

Moleküler Hücre Biyolojisi I

Hafta 10: Protein DNA ve RNA'nın manipülasyonu

Dr Arzu ATALAY

- Hücrelerin eldesi ve kültürde büyütülmesi
- Proteinlerin saflaştırılması ve analizi
- DNA'nın analizi ve manipülasyonu
- Gen ifadesinin ve fonksiyonunun analizi

Hücre çözeltilisinden ayrıştırılan hücrelerden değişik hücre türleri ayrılabilir:

Floresanla etkinleşmiş hücre tasnifleyici
Lazer yakalamalı mikrokesim

Hücreler kültür kabında çoğaltılabilir

Ökaryotik hücre hatları yaygın bir homojen hücre kaynağıdır

Embriyonik kök hücre kültürleri tıbbi öneme sahiptir

Somatik hücre çekirdek transplantasyonu (SCNT) kişisel kök hücre oluşturma yoludur

Hibridoma hücre hatları sürekli bir monoklonal antikor kaynağıdır

Organeler ve makromoleküller ultrasantrifüj ile ayrılabilir

Hız(A) ve denge(B) santrifüjlerinde sırası ile sukroz veya cesyum klorür gibi yoğun gradyentler kullanılır

Proteinler kromatografi ile ayrılabilir

Farklı kromatografi tipleri:

Uygun matris seçilerek proteinler **yüklerine** (iyon deęiřtirici kromatografi), **büyükliklerine** (jel-filtrasyon kromatografisi), belirli küçük molekül ya da makromoleküllere **bağlanma** yeteneklerine göre (ilginlik kromatografisi) ayrılabilir.

Epitop etiketleme proteinlerin saflaştırılması ve lokalizasyonunun belirlenmesinde kullanılır

Bir proteinin büyüklüğü ve altbirimlerinin niteliği SDS poliakrilamid elektroforezi ile belirlenebilir (SDS-PAGE)

SDS-PAGE’i takiben coomassie blue boyaması ile saflaştırılan proteinin analizi gerçekleştirilebilir

Western emdirimi (immün emdirim) ile spesifik proteinler tayin edilir

Kütle spektroskopisi peptid parçacıklarının dizisini belirlemek ve proteinleri tanımlamak amacı ile kullanılabilir: MALDI-TOF

Matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight spectrometry
Matriks destekli lazer çözünümlü iyonlaşma-uçuş süresi spektrometrisi

2 boyutlu jeller ile yüksek ayırıştırma gücü elde edilir

Maya ikili hibrid sistemi ile protein protein interaksiyonları tanımlanabilir

SPR (surface plasmon resonance) tekniği ile proteinin bağlanma dinamikleri gerçek zamanlı gözlenebilir

FRET (Fluorescence resonance energy transfer) tekniğinde farklı florokromlarla işaretli proteinlerin mikroskopi ile takibinde hücre içi lokalizasyonları da belirlenir

Protein fonksiyonları küçük moleküller ile engellenebilir

X-ray kristalografi ile atomik rezolüsyonla protein yapıları tanımlanabilir

NMR (Nuclear Magnetic Resonance) spektroskopisi ile solüsyon içindeki proteinlerin yapısı tanımlanabilir

BLAST ile homolog proteinler tanımlanabilir

Büyük DNA molekülleri restriksiyon nükleazları ile parçalara ayrılabilir

Restriksiyon nükleazları birbirine kolayca eklenen DNA parçacıkları oluşturur

Farklı büyüklükteki DNA molekülleri jel elektroforezi ile ayrılır

DNA molekülleri *in vitro* işaretlenerek DNA probları oluşturulur

Nükleik asit hibridizasyon tepkimeleri özel nükleotid dizilerini belirlemek için duyarlı bir yöntemdir

Nükleik asit hibridizasyon yöntemi ile klonlanmış bir DNA parçacığının mRNA molekülündeki karşılığı bulunabilir

Northern ve Southern emdirimi elektroforezle ayrılan nükleik asit moleküllerinin hibridizasyonunu sağlar

**Genler DNA kütüphanesinden klonlanabilir:
DNA parçacığı DNA ligaz yardımı ile plazmide yerleştirilir
Bakteride belirli bir DNA dizisi saflaştırılıp çoğaltılabilir**

Maya yapay kromozomları daha büyük DNA parçaları taşırlar

İki değişik gen kütüphanesi (genomik ve cDNA) farklı amaçlara hizmet eder

**Seçilen DNA parçaları test tüpünde hızla çoğaltılabilir:
PCR**

PCR ile genom ya da cDNA klonları oluşturulur

PCR adli tıpta kullanılmaktadır

(VNTR: değişik sayıda ardışık tekrarlar)

İstenen proteinlerin hücrede çoğaltılması için ifade taşıtlarına klonlanmaları gerekmektedir

(memeli, bakteri, maya veya böcek hücresi)

Enzimatik (dideoksi) yöntemi ile DNA dizi analizi yapılır

Nükleotid dizileri proteinlerin amino asit dizisini tahmin amacıyla kullanılabilir

Gen ifadesinin ve işlevinin incelenmesi:

Klasik genetik çalışmalarını gelişigüzel mutagenез çalışmalarını ile başlar.

Genetik tarama ile hücresel işlevlerde yetmezliğe neden olan mutantlar saptanabilir: *C.elegans* örneği

Gen ifadesinin ve işlevinin incelenmesi:

Sıcaklığa duyarlı bakteri veya maya mutantlarının taranması

**Gen mutasyonları protein ürünlerini farklı şekilde etkilerler:
Fonksiyon kaybı mutasyonu, fonksiyon kazanımı mutasyonu**

**Genetik, genlerin işlev sırasını belirlemek amacı ile
kullanılabilir**

Genlerin yeri bağlantı analizi ile saptanabilir

**İnsan genleri haplotip blokları halinde kalıtıldığından
hastalığa yol açan mutasyonları tanımlamaya imkan sağlar**

İşlev kazanımı mutasyonları genlerin hücrede ya da organizmadaki rolü hakkında bilgi verirler

(wnt ektopik yanlış ifadesi sonucu Xenopus embriyosunda ikinci bir vücut eksenini geliştirir)

Laboratuvarda hazırlanmış genler aracılığı ile diploid organizmalarda eksi yönde baskın özel mutasyonlar oluşturulabilir

(Büyük protein kompleksleri inaktif hale getirilebilir)

Gende protein kodlayan bölgenin yere yönlendirilmiş mutagenesis ile değiştirilmesinde sentetik oligonükleotidler kullanılmaktadır

Gen hedefleme belirli genleri değiştirilmiş gen aktarımlı fareler hazırlanmasına olanak verir:

Transkripsiyon ve DNA onarımında rol alan DNA helikaz enzimi mutant fare erken yaşlanma fenotipi göstermektedir

Gen aktarımlı bitki elde edilmesi için kullanılan başlıca yöntemde Agrobacterium aracılı aktarım yapılır

RNA interferans gen fonksiyonunu anlamak için kullanılan hızlı ve basit bir yöntemdir

Bildirici genler bir genin nerede ve ne zaman ifade edildiğini gösterir

***In situ* hibridizasyon bir genin nerede ve ne zaman ifade edildiğini gösterir**

Gen ifade seviyeleri kantitatif QRT-PCR ile belirlenebilir

Mikrodizinlerle binlerce genin ifadesi aynı anda takip edilir

Eşgüdüm içinde düzenlenen gen gruplarını saptamak için küme incelemesi gerçekleştirilir

Tek hücre analizi biyolojik “gürültü” ortaya çıkarır