

# ZBK458 Bitki Korumada Moleküler Yaklaşımlar



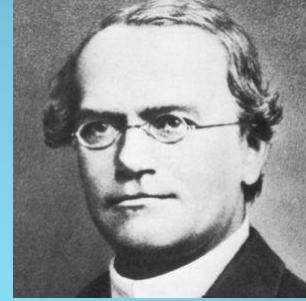
***Hafta 2:*** Entomolojide sıklıkla kullanılan temel moleküler teknikler ve kullanım alanları

***Umut Toprak, Ph.D***

# Kalitsal materyal DNA ve Tarihçesi

- **Mendel, 1866**

Bezelye'lerde belirli özelliklerin nesilden nesile aktarıldığını buldu.



- **Griffiths, 1928**

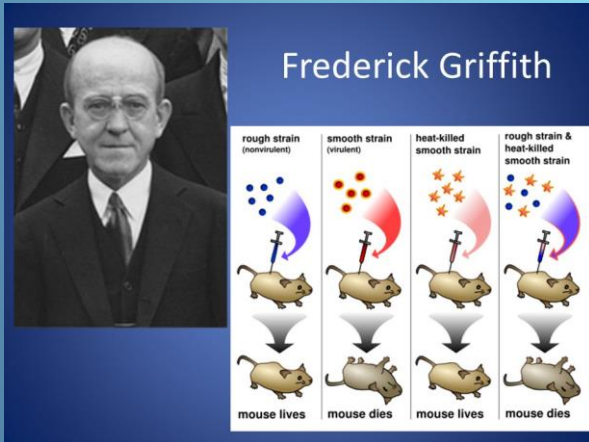
İlke kez kalitsal materyalin DNA olduğunu *Streptococcus pneumoniae*'de rapor etti. Bu zamana kadar bilim adamları kalitsal materyalin RNA/Protein de olabileceğini öngörüyorlardı. Bunda proteinlerdeki 20 amino asit'e karşılık DNA'da sadece 4 nükleotit'in karşılık gelmesi, çekirdekiteki DNA miktarı kadar proteinin bulunması birer etkendi.



Frederick Griffith (1879–1941)

# Griffiths (1928) ve Avery (1944)'nin Çalışmaları

- *S. pneumoniae*'nin virüent olmayan formlarınının, ısıyla muamele edilmiş virüent formlarla karıştırılarak virüent formlara dönüştürülebileceği bulundu. Buradan çıkan sonuç virülansın genetik bir olgu olduğu ve ısı işleminden etkilenmediği idi.
- Avery et al. (1944), Griffiths'in deneylerindeki mekanizmanın DNA kökenli olduğunu, protein/RNA ile ilişkili olmadığını rapor etti. Nitekim protein/RNA'yı degrades eden enzimler 'transforming faktör'ü parçalamazken, DNA'yı degrades eden enzimler 'transforming faktör'ü parçalayabilmekteydi.



*Oswald Theodore Avery*

(d. 21 Ekim 1877, Halifax, Nova Scotia; ö. 2 Şubat 1955)

# Hershey ve Chase'in çalışmaları, 1952

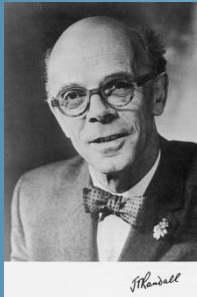
- Bu alışmalarda Hershey ve Chase, bakterileri enfekte eden bakteriofajlara ait DNA ve proteinleri farklı radyoaktif marker'larla etiketleyerek, bu etiketlenen DNA ya da proteinlerin konukçu durumundaki bakteriye girip girmediği araştırmışlardır. Buna göre sadece etiketlenen DNA'nın bakteriye girebildiği bulunmuş ve bir kez daha kalıtsal materyalin DNA olduğu ispatlanmıştır.

# Yeni sorular...

- DNA'nın yapısı nasıldı?
- Genetik bilgi nasıl üretilmekteydi?
- Genetik bilgi hatasız ve hiçbir bir şekilde değişmeden nasıl çoğalmaktaydı?



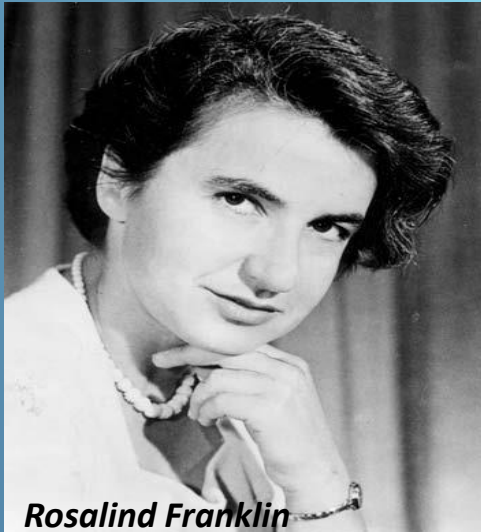
**James Watson (1928-.....)**  
Harvard & Cambridge Uni  
& **Francis Crick (1916-2004)**  
Cambridge & University  
College London



**John Randall**  
1905-1984

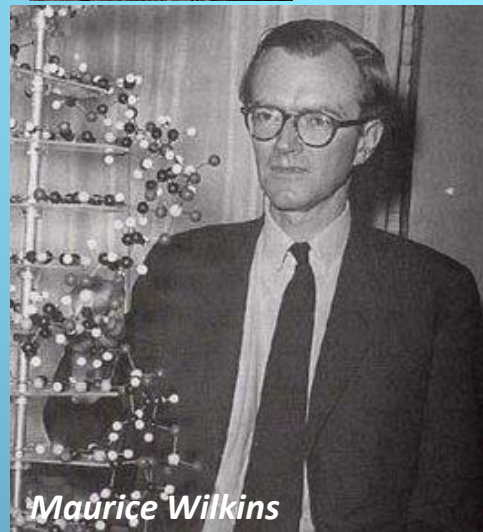


**Raymond Gosling**  
1926-2015



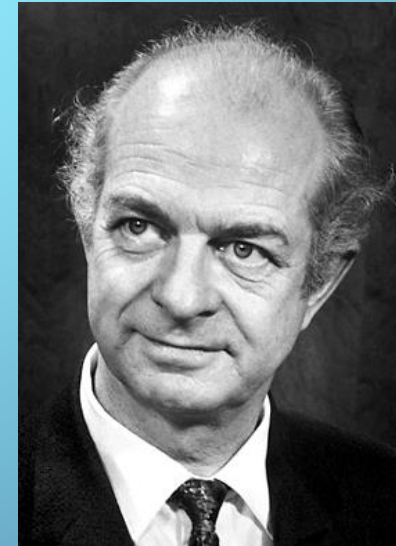
**Rosalind Franklin**

Kings College & Brickbeck Lab  
(1920-1958)



**Maurice Wilkins**

Uni of California Berkeley  
(1916-2004)



**Linus Pauling**  
Caltech,  
UC San Diego &  
Stanford  
(1901-1994)

# Rosalind Fraklin-Maurice Wilkins

- Saflaştırılmış DNA'nın X-ışını resimleriyle, DNA yapısının çözümlenmesinde gerekli kritik bilgilerin eldesinin önünü açtılar. Nitekim bu bilgiler Watson&Crick'in doğru DNA modelini kurgulamalarında en önemli ipuçlarını vermiştir.
- Nitekim daha önceki bilgiler DNA'nın üç zincirli bir yapıdan oluştuğunu önermekteydi.

# 1962 Nobel Ödülü

*Watson&Crick&Wilkins!*

*Rosalind? 'Nobel Ödülü ?'*

- DNA'nın aynı eksenini çevreleyen ikili sarmal bir yapıdan oluştuğunu ve bazların sarmalın iç kısmında, fosfatların ise sarmalın dış kısmında bulunduğunu keşfettiler. Bu ikili sarmalın ise purin ve pirimidin bazlarıyla bir arada tutulması ve bir bazın hidrojen bağlarıyla karşı sarmaldaki diğer bir bazla bağlanması modelin temelini oluşturmaktaydı.



# *Pürin ve Pirimidin bazları nasıl genetik bilgiyi üretmekteydi?*

*3 baz=kodon=1 amino asit*

- Crick et al. 1961 genetik kodun anlamını çözdü. Genetik bilginin üretimi her üç nükleotitten oluşan yani diğer bir deyişle üçlü kodlama oranına dayanan bir aritmetiğe dayanmaktaydı. Buna göre bakteriofaj genleriyle yapılan çalışmada Crick ve ark. Her hangi bir bazda ekleme ya da çıkartma ile meydana gelen bir mutasyonun ilgili proteinin üretimini durması ile sonuçlandığını buldu. İşin ilginç ise, ilgili protein, üç nükleotitin eklenmesi ya da çıkartılmasıyla tekrar eski haline getirilebilmekteydi.

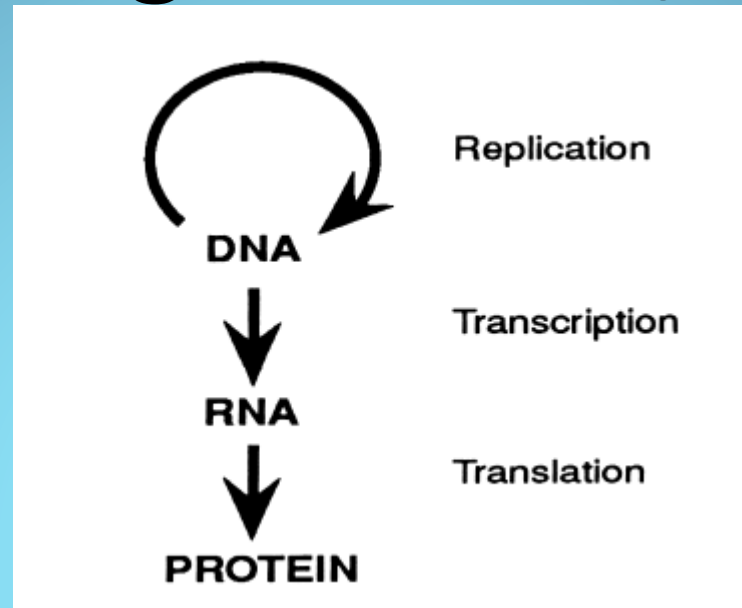
**Protein kodlayan genler (enhancers, promotörler)**

X

**Büyük-küçük RNA kodlayan genler**



# Central dogma? Crick, 1958...



- 1970'de revize edildi, çünkü bazı virüslerin genetik bilgileri RNA'dan DNA'ya dönüştürerek ürettiği bulundu.
- 1997 prion (proteinimsi infeksiyöz birimler) adı verilen, DNA içermeyen, ama yenildikleri zaman sağlıklı bireylere bulaşan ve bu bireylerde ölümcül neurodegeneratif hastalıklara yol açan (Deli dana hastalığı gibi) mutasyona uğramış proteinler bulundu (Prusiner ve Scott, 1997).

# DNA mı RNA mı önce vardı?

- Bazı bilim adamları yeryüzünde yaşamın ilk evrelerinde RNA'nın genetik materyal olarak rol aldığını iddia etmektedir. Nitekim RNA ribozim olarak ta görev yapabilir. Ancak bu rol, evrimsel süreçte ana katalitazör olarak enzimatik proteinlere bırakılmıştır.
- RNA organizmasının evrimsel süreçte çok kopyalı, iki sarmallı ve kendi başına rekombinasyon ve splicing özelliklerinde olduğu düşünülmektedir.

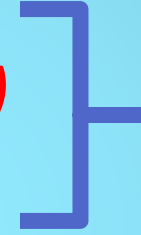
# RNA mı DNA mı?

- RNA ilk genetik materyal olabilir, çünkü kendi kendine çoğalmada bir örnek teşkil edebilmekte, nükleotitlerin polimerizasyonu gibi kimyasal reaksiyonları katalize edebilmektedir.
- RNA-amino asit interaksiyonlarının evrimsel süreçte daha stabil bir genetik bilgi depolama birimi olan DNA'ya evrimleştiği düşünülmektedir.

# DNA'nın moleküler yapısı

- DNA nükleotit adı verilen monomerlerden oluşan uzun ve iki sarmallı yapıda polimerik bir moleküldür. Her bir nükleotit ise,

- *Şeker (5 karbonlu deoksiriboz)*
- *Azotlu baz*



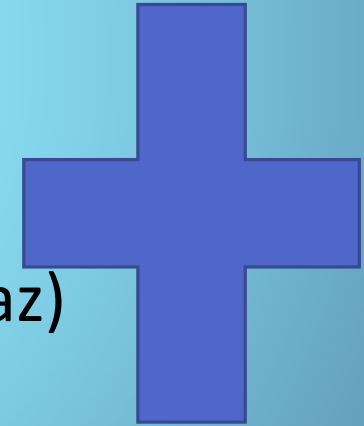
**Nükleosit**

*Pürin (Adenin, Guanin) ya da  
Pirimidin (Timin, Sitozin) bazları*

(Şekerin 1. karbon atomuna bağlı azotlu baz)

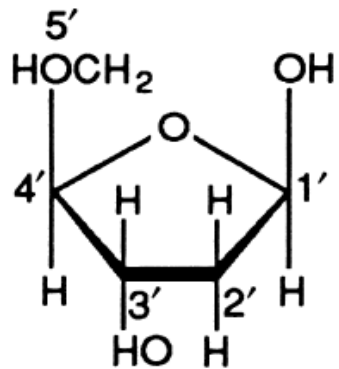
- *Fosforik asit*

(şekerin 5. karbon atomuna bağlı fosforik asit grubu)

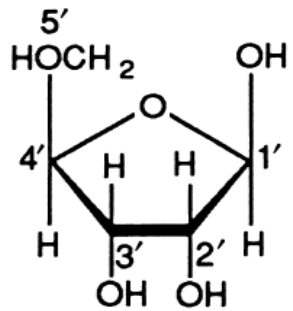


**Nükleosit + Fosforik asit = Nükleotit**

# Şeker



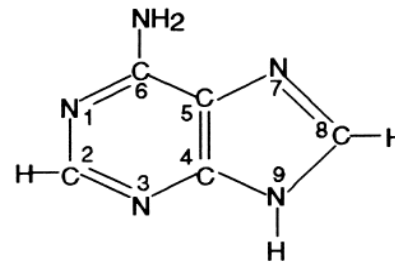
2'-deoxyribose



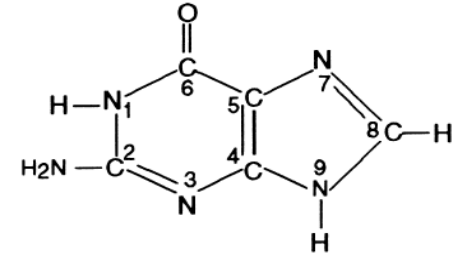
Ribose

# Azotlu bazlar

## PURINES

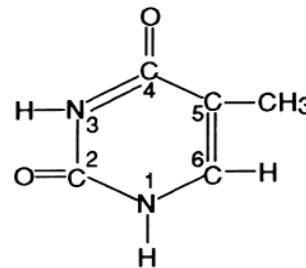


Adenine

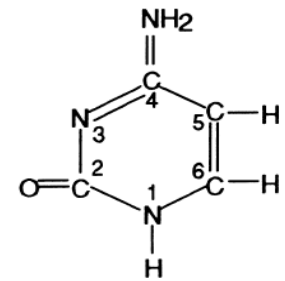


Guanine

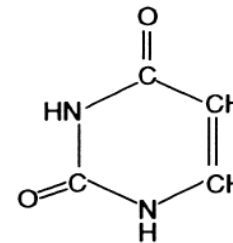
## PYRIMIDINES



Thymine



Cytosine



Uracil

# Nükleotitler

- 2'deoksi**adenozin** 5'trifosfat (dATP=A)
- 2'deoksi**guanozin** 5'trifosfat (dGTP=G)
- 2'deoksi**sitidin** 5'trifosfat (dCTP=C)
- 2'deoksi**timidin** 5'trifosfat (dTTP=T)
- Nükleotitler birbirine '*fosfodiester*' bağları ile bağlanarak polinükleotitleri oluşturmaktadır.

# Nükleosit'ten Nükleotit'e Dönüşüm

Buna göre şekildeki polinükleotit'in ucu 5. karbon atomuna trifosfat grubu eklenmiş bir nükleotit'ten oluşturmaktadır. Ve burada bir fosfodiester bağı oluşmamaktadır. Bu uca 5' ucu denilmektedir. Diğer tarafta ise, 3. karbon atomunda fosfat grubu yerine bir OH grubu yer almaktadır. Bu uca ise 3' ucu denilmektedir.

# RNA'nın moleküler yapısı

- RNA da polimerik bir molekül olup temelde DNA'dan iki yönüyle ayrılır:

*-Şeker Ribozdur.*

*-Timin yerine urasil bulunur.*

- **Adenozin 5'trifosfat (ATP=A)**
- **Guanozin 5'trifosfat (GTP=G)**
- **Sitidin 5'trifosfat (CTP=C)**
- **Urasil 5'trifosfat (UTP=U)**

- RNA tipik olarak tek sarmallı olup DNA ya göre daha az stabil bir yapıdır. Bununla birlikte zaman zaman kompleks yapılar oluşturabilir veya iki sarmallı bir yapıda da olabilir. RNA. da da nükleotitler birbirlerine fosfodiester bağları ile bağlıdır.



# İkili Sarmal-Watson&Crick, 1953

- Azotlu bazlar ikili sarmalın iç kısmında yer almaktadır.
- Şeker ve fosfat grupları ise dış kısımda yer alıp taşıyıcı durumundadır.
- A ile T (2 H bağı), G ile C (3 H Bağı) hidrojen bağları ile birbirine bağlanmaktadır.

# İkili Sarmal-Watson&Crick, 1953

- DNA sarmalı yaklaşık her 10 bazda bir dönüş yapmakta olup her baz arasında  $3.4 \text{ \AA}$  yani dolayısıyla da bir dönüş için  $34 \text{ \AA}$ 'lük bir mesafe gerekmektedir. ( $1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ m}$ )
- Sarmalın çapı ise  $20 \text{ \AA}$  civarında olup genelde sağa yaslanmış durumdadır.
- DNA farklı kristal formlarda bulunabilir. B-DNA en yaygın bulunan form olup, daha sıkı yapıda olan  $12 \text{ \AA}$ 'lık çapa sahip ve 11 bazda bir dönüş yapan **A-DNA** da zaman zaman görülebilir. Bu formların yanısıra C, D, E, ve **Z** formları da mevcuttur. Bunlar arasında Z formu, sola-yaslanmış bir sarmal yapısına sahiptir. **H-DNA** olarak bilinen üçlü sarmal yapı da son 5 yılda rapor edilmiştir.
- A, H, Z formlarının hücrede, C, D, ve E formlarını ise laboratuvar koşullarında üretilebileceği öngörülmektedir.

# Genler

- Genler kromozomlarda spesifik bir lokasyonda olabilen bir nevi biyokimyasal materyaller olup canlıların gelişimini sağlayan temel birimlerdir.
- Genler birden fazla protein kodlayabilir ancak her gen her zaman protein üretmeyip RNA'yı üreterek diğer genleri regüle edebilir.
- Genler 75 nt-200 kb (1 kb=1000 nt)
- Genetik bilgi DNA ikili sarmalının birisi tarafından belirlenir ki bu sarmala 'coding strand (sense)' adı verilmektedir. Diğer sarmal ise buna eşlenik olan 'non-coding strand (anti-sense)' adını alır.
- Protein üretmeyen genler son ürün olarak RNA'yı üreten genlerdir. Bu RNA'lar direkt olarak tRNA, rRNA, küçük nükleolar RNA (snoRNAs), küçük nüklear RNA (snRNA) ve diğer düzenleyici elementler olabilir.

# ‘Protein-üreten genler için şifre üçlüdür’

- Protein üreten genlerin genetik kodu DNA molekülündeki üçlü nükleotitlerin dizisine dayanır. Bu üçlü dizi (kodon) proteinlerdeki amino asitlerin bir sıra halinde üretimini belirler.
- 4 Farklı bazın (A,T,C,G) üç farklı kombinasyonu 64 triplet, diğer bir deyişle 64 kodon demektir. Ancak 20 amino asit olduğuna göre

## ‘Diğer 44 kodon ne işe yaramaktadır?’

sorusu hemen akla gelmektedir.

# Soru: 'Diğer 44 kodon ne işe yaramaktadır?'

**Cevap: Metionin ve triptofan dışındaki diğer 18 amino asit birden fazla kodon tarafından belirlenmektedir.**

**Table 1.1.** The 20 Amino Acids That Occur in Proteins and Their Codons

Amino acid	Abbreviations		Codons					
Alanine	ala	A	GCU	GCC	GCA	GCG		
Arginine	arg	R	AGA	AGG	CGU	CGC	CGA	CGG
Asparagine	asn	N	AAU	AAC				
Aspartic acid	asp	D	GAU	GAC				
Cysteine	cys	C	UGU	UGC				
Glutamic acid	glu	E	GAA	GAG				
Glutamine	gln	Q	CAA	CAG				
Glycine	gly	G	GGU	GGC	GGA	GGG		
Histidine	his	H	CAU	CAC				
Isoleucine	ile	I	AUU	AUC	AUA			
Leucine	leu	L	UUA	UUG	CUU	CUC	CUA	CUG
Lysine	lys	K	AAA	AAG				
Methionine <sup>a</sup>	<u>met</u>	M	AUG					
Phenylalanine	phe	F	UUU	UUC				
Proline	pro	P	CCU	CCC	CCA	CCG		
Serine	ser	S	AGU	AGC	UCU	UCC	UCA	UCG
Threonine	thr	T	ACU	ACC	ACA	ACG		
Tryptophan <sup>a</sup>	<u>trp</u>	W	UGG					
Tyrosine	tyr	Y	UAU	UAC				
Valine	val	V	GUU	GUC	GUA	GUG		

<sup>a</sup>Methionine and tryptophan are underlined because they are specified by only one codon.

- Dikkat edileceği üzere kodonlardaki bilgi Urasil içermektedir, çünkü DNA'daki bilgi Timin yerine urasil'i kullanan mRNA'ya dönüştürülmektedir.
- **AUG** başlangıç ya da start (initiation) codon olarak bilinmektedir ve gen ön ucunda yer alır ve Methionin (M) rezidüsünü kodlar. Ancak AUG'ler genlerin orta bölgelerinde de bulunabilir dolayısıyla her AUG start kodon olamaz.
- Genetik bilgi aynı zamanda 'stop codon' ya da 'termination codon' olarak bilinen ve protein-üreten genin sonunda bulunarak translasyonu bitiren bilgilerde içerir. **UAA, UAG, UGA** stop kodonlarını oluşturmaktadır.

# Bir istisna...

- Genetik kod üniversal değildir yani her kodon her koşulda aynı amino asiti üretmeyebilir. Nitekim mitokondrial DNA'lardaki genlerin farklı bir genetik koda sahip olduğu sonradan anlaşılmıştır. Örneğin, **AGA** kodonu tipik olarak arginin amino asidini üretirken, *Drosophila* mitokondrisinde serin amino asidini kodlar.

# Gen organizasyonu

- Bütün genler kromozomlarda bulunur.
- Her bir kromozom bir tek DNA molekülü taşır.
- Böceklerde her bir DNA molekülü yüzlerce hatta binlerce gen taşıyabilir. Örneğin *Drosophila melanogaster* 4 kromozom üzerinde 13,600 gene sahiptir.
- Bazı DNA segmentleri 'spacer' olarak bilinen ve her hangi bir ürün kodlamayan ara bölgeler barındırır. Yapılan çalışmalar bu kısımların genellikle transkribe olduğu ve düzenleyici elemanlar olarak görev alabildiklerini göstermiştir.



# Multigen familyaları

- Bu genler benzer nükleotitlere sahip olan yakın ilişkili gen gruplarına verilen isimdir. Bu familyadaki genler bir ata genden duplike olarak benzer 2 ya da 3 genlerin oluşmasına yol açmıştır. Bunlar zamanla daha fazla varyasyon kazanarak birbirine benzer fonksiyonlara sahip birden fazla genin oluşmasını sağlamıştır. Böceklerde bunlara örnek olarak aktin, tubulin, heat shock, salivary glue, chorion, cuticle ve yolk protein genleri verilebilir.

# Pseodugenler

- Bu genler fonksiyonel genlere dizi bazında benzer olan fakat genetik bilgileri mutasyona uğramış dolayısıyla da fonksiyonelliğini kaybetmiş olan genlerdir. Bunlar fonksiyonlarının kaybolmasına bağlı olarak nükleotit dizilerinde hızlı değişikliklere gidebilir ve daha önceki dizi bilgisi mümkün olmadığı için tanımlanamayabilir. Böyle DNA'lar '**Junk (gereksiz) DNA**' olarak ta nitelenebilir.

# Pre-mRNA?

- Intronların pek çok ökaryotik protein-üreten gende bulunuşu transkripsiyon ve translasyon arasında ilave bir reaksiyonun daha varlığını göstermektedir. **Buna göre, DNA RNA'ya transkribe olduğunda, aslında ilk RNA transkribi mRNA değildir.** Bu sentezlenen RNA, bir mRNA öncüsü (precursor) olup, **'Pre-mRNA'** adını alır. Pre-mRNA, stoplazmaya geçmeden önce, çekirdekteyken intronlarından kurtulmak için splicing gibi çeşitli proseslere uğrar.

# Ekzon ve Intronlar

**Ekzon**, bir genin protein kodlayan bölgesidir. Transkripsiyondan sonra mRNA oluşunca bunun olgunlaşması için intronlar atılır, kalan **ekzon** bölgeleri protein kodlar. **Ekzon** terimi bu yüzden asıl olarak DNA'da bulunan ama aslında RNA'da da bulunan gen parçasıdır.

**Intron**, DNA'nın okunmadan atılan bu bölümüne intron adı verilir. Intronlar, mRNA ve protein kodlamasına katılmazlar. Genlerin kodlamaya katılmayan bu bölümü, toplam insan genomunun yaklaşık %97'lik bir kısmını oluşturur. Prokaryotlarda ve maya gibi ökaryotlarda düşük frekansta bulunur. Bazı ökaryotlarda da nadiren intron bulunmayabilir. Tipik olarak bazen coding bir alanı bölebilir ya da genin UTR (untranslated region) alanlarında bulunabilir. Tipik olarak 100-10,000 bp uzunluğundadır.

# Verimli bir DNA replikasyonu esastır!

- Her organizmada her hücre bölünmesi esnasında hücredeki her genin bir kopyasında meydana getirilmektedir. Bu replikasyon işleminin hızlı ve doğru olması esastır. Nitekim sadece 100,000 nükleotide 1 meydana getirilecek bir hata bile organizmada önemli hasarlara ya da mutasyonlara yol açabilir. Nitekim mutasyonların çoğu ölümcül sonuçlara yolaçarken çok azı nötr ya da faydalı olabilir.

# **DNA replikasyonu semi-konservatiftir!**

DNA replikasyonu semi-konservatif olması her yeni DNA heliksinin bir eski bir yeni DNA sarmalı içermesi anlamına gelir. Bu şekilde eski DNA sarmalı karşısında ters eşlenik olacak şekilde yeni bir DNA sarmalı meydana gelmektedir.

# Replikasyon, 'replikasyon orijinlerinde' başlar

Kromozom üzerinde replikasyonun başladığı bölge "replikasyon orijini" olarak adlandırılır. Kromozom üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla meydana gelen çatala "replikasyon çatalı" denir. Bu çatal, önce sentezin orijin noktasında meydana gelir ve replikasyon devam ettikçe ilerler. İki DNA zincirini bir arada tutan hidrojen bağlarını kıran helikaz enzimi tarafından oluşturulur.

# DNA Replikasyonunun Temel Mekanizmaları

Hem prokaryotik hemde ökaryotik hücrelerde replikasyonun temel mekanizmaları aynıdır.

- Replikasyon başlangıç noktalarının tayini
- DNA çift ipliğinin çözünmesi
- Replikasyon çatalının oluşması



# DNA çift ipliğinin çözünmesi

- Replikasyonun başlayabilmesi için DNA çift zincirinin sarmal yapısının çözülmesi gereklidir.
- Çözülme işlemi başlatıcı protein kompleksinde yer alan **DNA helikazlar** ile gerçekleştirilir.

- Helikaz ikili sarmalı ayırdığı zaman 'single-strand binding proteinler' her bir tekli sarmala bağlanarak onların tekrar bir araya gelmesini (anneal) engeller. Bu şekilde

# Replikasyon çatalının oluşması

- Helikaz aktivitesi ile açılan çift zincirde replikasyonun olduğu bölgeye **replikasyon çatalı** denir.
- Replikasyon olayı “replikasyon çatalı”nın ana DNA molekülü boyunca ilerlemesi ile gerçekleşir.

*DNA replikasyon yönü (yeni sentezlenen zincirin yönü) 5' 3' ucuna doğrudur*

# DNA replikasyon yönü (yeni sentezlenen zincirin yönü) $5' \longrightarrow 3'$ ucuna doğrudur

DNA molekülü birbirize zıt yönde paralel iki zincir içerdiğinden (biri  $5' \longrightarrow 3'$  diğeri  $3' \longrightarrow 5'$ ) sentezin aynı anda ve devamlı olarak ilerlemesi mümkün değildir.

- Bu nedenle replikasyon çatalında iki farklı sentez tipi ortaya çıkar.

## 1- Devamlı iplik (DNA) sentezi

(  $3' \longrightarrow 5'$  kalıbına uygun sentez )

## 2- Kesikli iplik (DNA) sentezi

(  $5' \longrightarrow 3'$  kalıbına göre yapılan sentez )

# Genetik Bilgi Akışı

- Ökaryotik hücrelerde DNA'nın çoğu çekirdekte bulunurken proteinler sitoplazmada sentezlenir.
- RNA ökaryotik hücrenin çekirdeğinde sentezlenir ve kimyasal olarak DNA'ya benzer.
- RNA'nın çoğu sitoplazmaya taşınır.
- Genellikle hücredeki RNA miktarı, protein miktarı ile orantılıdır.

# TRANSKRİPSİYON

(DNA'dan RNA sentezi)

- DNA kalıbından RNA sentezlenmesine transkripsiyon denir.
- Transkripsiyon, hücre içi genetik bilgi akışının ilk basamağı olduğu için önemlidir.
- Transkripsiyon sonucunda, ikili sarmal DNA'nın bir dizisinin eşleniği olan mRNA molekülü sentezlenir.
- mRNA'daki her üçlü kodon, ayrıca peptit zincirine girecek olan aminoasiti taşıyan tRNA'nın antikodonuna da eşleniktir.

# Replikasyon-Transkripsiyon: Farklar

- Replikasyon sırasında tüm kromozom kopyalanır fakat transkripsiyon daha spesifiktir. Aynı anda sadece bir gen grubu kopyalanabilir.
- Gen ekspresyonu organizmanın ihtiyacı ve ekolojik faktörler ile ilişkilidir.
- DNA segmentinin başı ve sonunu belirleyen spesifik düzenleyici dizeler hangi DNA segmentinin şablon olarak kullanılacağını gösterir.
- Transkripsiyon bir primer'e ihtiyaç duymaz. Transkripsiyon için sadece bir DNA zinciri kalıp olarak iş görür.

# RNA'nın DNA'ya Bağımlı Sentezi

- RNA polimerazlar RNA'nın sentezinde görev alır.
- Sentez için DNA-bağımlı RNA polimeraz, bir DNA şablonu, nükleozid 5' trifosfatlar (ATP, GTP, UTP ve CTP) veya  $Mg^{2+}$  gereklidir.
- Sentez ribonükleotidlerin 3'-hidroksil ucuna eklenmesi ile 5' → 3' yönünde ilerler.
- Başlama, RNA polimerazın **promotor** olarak adlandırılan spesifik bölgelere bağlanması ile başlar, primer'e gereksinim yoktur.



# Promotor?

- Promotor, RNA polimerazın transkripsiyonu başlatmak üzere DNA'da bağlandığı özel bölgelerdir.
- Promotorlarda, türler arasında korunmuş konsensüs diziler vardır.
- Ökaryotik promotorlarda -10 dizisine benzer konsensüs diziler bulunmuştur (örnek, **TATA kutusu**)
- Transkripsiyon faktörleri gen ekspresyonunu etkileyen faktörlerdir.
- Promotor mutasyonları gen ifadesini önemli biçimde azaltır.

# RNA Polimeraz ve RNA Sentezi

- DNA kalıbı üzerinden RNA sentezi, RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir.
- RNA polimeraz, DNA polimerazla aynı genel substratlara ihtiyaç duyar.
- Ancak dNTP yerine **NTP** kullanır.
- Ve **primere** ihtiyaç duymaz.

# mRNA'nın Oluşum Basamakları

- mRNA'nın **5'** ucuna şapka (**cap**) yapısı takılır. 5' cap'in, translasyonun başlamasını kolaylaştırdığı ve mRNA'nın dayanıklılığını artırdığı düşünülmektedir.
- mRNA'nın **3'** ucuna **poli A** kuyruğu eklenir.
- Öncül mRNA yapısındaki proteine dönüşmeyecek bölgeler (**intronlar**) çıkartılarak proteine dönüşecek bölgeler (**eksonlar**) birleştirilir. Bu işleme sıplaysing (**splycing**) denir.

**Genetik Şifre** (kodonlar RNA üzerinde ve 5'→ 3' yönünde ilerler. Buna göre DNA'da yer alan tamamlayıcı kodonlar ters yönde (3'→5'), tRNA antikodonları ise mRNA'dakinin tamamlayıcısı ve onunla ters yönde).

# ***Translasyon***

*mRNA* halinde kopyası çıkarılmış olan genetik bilgiye göre *polipeptid* moleküllerinin sentez edilmesi işlemidir. Polipeptidler proteinlerin primer yapısını oluşturur.

*Çekirdek*teki genlere ait proteinlerin sentezi *sitoplazmadaki ribozomlarda*, *organellerdeki genlere* ait proteinlerin sentezi *organellerdeki ribozomlarda* meydana gelir.

Tüm organizmalarda *en fazla korunmuş* ve hücre için *enerji sarfiyatı açısından pahalı* bir prosestir.

Bakterilerde, hücredeki enerjinin  $\sim$  %80'i ve hücrenin kuru ağırlığının %50'si protein sentezine ait (tek bir proteinin sentezi 100'ün üstünde protein ve RNA'nın uyumlu iş birliği gerekli)

mRNA daki genetik bilginin polipeptid haline çevrilmesinin yönü:  $5' \rightarrow 3'$

Sentez edilen *polipeptid* zincirlerinin bir ucunda serbest -COOH grubu taşıyan bir amino asit (*C- ucu*), diğer ucunda serbest -NH<sub>2</sub> grubu taşıyan bir amino asit (*N- ucu*).

Translasyon ile 4 bazlı bir alfabeyle yazılmış genetik şifrenin 20 amino asitlik dilde yazılmış bir şifreye çevrilir.

Translasyon aygıtının başlıca bileşenleri:

**mRNA** translasyon aygıtı tarafından okunması gereken bilgiyi sağlayan kalıp.

**tRNA**'lar polipeptid zincirine girecek amino asitlerle mRNA'daki kodonlar arasındaki fiziksel ara yüz.

**Ribozom** mRNA'nın doğru tRNA'lar tarafından tanınmasını düzenleyen ve uzamakta olan polipeptid zinciri ile tRNA'ya bağlı amino asit arasındaki peptid bağı oluşumunu katalizleyen yapı.

## *tRNA'ların Protein Sentezine Katılmaları*

Translasyonda aracı moleküller = mRNA'daki *kodonların* tamamlayıcısı olan *antikodona* sahip *tRNA'lar*.

tRNA'ların taşıdığı amino asitlerin kodonlara uygun biçimde sıraya dizilip aralarında peptid bağı oluşması.

Çeşitli *tRNA'ların her biri*, mRNA'daki bir kodonu (ya da kodonları) tanıyan *özel bir amino asitle yüklenir* .

Protein sentezinin doğruluğu ←

(1) *tRNA'ya özgül ve doğru amino asidin bağlanması*

(2) *ribozomlarda mRNA'daki bir kodona yanıt olarak doğru antikodonu taşıyan tRNA'nın seçilmesi.*

## *rRNA'lar*

rRNA'lar ribozomun hem yapısal hem de katalitik belirleyicisidir

- Temelde *ribozom yapısını oluştururlar ve* aralarında H bağları oluşturarak *ribozomun iki alt biriminin bir arada bulunmasına yardım ederler.*
- mRNA ile baz eşleşmesi özelliğinden dolayı *protein sentezine katılırlar.* Yüklü tRNA'ların antikodon ilmekleri ve mRNA'nın kodonları küçük alt birimdeki rRNA ile ilişki kurarlar.



# Entomolojide Sıklıkla Kullanılan Moleküler Teknikler

Nükleik Asit (DNA, RNA) İzolasyonu

PCR

PCR-RFLP

Real-time PCR

Droplet-digital PCR

RNA interferans

Omics Yaklaşımları

# Nükleik Asit (DNA, RNA) İzolasyonu

- Amaca göre böceklerden DNA ve RNA izolasyonu moleküler çalışmalarda temel (birincil) aşamayı oluşturur.
- DNA ve RNA'nın düzgün bir şekilde izolasyonu sonraki aşamalar açısından oldukça önemli olup, izole edilen nükleik asitin, jel elektroforezi, klonlama ya da dizileme yoluyla kontrolü mümkündür.
- RNA çalışmaları, DNA çalışmalarına göre daha fazla hassasiyet gerektirir çünkü RNA daha az stabildir. (Özellikle RNA'yı parçalayan RNAz enzimleri avucumuzdaki terde bulunur!)
- Bütün nükleik asit çalışmalarında kontaminasyon riskinin azaltılması açısından ortamın ve kullanılan araç gereçlerin steril & temiz olması önemlidir.
- Nükleik asit izolasyonunda pek çok yöntem vardır. Günümüzde hazır kitleri zamandan büyük tasarruf sağlamakta ve işlemleri oldukça kolay hale getirmektedir.

# PCR

- In vitro koşullarında DNA dizilerinin çoğaltılması esasına dayanan bir tekniktir.
- Dirençli ve hassas bireyler arasında single nucleotide polymorphisim (SNP) veya mutasyonların taranması: 1 Bazın varlığı ya da yokluğu

# PCR-RFLP

- Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA'nın farklı büyüklükteki fragmanlara ayrılması **RFLP** (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır. Bu yöntem polimorfizm çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. **RFLP** tek nokta mutasyon analizlerinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

# Real-Time PCR (qPCR)

- DNA'nın ya da mRNA örneklerinin çoğaltımını ve ürünlerinin miktarını tespit etmeye yönelik bir yöntemdir.
- Real-time PCR floresan tabanlı deteksiyon yöntemi ile amplifiye edilen ürünün gerçek zamanlı takip edilebilmesini sağlar. qPCR, bir referans gene göre normalizasyon gerektirdiği için relatif kantitasyon yapabilmektedir.
- Real time PCR, mRNA ekspresyon analizleri, DNA kopya sayısı ölçümleri, allellerin ayırımı veya SNP genotiplemelerini tespit edebilir.
- Direnç çalışmalarında referans gen olarak kabul edilen ekspresyonu sabit olan bir gen baz alınarak hedef genin ekspresyon seviyesi hakkında bilgi sahibi olunabilir.

# Droplet-digital PCR (Dijital damlacıklı PCR, ya da ddPCR)

- Geleneksel PCR temelinde, DNA'nın bir yağ emülsiyonu içerisinde damlacıklara parçalanması sonucu, teker teker floresan detektör tarafından tespit edilmesi metoduna dayanır. Bu yöntem, teker teker okuma aldığından örneklerin mutlak kantitasyonunu sağlar ve referans gene ihtiyaç duymaz.
- 20 $\mu$ l örnekten 20.000 damlacık oluşturularak, her bir damlacıktan ayrı bir okuma elde edilerek hassasiyet ve doğruluk artar. Bu şekilde düşük varyant fraksiyonuna sahip mutasyonlar da tespit edilebilir.
- Bu teknikte özellikle yüksek kopya sayısındaki küçük sayıda değişimleri tespit etmek mümkündür.

# RNA interferans (Gen susturma)

- RNAi yönteminin entomolojide kullanımı yenidir.
- RNA interferans (RNAi), mRNA degradasyonuna dayalı fonksiyonel bir genom analiz tekniğidir. Diğer bir deyişle genlerin ne işe yaradığını anlamamızı sağlar.
- RNAi, gene spesifik iki sarmallı RNA'lar (dsRNA'lar) kullanılarak, ökaryot modellerde ilgili mRNA'nın parçalanması sağlanır.
- RNAi gene spesifiktir.
- Günümüzde direnç çalışmalarında en popüler teknik hale gelmiştir. Bu metotta dirençten sorumlu olduğu düşünülen gen spesifik olarak hedeflenmektedir!

# RNA interferans'ın Etki Mekanizması

1. Hücre içerisine giren dsRNA, dicer adı verilen bir RNaz III enzimi tarafından 21-23 nükleotitten oluşan siRNA adı verilen küçük RNA'lara parçalanır.
2. siRNA'lar "RNA induced silencing complex (RISC)" olarak bilinen endonükleaz komplekslerine bağlanır.
3. siRNA'lar, tek sarmallı RNA'lara dönüşür ve RISC komplekslerini, eşlenikleri olan mRNA'ya yönlendirerek bu mRNA'ları parçalar. Böylece protein sentezi gerçekleşmez.