

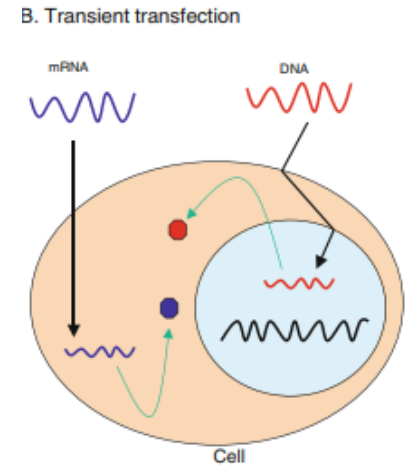
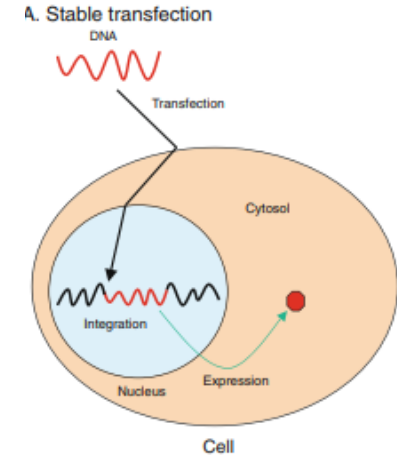
# HAFTA XII

Gen transfer teknikleri  
Transfeksiyon, transdüksiyon  
Memeli hücre kültüründe overexpression  
RNAi ile gen susturma

# Transfeksiyon

- Yabancı nükleik asitlerin ökaryotik hücre içerisine aktarılmasını ve bu sayede genetik olarak modifiye edilmiş hücrelerin oluşturulmasını sağlayan deneysel teknik transfeksiyon olarak adlandırılır.
- Transfeksiyon, gen fonksiyonu, regülasyonu ve protein fonksiyonu araştırmalarına olanak sağlayan güçlü analitik bir araçtır.
- Hücre içine aktarılan genetik materyalin karakteristik özelliklerine bağlı olarak, transfeksiyon stabil ya da geçici olabilir.

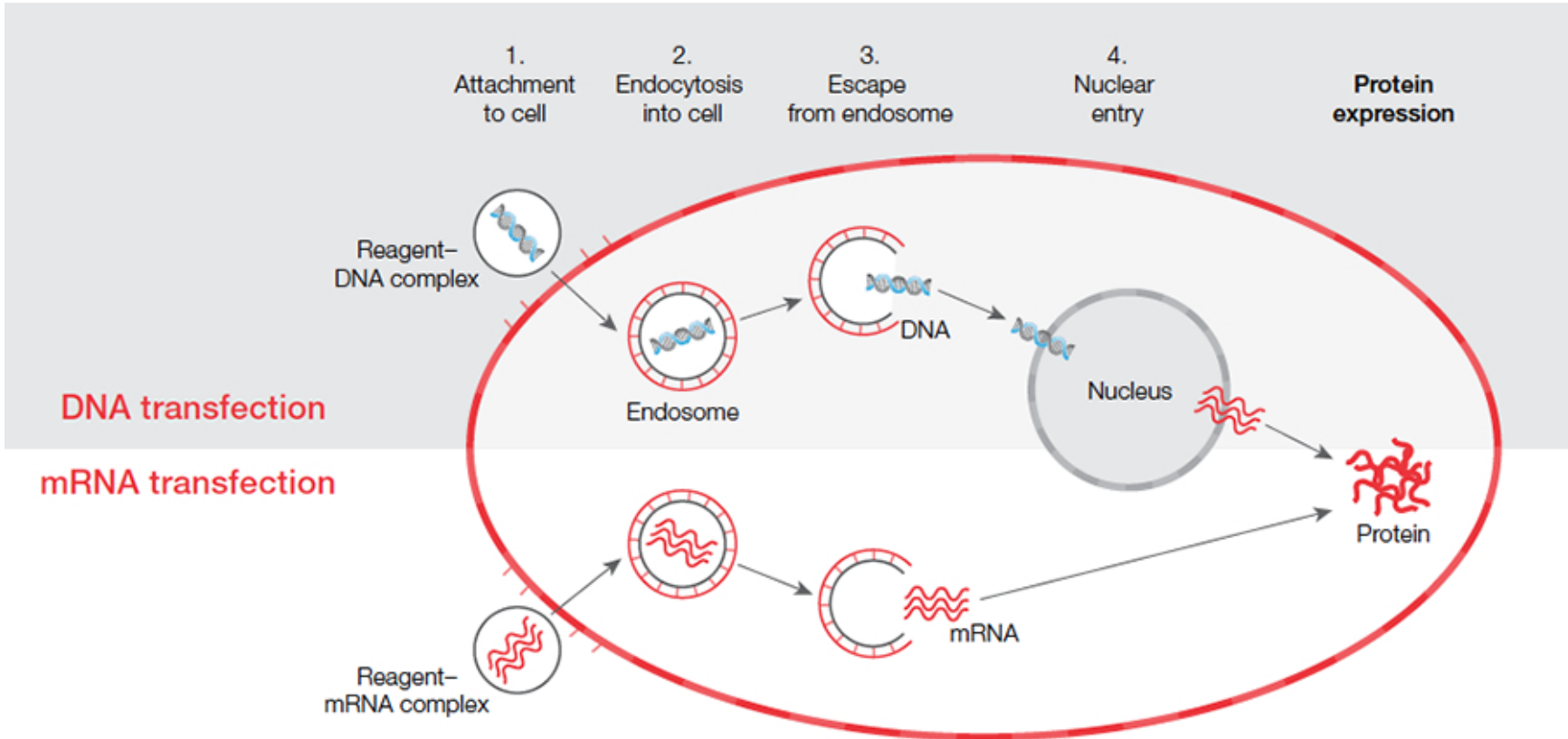
- Stabil transfeksiyon için, aktarılabacak genetik materyal genellikle transgen adı verilen ve transfekte olmayan hücrelerden ayrıştırılması amacıyla bir markır gen içerir ve konak genomuna entegre olarak hücre replikasyonu ile yeni hücrelere aktarılır.
- Transient/geçici transfeksiyonda transfecte edilen genler sadece belirli bir zaman periyodunda eksprese olur ve genomu entegre olmaz. Transient transfeksiyonda genetik materyal çevresel faktörlerin etkisiyle ya da hücre bölünmesi sonrası kaybolabilir.
- Yapılacak deneyin mahiyetine göre transfeksiyon yöntemi seçilmelidir.

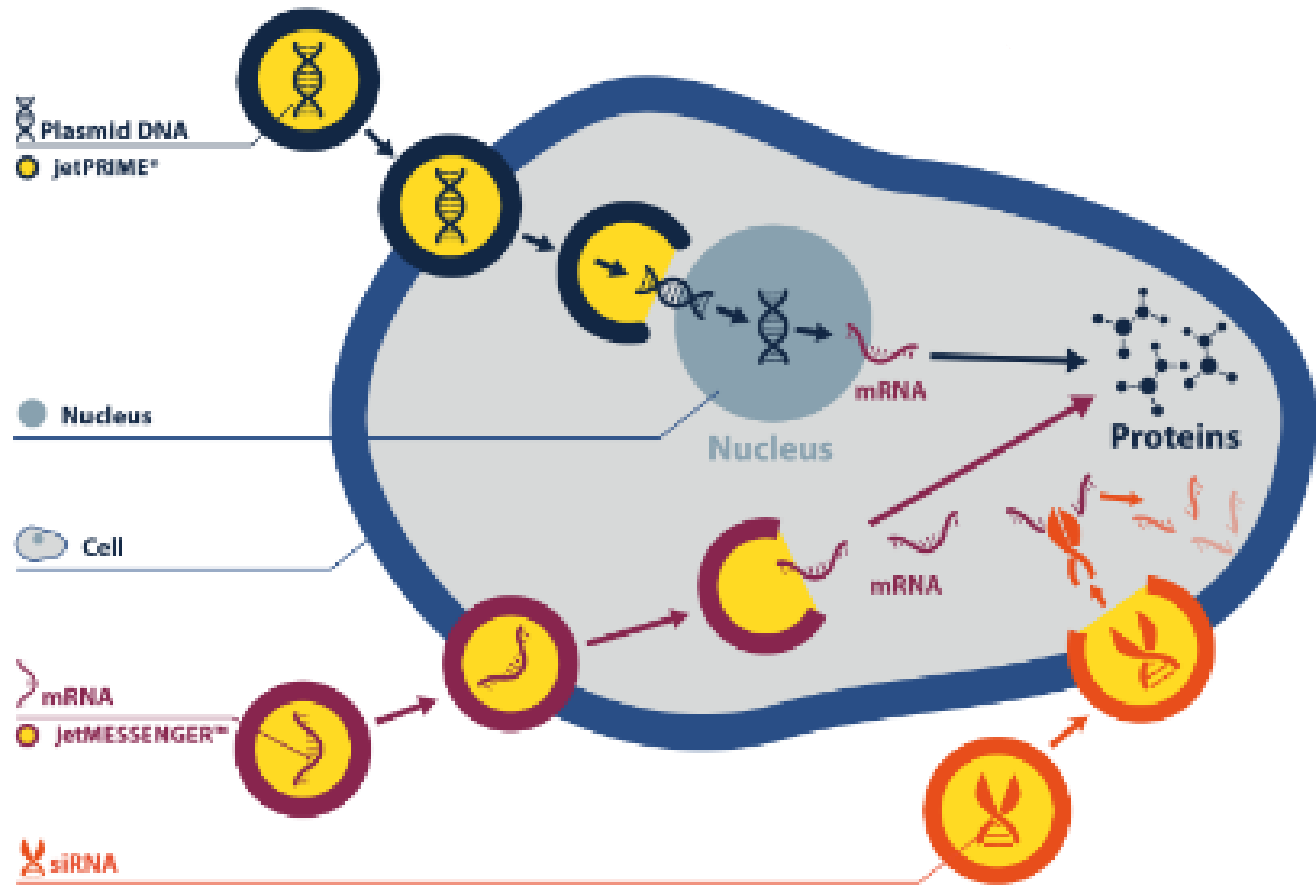


- Transfeksiyonun temel amacı hücre içinde spesifik bir gen aktivitesini engelleyerek ya da tetikleyerek genlerin fonksiyonunu ya da ortaya çıkan gen ürünlerini çalışmaktır.
- Transfeksiyon tekniğiyle ayrıca memeli hücrelerinde rekombinant protein üretimi sağlanır.
- Transfeksiyonun uygulama alanına örnek olarak aşağıdakiler listelenebilir:
  - Bir genin ilgili hücreye aktarılması sayesinde gen terapi adı altında hastalıkların tedavisi ve semptomların hafifletilmesi sağlanabilir.
  - IPS hücreleri 3 ya da 4 transkripsiyon faktörünün hücre içine aktarılması ile oluşturulmaktadır.
  - siRNA knock-down prosedürleri
  - İmmortalize CHO hücrelerinde insan doku plasminojen aktivatörü üretimi

# Transfeksiyon metodları

Class	Methods	Advantages	Disadvantages	Examples
Biological	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus-mediated</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High-efficiency</li> <li>- Easy to use</li> <li>- Effective on dissociated cells, slices, and in vivo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Potential hazard to laboratory personnel</li> <li>- Insertional mutagenesis</li> <li>- Immunogenicity</li> <li>- DNA package size limit</li> </ul>	Herpes simplex virus, Adeno virus, Adeno-associated virus, Vaccinia virus, Sindbis virus
Chemical	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cationic polymer</li> <li>• Calcium phosphate</li> <li>• Cationic lipid</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- No viral vector</li> <li>- High-efficiency</li> <li>- Easy to use</li> <li>- Effective on dissociated cells and slices</li> <li>- Plenty of commercially available products</li> <li>- No package size limit</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Chemical toxicity to some cell types</li> <li>- Variable transfection efficiency by cell type or condition</li> <li>- Hard to target specific cells</li> </ul>	DEAE-dextran, polyethyleneimine, dendrimer, polybrene, calcium phosphate, lipofectin, DOTAP, lipofectamine, CTAB/DOPE, DOTMA
Physical	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Direct injection</li> <li>• Biolistic particle delivery</li> <li>• Electroporation</li> <li>• Laser-irradiation</li> <li>• Sonoporation</li> <li>• Magnetic nanoparticle</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Simple principle and straightforward</li> <li>- Physical relocation of nucleic acids into cell</li> <li>- No need for vector</li> <li>- Less dependent on cell type and condition</li> <li>- Single-cell transfection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Needs special instruments</li> <li>- Vulnerable nucleic acids</li> <li>- Demands experimenter skill, laborious procedure</li> </ul>	Micro-needle, AFM tip, Gene Gun, Amaxa Nucleofector, phototransfection, Magnetofection





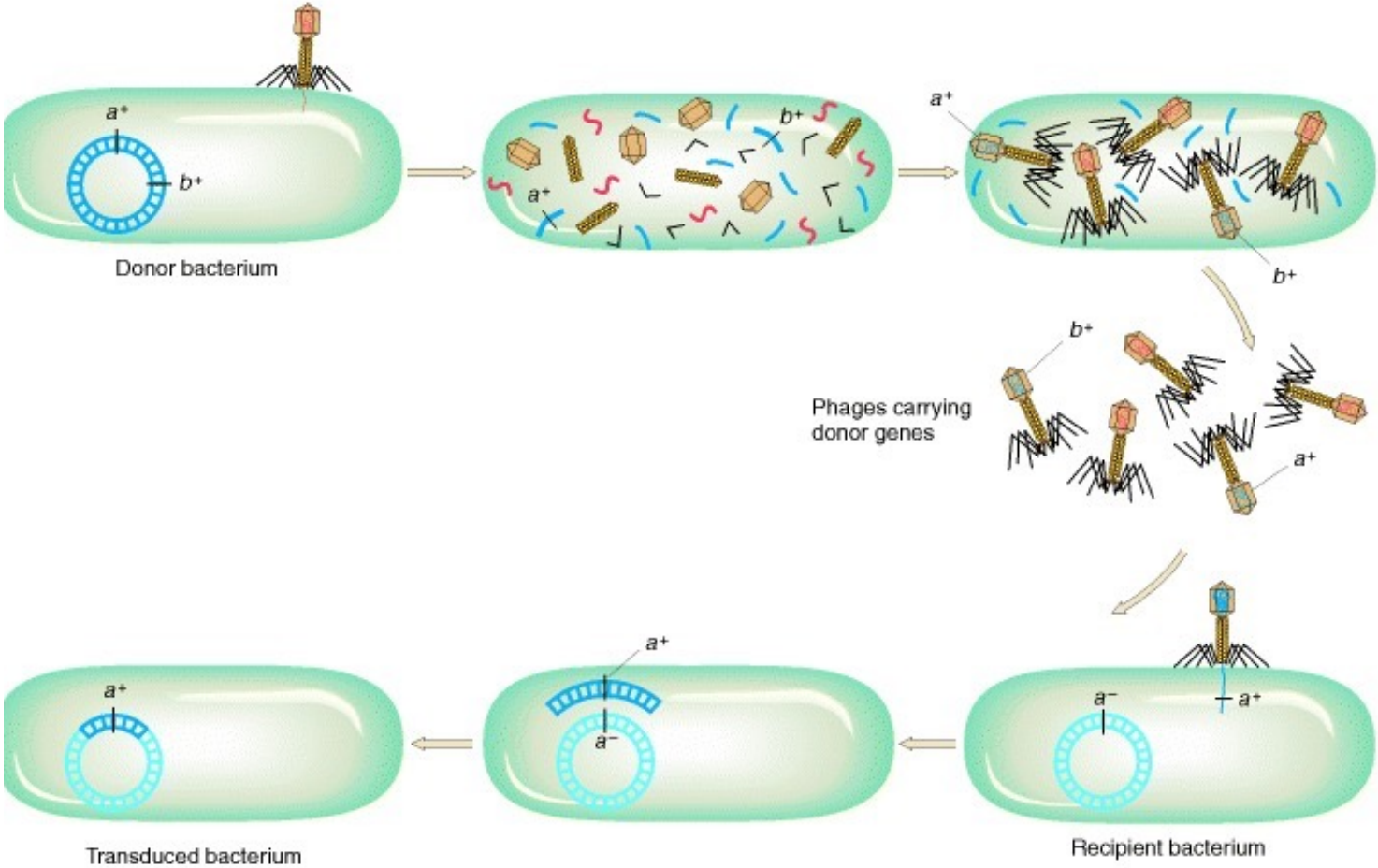
# Transdüksiyon



- Genetik materyalin bir bakteriden bir diğerine virüs tarafından prosesine transdüksiyon denir. Bakteriyofaj olarak adlandırılan virüsler bakteri hücrelerini enfekte edebilmekte ve daha fazla virüs üretebilmek için bakteriyi konakçı olarak kullanmaktadır.
- Çoğaldıktan sonra bu virüsler konakçı hücre DNA'sına entegre olur ve sıklıkla bakteriyel DNA'nın bir kısmını koparır. Bu bakteriyofajlardan biri başka yeni bir hücreyi enfekte ettiğinde, bakteriyofaja entegre olan bakteri DNA'sı yeni konakçı bakterinin genomuna entegre olur.
- İki tip transdüksiyon bulunmaktadır: Genel ve özel
  - Genel transdüksiyonda bakteriyofajlar konak genomunun herhangi bir kısmını alabilir.
  - Özel transdüksiyonda bakteriyofaj konak DNA'nın sadece spesifik bir kısmını alır.
- Bilim insanları transdüksiyon prosedürünü çeşitli konakçı hücrelerde stabil olarak gen entegrasyonunu sağlamak amacıyla kullanmaktadır.

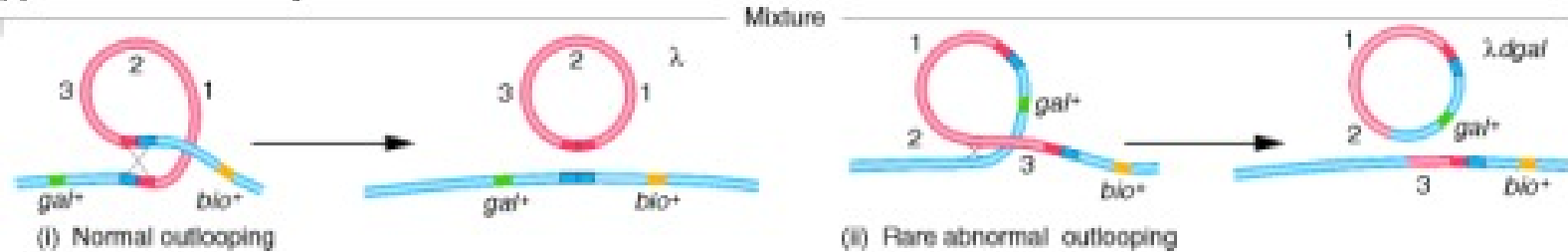


# Genelleşmiş Transdüksiyon



# Özelleşmiş Transdüksiyon

## (a) Production of initial lysate

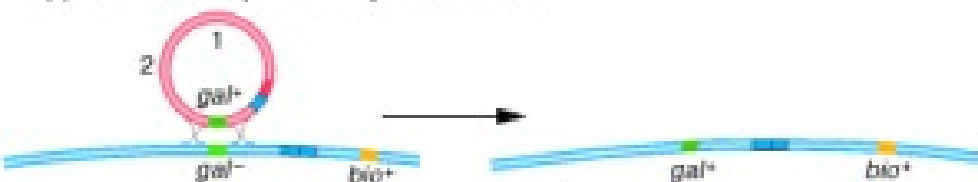


## (b) Transduction by initial lysate

### (i) Lysogenic transductants



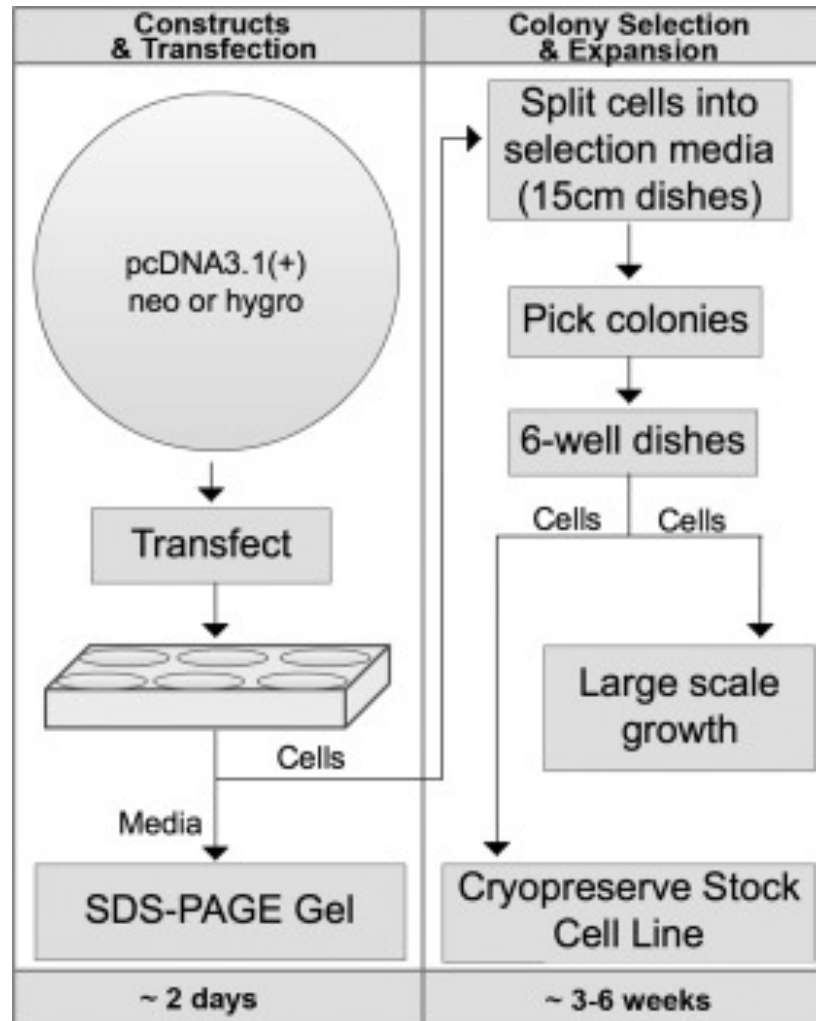
### (ii) Transductants produced by recombination



# Memeli Hücrelerinde Overekspresyon Sistemi

- Biyofarmasötik protein üretimi için en yaygın yöntemlerden biri memeli hücre kültürüdür. Öngörülse olarak, memeli hücre konaklarının daha düşük klasmandaki ökaryotik hücre konakçılardan aşağıdaki konularda daha iyi olduğu muhtemeldir:
  - Ekspresyon
  - Doğru katlanma
  - Salgılanan memeli proteinlerin doğala yakın/benzer post-translasyonel modifikasyonları ve verimi
- Memeli hücrelerinde overeksprese salgılanan proteinlerin glikolizasyon paternlerinin sıklıkla in vivo sentezlenenlerle tutarlı olduğu ve çeşitli konakçı hücre türleri arasındaki küçük farklılıklara rağmen doğada nispeten homojen olarak gözlemlenmektedir.
- Dahası, özellikle stabil memeli hücre hatları kriyojenik koşullar altında saklandığında potansiyel olarak süresiz tekrar kullanılabilen kaynak oluşturmaktadır. Bu sayede güvenilebilir seviyede ve tutarlı protein ekspresyone edilebilir.
- Ancak, farmasötik endüstrisinde, memeli hücrelerinin salgı proteinlerinin overekspresyonu için yaygın olarak kullanılmasına rağmen, akademik laboratuvarlarda daha az tercih edilmektedir

# Memeli Hücrelerinde Over-Ekspresyon



# RNA interferans

- RNA interferans, çoğu ökaryotta milyarlarca yıl boyunca korunmuş ve spesifik olarak gen susturabilme yetisine sahip olan hücresel regülatör mekanizmalardan biridir. 1998’de keşfedilmesinden bu yana, araştırma ve ilaç keşif uygulamalarında temel mekanizmasının anlaşılması yolunda hızlı gelişmeler olmuştur. Son yıllarda araştırma dünyasında, nörodejenerasyon uygulamalarını da kapsayan RNAi uygulamaları, elde edilen gelişmelerle birçok laboratuvarında hızlıca yerini almıştır. Ancak henüz mekanizmanın tamamen anlaşılmamış olmasından dolayı hala akıllarda soru işareti bırakmaktadır.
- Detaylı örnek protokole ‘Specific Gene Silencing Using RNAi in Cell Culture’ adlı makaleden ücretsiz olarak erişebilirsiniz.

# RNA interferans

