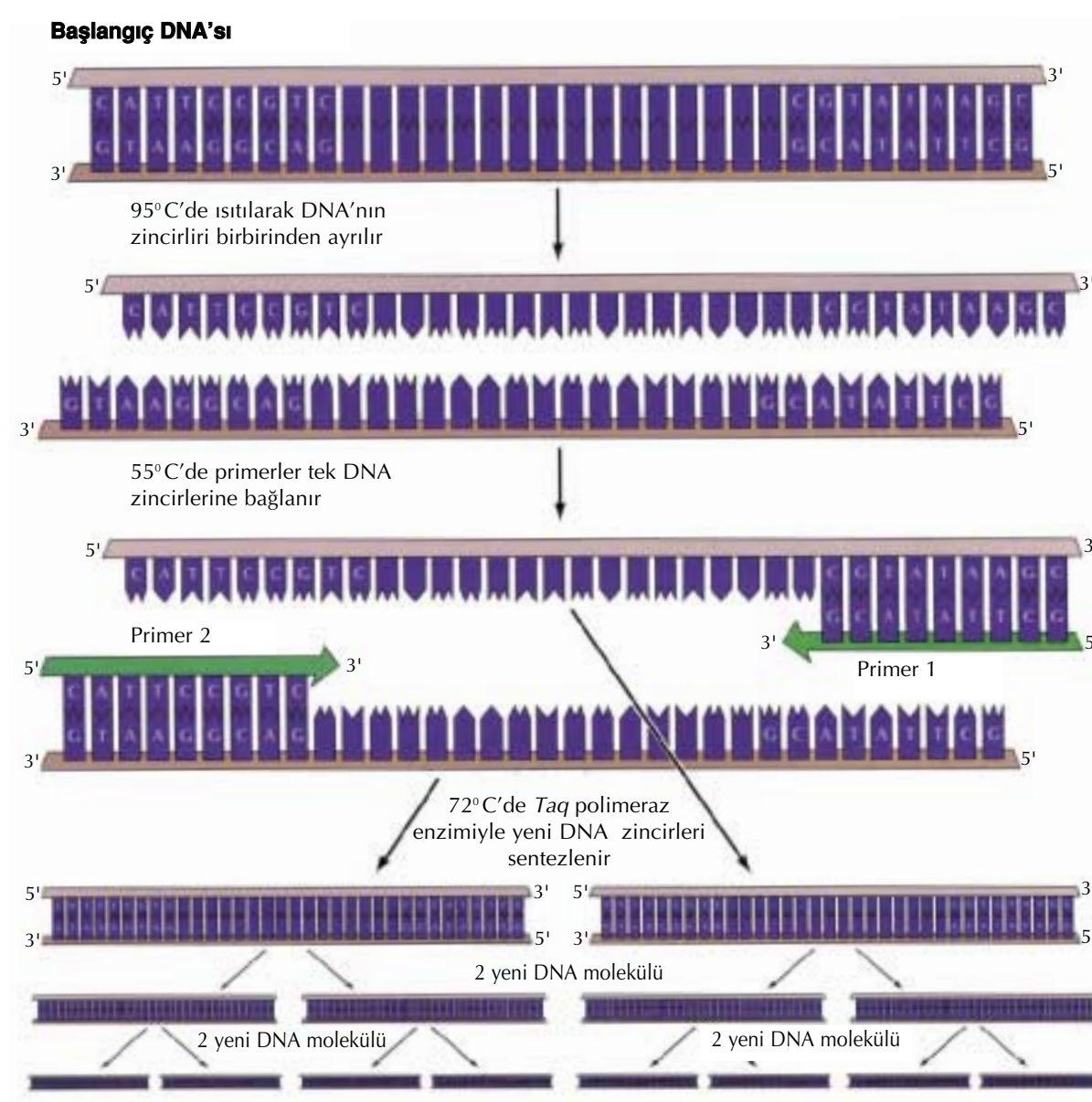
Kozmid Vektöründe Klonlama

Kozmid vektörler hem λ virüs vektörü gibi cos bölgesi içeren, hem de plazmid vektörler gibi *ori* ve antibiyotik dirençliliği genlerini içeren DNA molekülleridir. Bu sayede, λ vektöründe olduğu gibi rekombinant molekül virüs parçalarına sokulabilir ve plazmid vektöründe olduğu gibi bakteride çoğaltılıp seçilebilir. Kozmid vektörler, yaklaşık 45 kb büyüklüğünde DNA'yı taşıyabilirler.



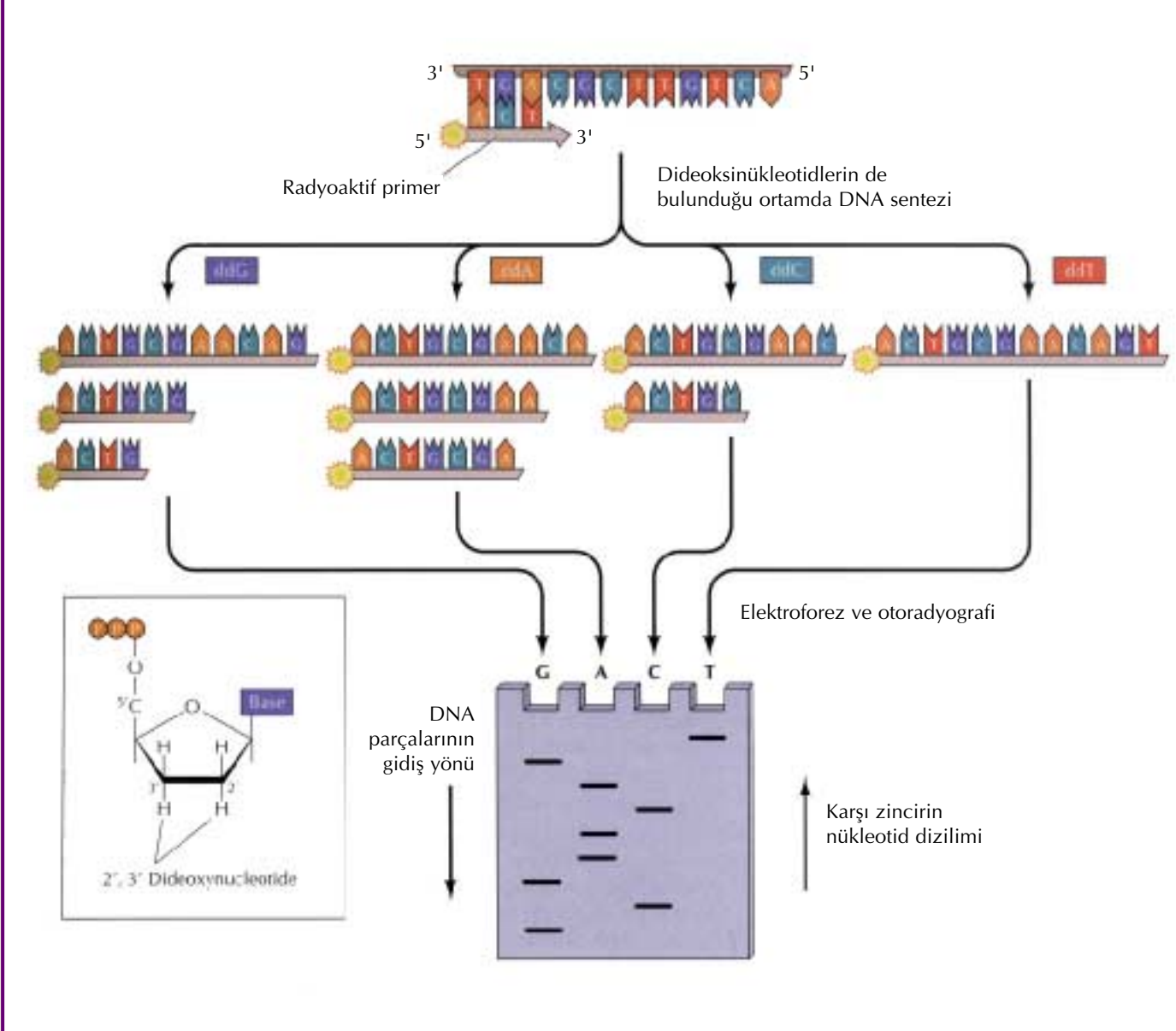
Polimeraz Zincir Reaksiyonu, PCR

Moleküler klonlama, DNA parçalarının bakterilerde çoğaltılmasını sağlar. DNA moleküllerinin çoğaltılabileceği bir başka yol da, 1988'de Kary Mullis'in geliştirdiği polimeraz zincir reaksiyonu, PCR, yöntemidir. Çoğaltılmak istenilen DNA parçasının bir kısmının dizilimi bilindiğinde, PCR sayesinde bu DNA parçası tümüyle laboratuvar koşullarında çok fazla miktarda elde edilebilir. DNA moleküllerinin sayısı her çevrimde bir öncekinin iki katına çıkar. Tek bir DNA molekülü 30 çevrim sonunda yaklaşık bir milyar tane olur. Bu yöntem sayesinde başlangıç için çok az miktarda DNA yeterli olur. Çoğaltılmak istenilen DNA ısıtılarak, iki zinciri birbirinden ayrılır. Daha sonra soğutulurak 15 - 20 bazlık yapay DNA parçalarıyla (primerler) birleşmesi sağlanır. "Taq polimeraz" denilen özel bir enzim yardımıyla, primerlerden başlayarak yeni DNA zincirleri sentezlenir. Sonuçta, bir çevrim sonunda ilkinin aynı iki DNA molekülü elde edilmiş olur.



Sanger Yöntemiyle DNA Nükleotid Diziliminin Belirlenmesi

Dideoksinükleotidler, deoksinükleotidlerdeki gibi 2'-OH grupları yanında ayrıca, 3'-OH gruplarını da kaybetmiş nükleotidlerdir. Bu nükleotidler, sentezlenmekte olan DNA'ya rahatça bağlanabilirler. Ancak 3'-OH grupları olmadığı için, DNA sentezi sırasında bir sonraki nükleotid bunlara bağlanamaz ve sentez sona erer. DNA'nın nükleotid dizilimi belirleneceği zaman, DNA sentezi radyoaktif olarak işaretlenmiş bir primer ile başlatılır. Dört farklı reaksiyon yürütülür. Bunların her birinde bir tip dideoksinükleotid ve diğer normal deoksiribonükleotidler kullanılır. Dideoksinükleotid sentezlenen DNA'ya eklendiği zaman, DNA sentezi durur. Bu durumda her bir reaksiyon, radyoaktif primerle başlayıp, dideoksinükleotidle biten bir seri DNA molekülü oluşturur. Bu dört reaksiyonun ürünleri otadyografiyle incelenerek, DNA'nın nükleotid dizilimi belirlenir.



Yabancı gen ürününün bakteri tarafından üretilmesi

Yabancı genlerin ürünlerinin bakteride üretilmesi amacıyla "ekspresyon" vektörleri kullanılır. Bu vektörler, ürünün istenilen DNA'nın yanında, bu DNA'nın bakteri tarafından kullanılabilmesi için gereken bazı özel DNA parçalarını da taşırlar. (Burada promotör, *pro*). Ayrıca bu vektörler, DNA'daki bilgiyi ribozomlara taşıyacak olan RNA'nın, proteini sentezleyen ribozomlara bağlanmasını sağlayacak Shine-Delgarno (SD) denilen bir bölgeyi de taşırlar. Bu vektörler bakteriyeye sokulduğunda, içindeki gen bakteriyeye aktarılır ve DNA'da belirtilen protein üretilir.

