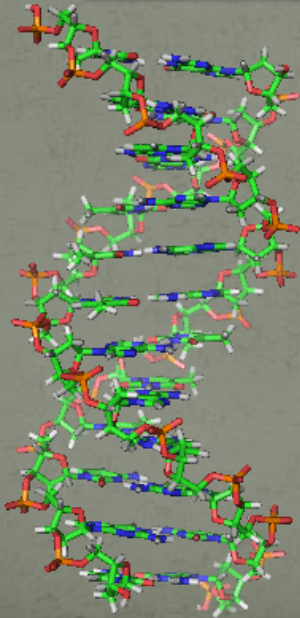
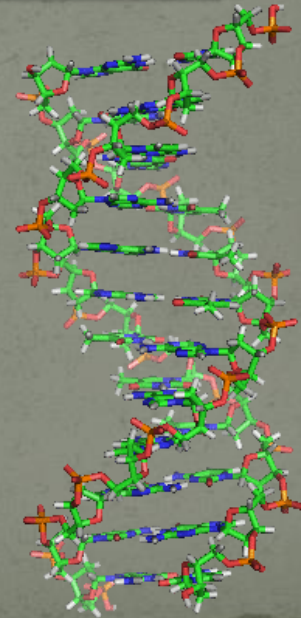


Genleri Deęiřtirmek Hiç Bu Kadar Kolay Olmamıştı

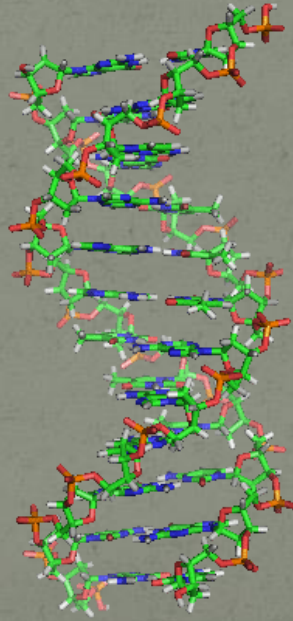
Tanıl Kocagöz



ACIBADEM
ÜNİVERSİTESİ



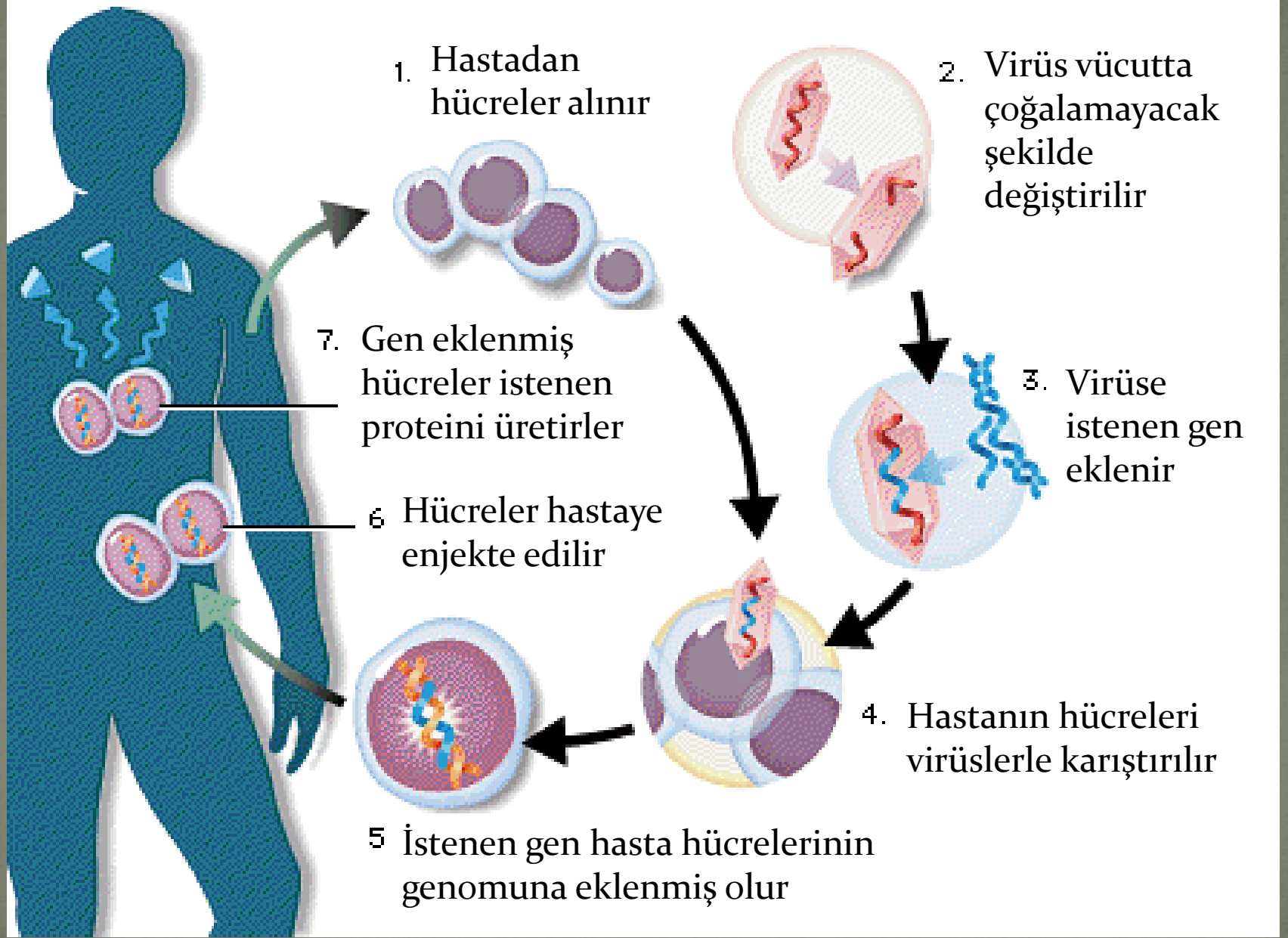
Bir zamanlar kaderimizin yıldızlarda yazılı olduğunu sanıyorduk;
şimdi ise büyük oranda genlerimizde yazılı olduğunu biliyoruz...
James Watson

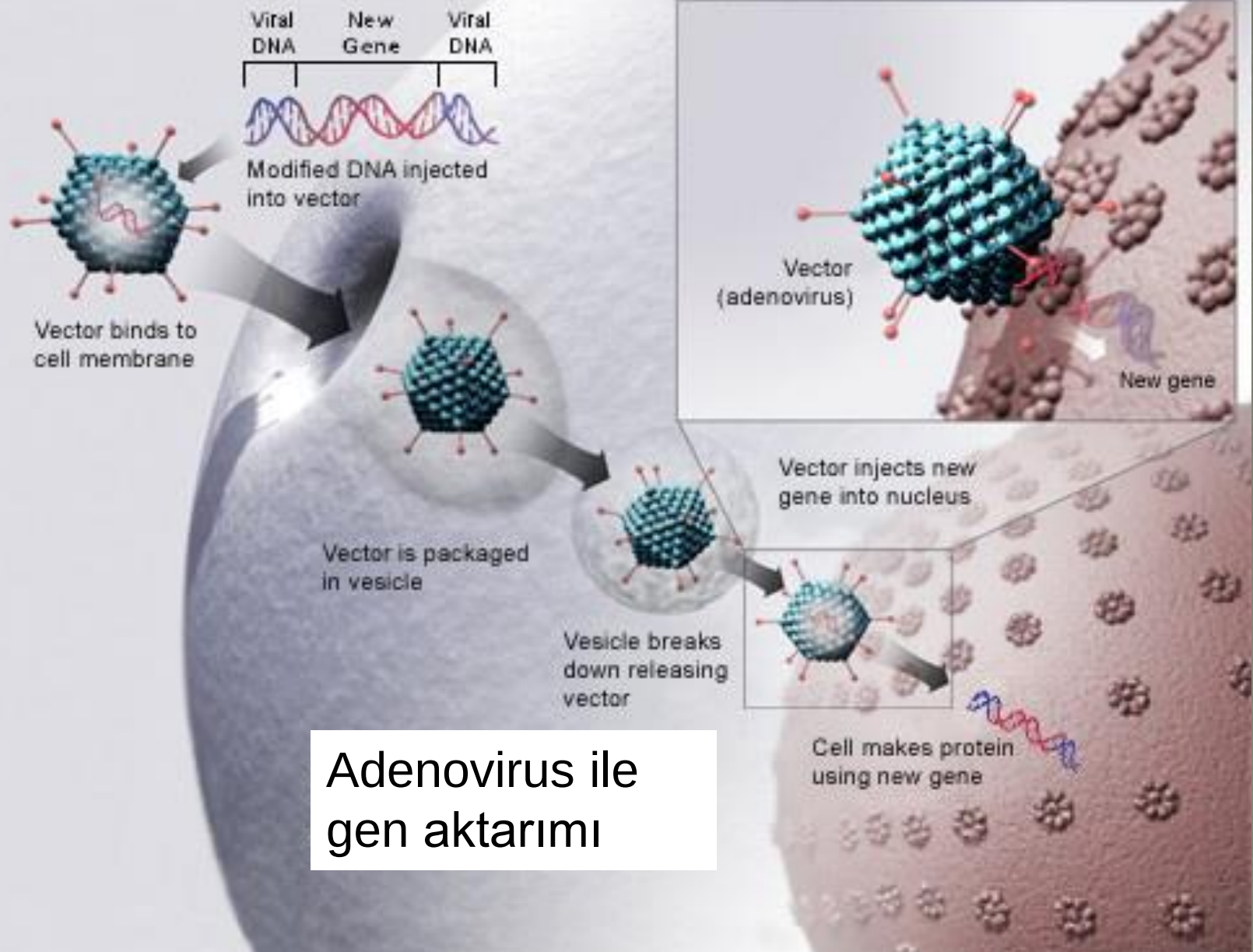


Kaderimizi deęiřtirebilir miyiz?

GEN TEDAVİSİ

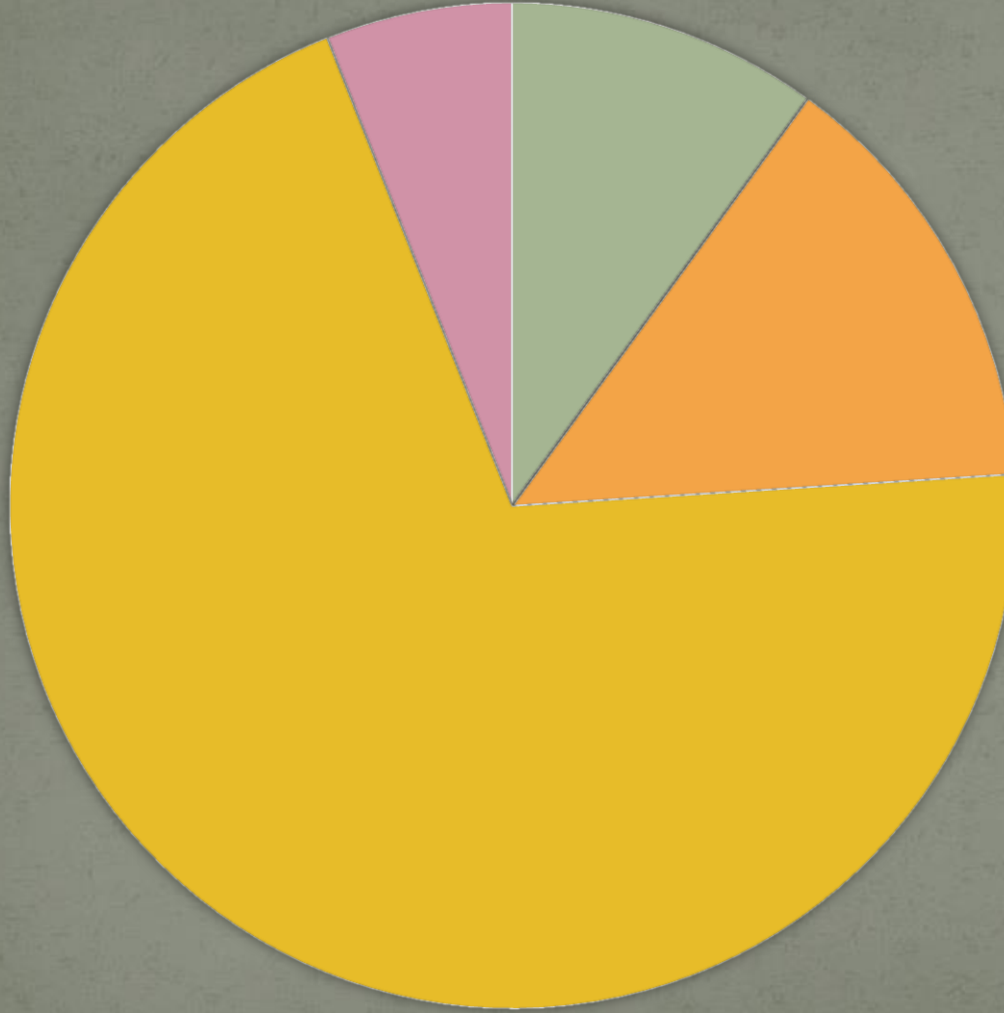
- İşlevsiz bir genin, hatasız bir kopyesinin genomun herhangi bir yerine eklenmesi
- Hatasız bir genin işlevsiz kopyesi ile homolog rekombinasyon yolu ile değiştirilmesi
- Gen düzeltme: İşlevsiz genin tersine mutasyon ile onarılması
- Bir genin regölasyonu (aktive edilmesi ya da susturulması).





Adenovirus ile
gen aktarımı

Gen Tedavisi



■ Enfeksiyon Hastalıkları
%10

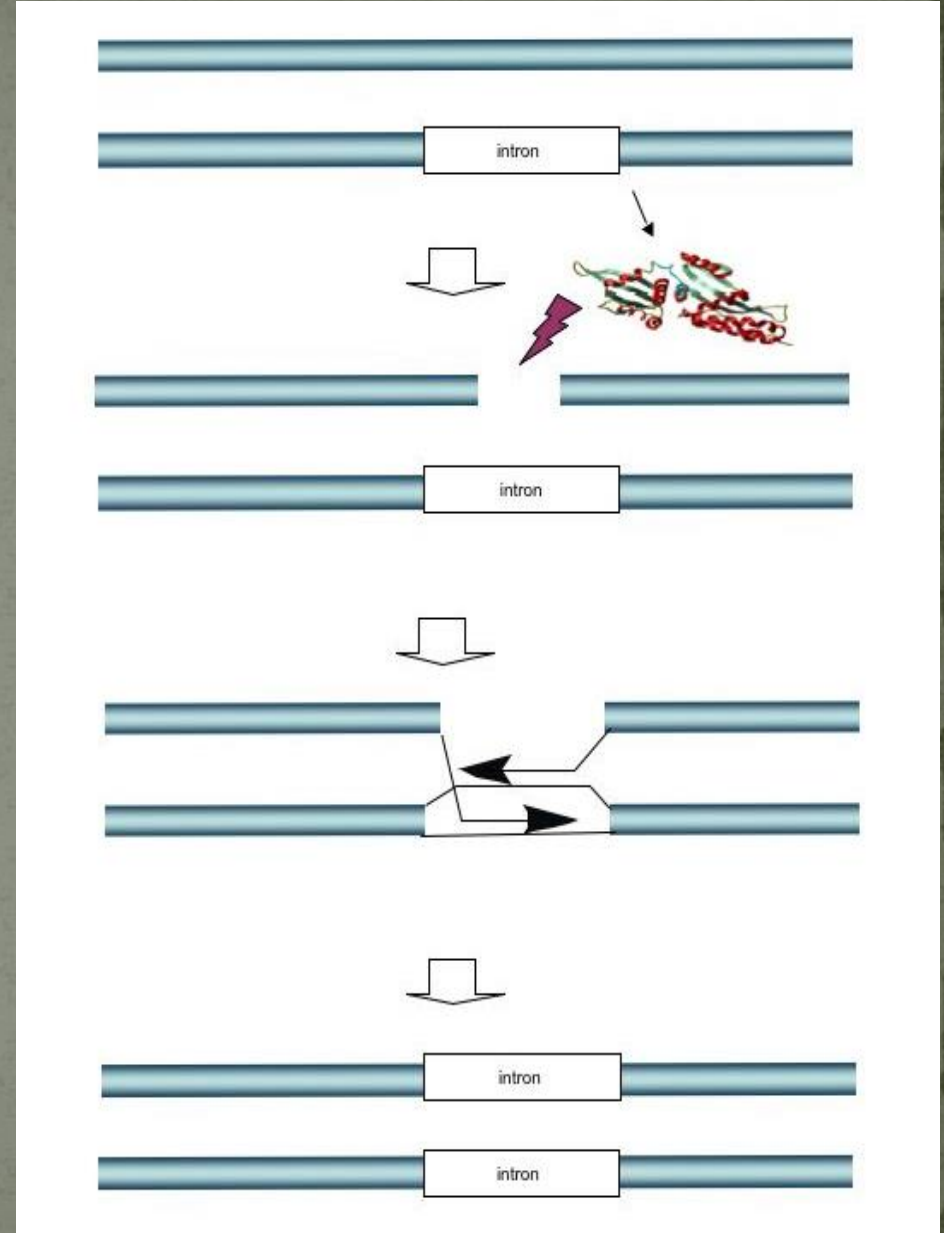
■ Tek gen hastalıkları
%14

■ Kanser %70

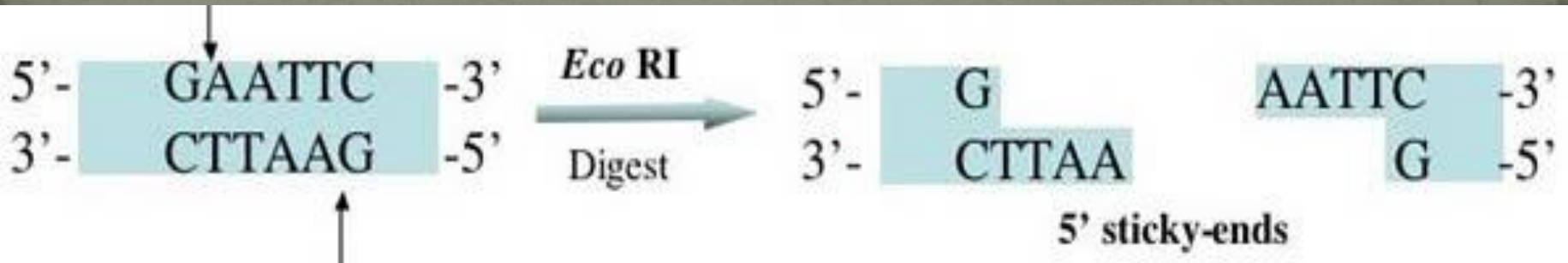
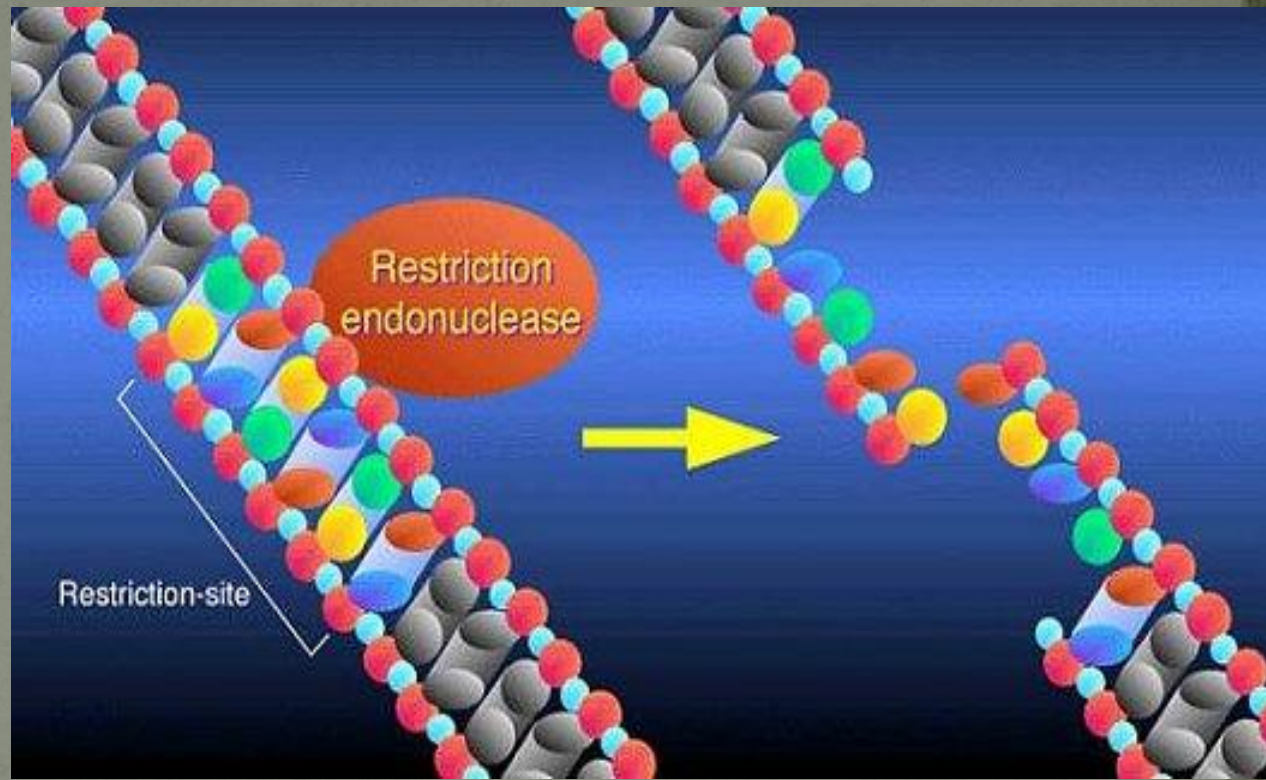
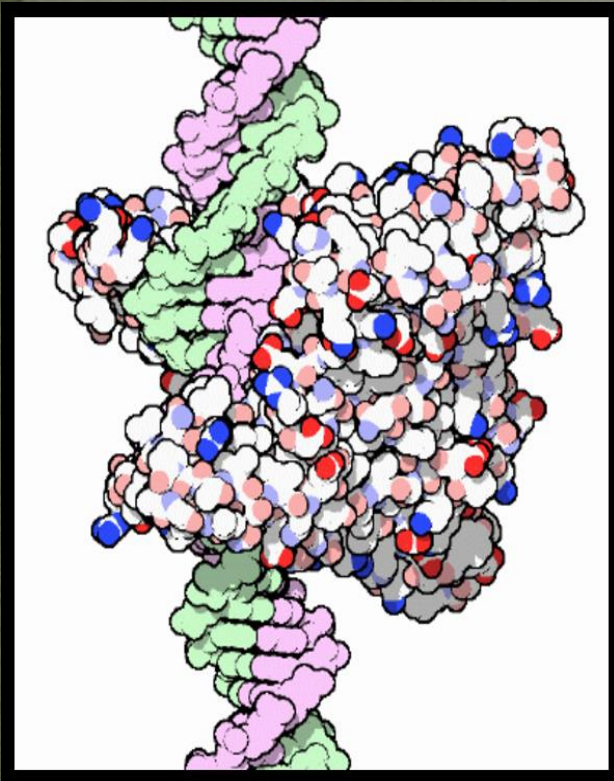
■ Diğer %6

Gen Düzeltme (Gene Editing)

- Genetik mühendislik ile üretilmiş ya da doğal endonükleazlar kullanılarak genlerin eklenmesi, çıkartılması veya değiştirilmesi
- DNA'nın her iki zinciri kesilir sonra hücrenin DNA onarım mekanizması devreye girer; homolog rekombinasyon ile DNA değiştirilir

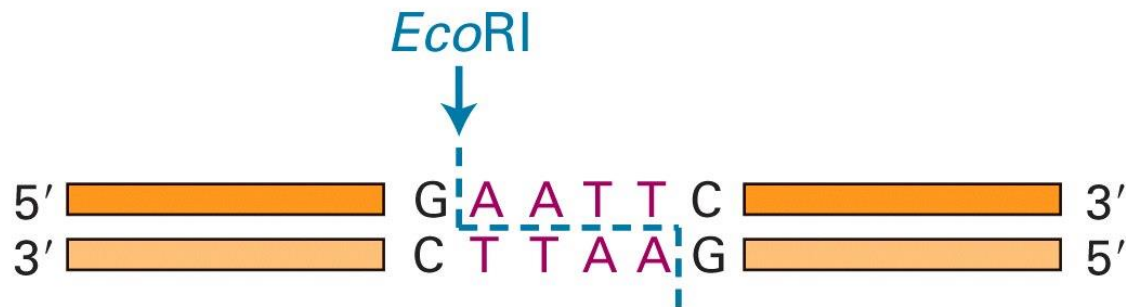


Özgül Endonükleaz

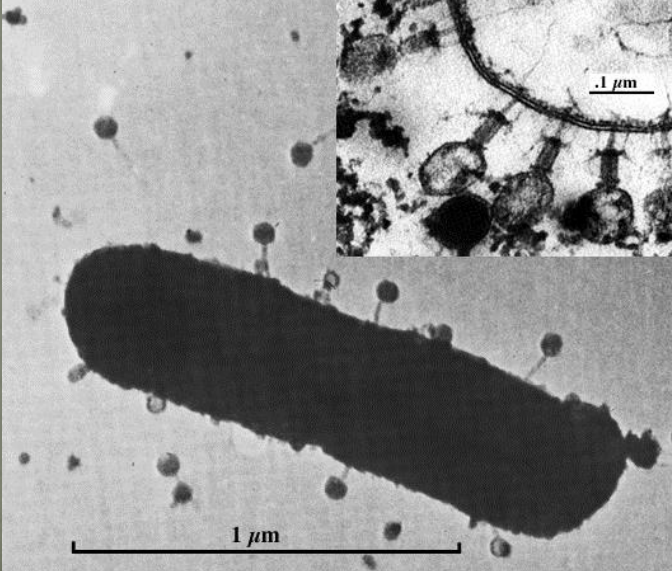
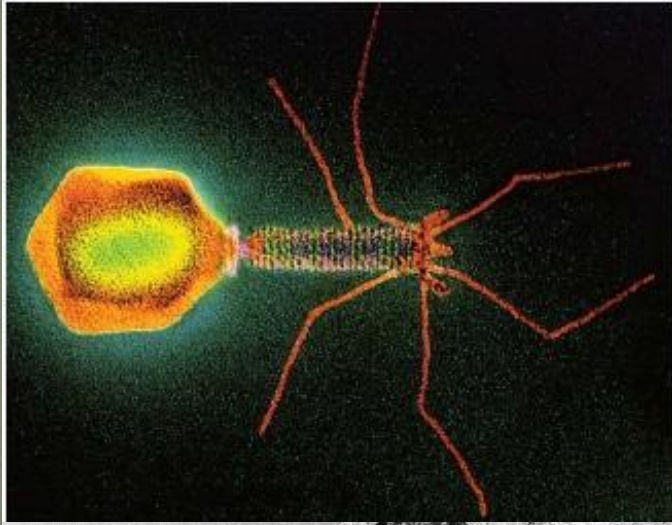


Özgül Endonükleazlar

- Çift zincirli DNA'yı özgül dizilerden tanıyarak kesen enzimlerdir
- Bugüne dek 250 kadar farklı diziyi tanıyabilen 3600 kadar özgül endonükleaz saptanmıştır
- Bakterilerin %25 kadarının en az 1 özgül endonükleaz yapabildiği düşünülmektedir.
- *Neisseria gonorrhoeae*'da 7 özgül endonükleaz bulunduğu saptanmıştır.

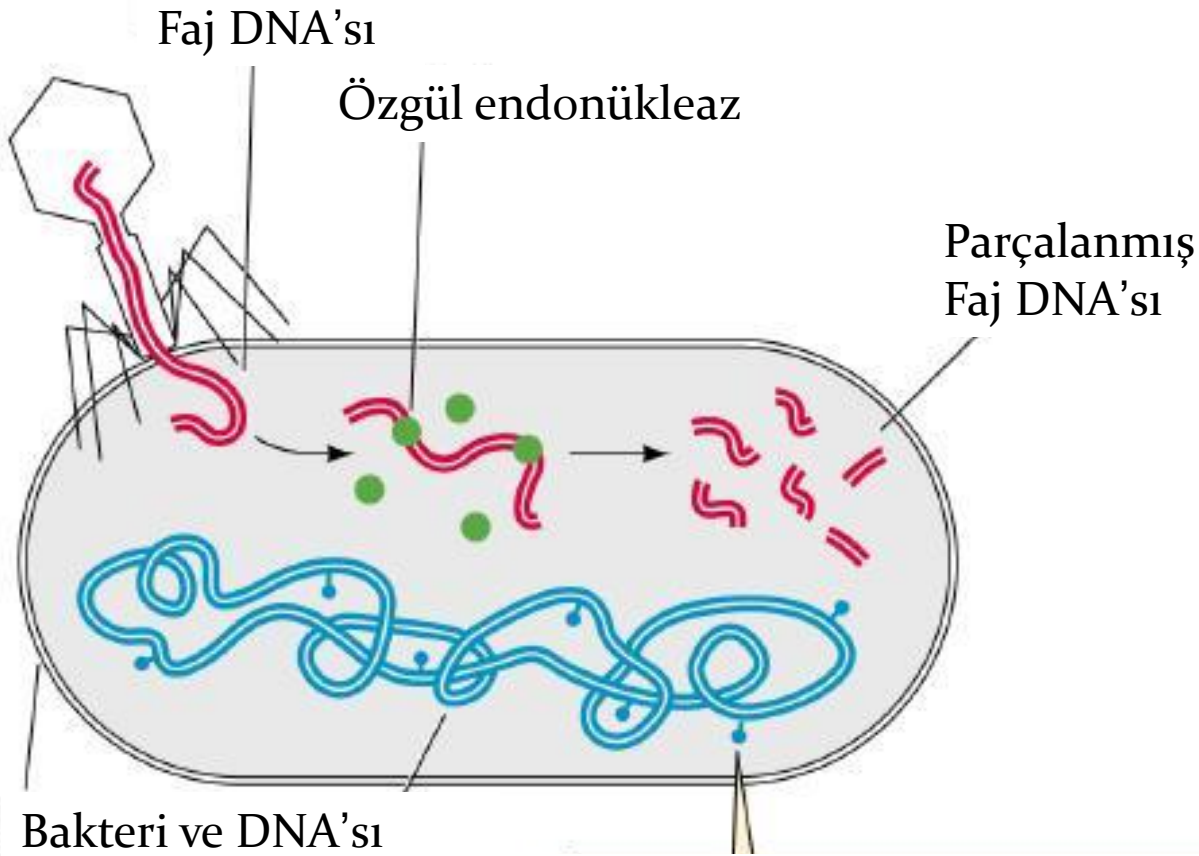


Özgöl Endonükleazların Doğadaki İşlevi



- Bakterileri bakteriyofajlara karşı korurlar
- Bakteriyofaj DNA'sını özgöl dizilerden tanıyarak keserler
- Bakterinin kendi DNA'sı aynı bölgeyi metilleyen enzim tarafından korunur
- Genelde özgöl endonükleaz ve metilaz genleri birbirini izler
- Metilasyon sitozin veya adenin üzerinde

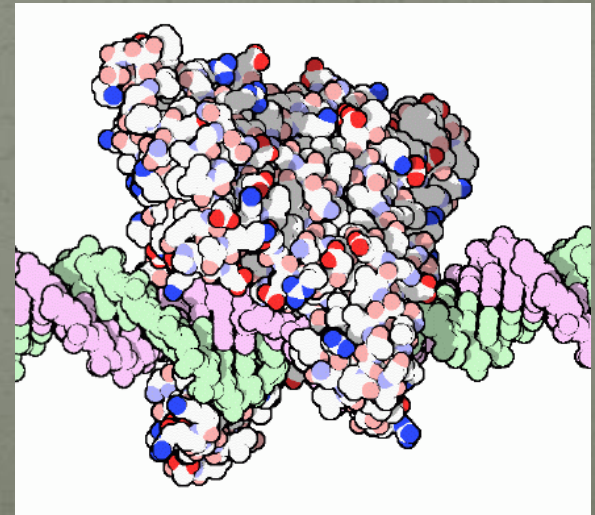
4-metilsitozin, 5-metilsitozin, 5-hidroksimetilsitozin veya 6-metiladenin şeklinde olur.

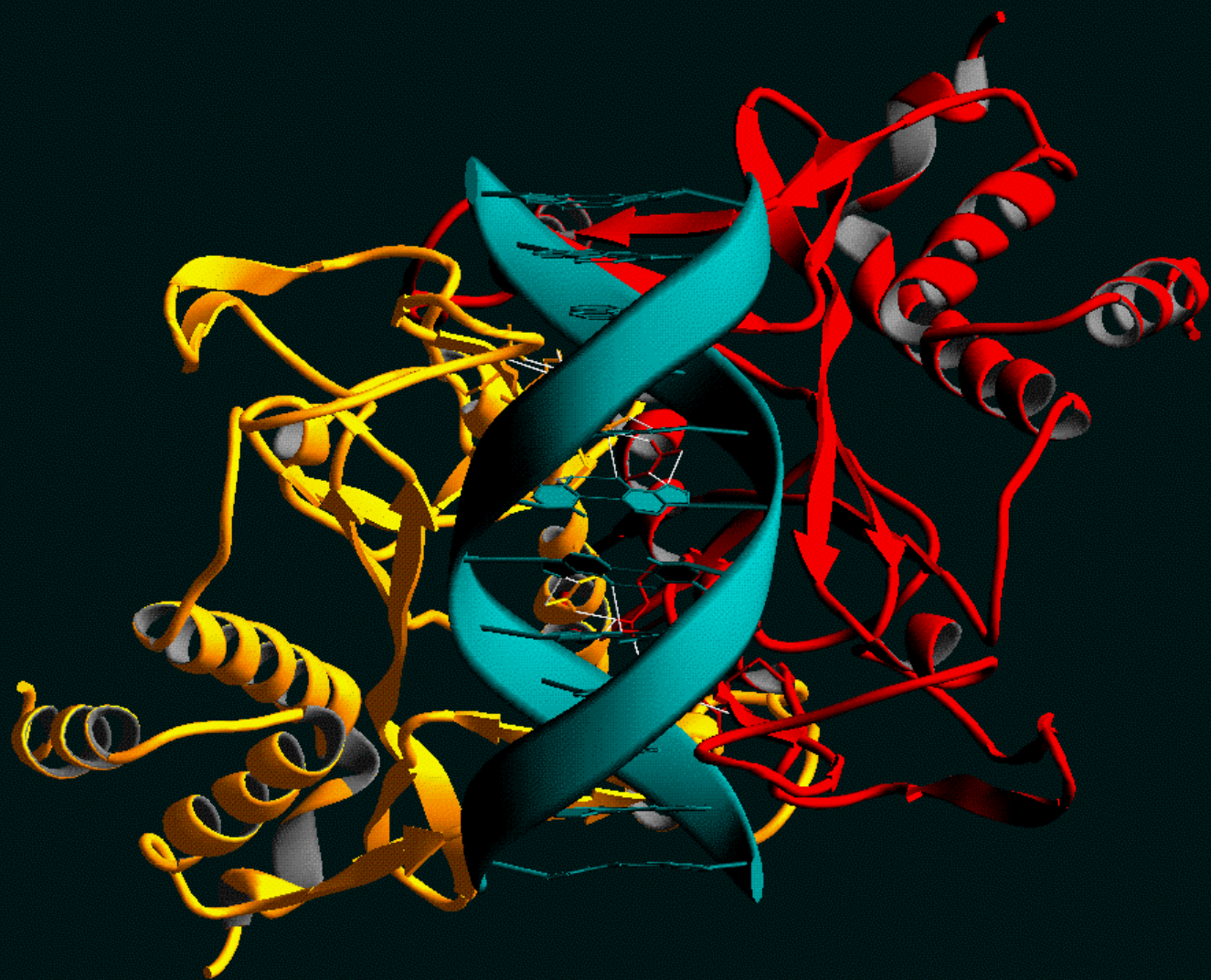


Metil grupları bakteri DNA'sının özgöl endonükleaz tarafından kesilmesini engelliyor

Özgöl Endonükleaz Kesimi

- DNA'ya gevşek bir şekilde bağlanarak 10^7 nükleotit hızla üzerinde kayarak gezer.
- Tanınan özgöl diziye rastlayınca DNA'ya sıkıca bağlanır. 50 kadar su molekülü aradan çıkar. Aktif bölgeye oturttuğu şeker fosfat bağlarını keser





Sınıflandırma

- **Tip I** özgül endonükleazlar belli bir aralık ile yerleşmiş iki diziyi tanıyarak bağlanırlar ve bağlandıkları bölgeden en az 400 nükleotit uzaktan DNA'yı keserler.
- Örnek EcoK I:
- AAC(N6)GTGC(N>400)/
TTG(N6)CACG(N>400)/

- **Tip II** özgül endonükleazlar moleküler biyolojik yöntemlerde kullanılan en önemli grubu oluşturur. Tip II özgül endonükleazlar özelliklerine göre alt tiplere ayrılır.
- **Tip IIa:** Homodimer yapıdadırlar. Genelde palindromik dizileri tanırlar ve tanıma bölgelerinin içerisinde DNA'yı keserler. Kesim ile 3' veya 5' çıkıntılı uçlar ya da künt uçlar oluşturabilirler.
- Örnek EcoR I:

G/AATT C

C TTAA/G

Ava I	Anabaena variabilis	C* C/T C G A/G G
Bam HI	Bacillus amyloliquefaciens	G* G A T C C
Bgl II	Bacillus globigii	A* G A T C T
Eco RI	Escherichia coli RY 13	G* A A T T C
Eco RII	Escherichia coli R245	* C C A/T G G
Hae III	Haemophilus aegyptius	G G * C C
Hha I	Haemophilus haemolyticus	G C G * C
Hind III	Haemophilus influenzae Rd	A* A G C T T
Hpa I	Haemophilus parainfluenzae	G T T* A A C
Kpn I	Klebsiella pneumoniae	G G T A C* C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Mbo I	Moraxella bovis	*G A T C
Pst I	Providencia stuartii	C T G C A* G
Sma I	Serratia marcescens	C C C* G G G
SstI	Streptomyces stanford	G A G C T* C
Sal I	Streptomyces albus G	G* T C G A C
Taq I	Thermophilus aquaticus	T* C G A
Xma I	Xanthamonas malvacearum	C* C C G G G

- **Tip IIb:** Heterotrimer yapıdadırlar. Aralıklı iki diziyi tanıyıp tanıma bölgesinin dışından kesim yaparlar.
- Örnek Bcg I:

/10(N)CGA(N)6TCG(N)12/
/12(N)GCT(N)6ACG(N)10/

- **Tip IIe:** Homodimer yapıdadırlar. Palindromik dizileri tanır ve bu dizi içerisinde ya da yakın bir bölgeden keserler.
- Örnek Nae I:

GCC/GGC
CGG/CCG

- **Tip IIs:** Monomerik yapıdadırlar. Tanıdıkları dizi palindromik değildir. Genellikle çıkıntılı uçlar oluşturarak en az bir zinciri bağlandığı bölge dışından keserler.
- **Örnek Fok I:**

GGATG(N)₉/
CCTAC(N)₁₃/

- **Tip III** özgül endonükleazlar palindromik olmayan dizileri tanırlar ve tanıma bölgesinden yaklaşık 25 nükleotid uzaktan DNA'yı keserler.
- Örnek EcoP 15 I:

CAGCAG(N)₂₅₋₂₆/
GTCGTC(N)₂₅₋₂₆/

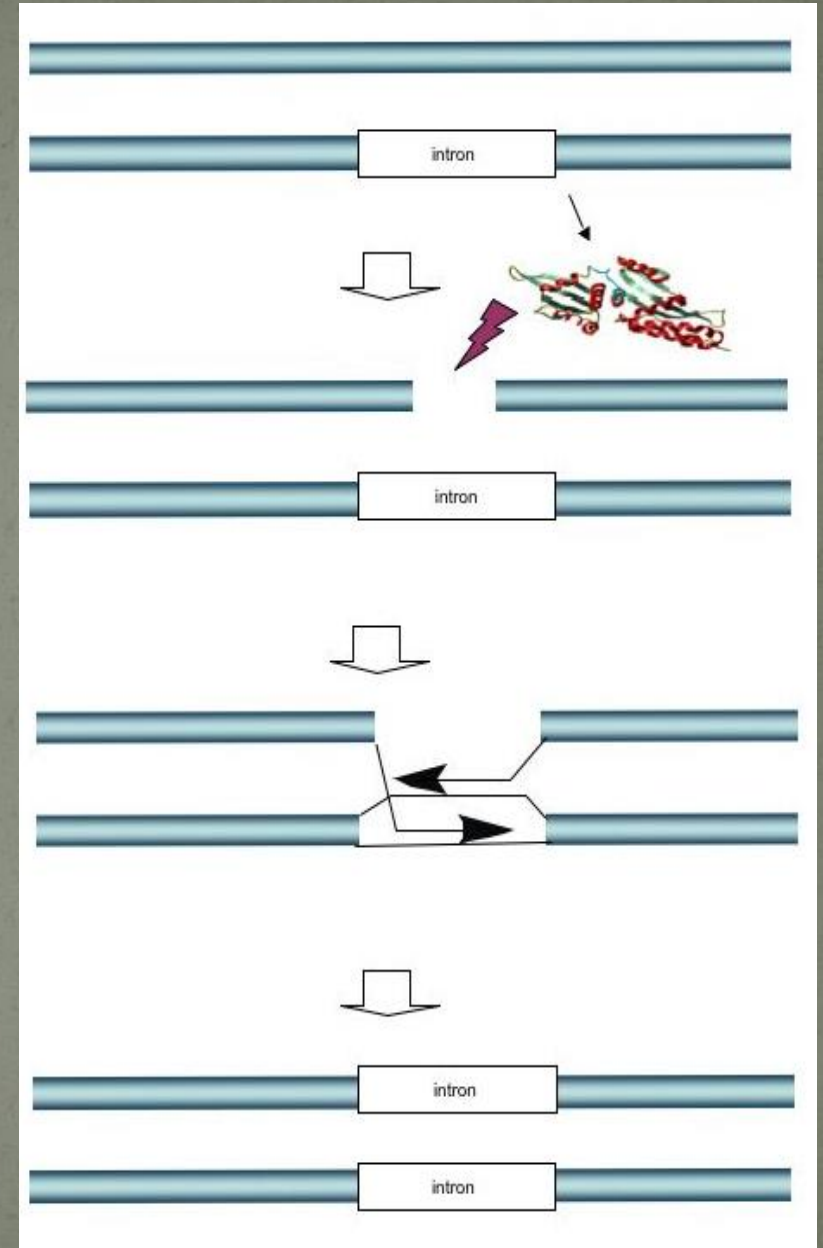
- **Intron içerenler:** Bunlar genellikle kromozom veya plazmidde bulunan kendi DNA dizilerini kesip çıkartır ve bu dizileri taşıyan ancak intron içermeyen başka bir bölgeye aktarırlar. Bu nedenle bunlara kendini yerleştiren endonükleazlar (homing endonucleases) adı da verilmiştir. Kesim bölgesinde 1 ila 10 bazlık 3' veya 5' çıkıntılı uçlar bırakırlar. Bazıları sadece zincirlerden birini keserler.
- Her iki zinciri de kesen bir örnek I-Ppo I:
CTCTC TTAA/GGTAGC
GAGAG/AATT CCATCG

Meganükleazlar

- *Saccharomyces cerevisiae* mitokondrisinden izole edilen meganükleaz, I-SceI enzimi, LAGLIDADG ailesinden.
- Bu aminoasit motifinin bağlanıp kesim yaptığı nükleotit dizisi biliniyor.
- Bu motifler kullanılarak, herhangi bir DNA dizisini tanıyıp kesen yeni enzimlerin hazırlanması olanaklı
- Meganükleazlar 12 ila 40 nükleotid uzunluğundaki DNA dizilerini tanıyabiliyor.

Gen Düzeltmenin 4 Aracı

- Yeni yapılandırılmış meganükleazlar ile (Engineered Meganuclease)
- Çinko parmak nükleazlar ile (Zinc finger nuclease)
- TALEN (Transcription Activator Like Effector Nuclease)
- CRISPRs (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) / CAS9 sistemi ile



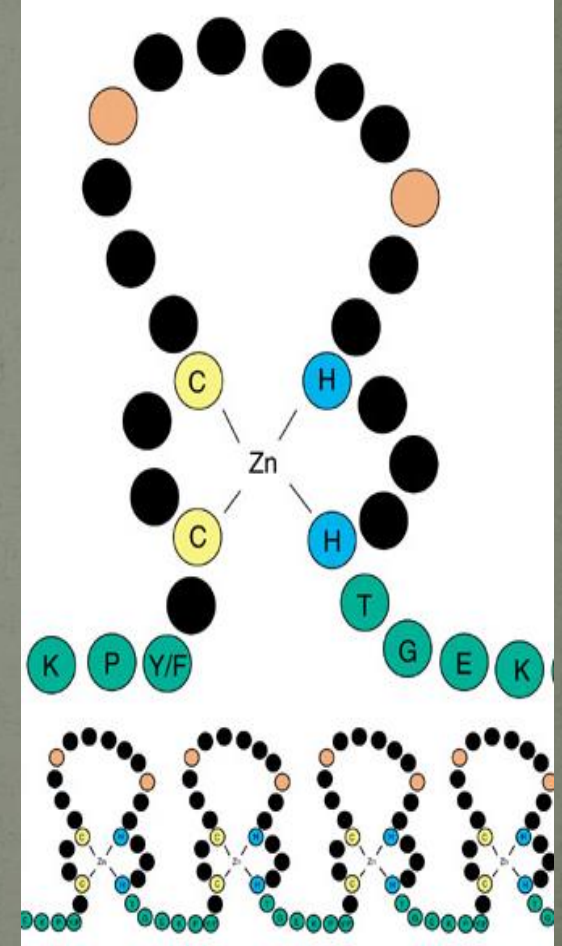
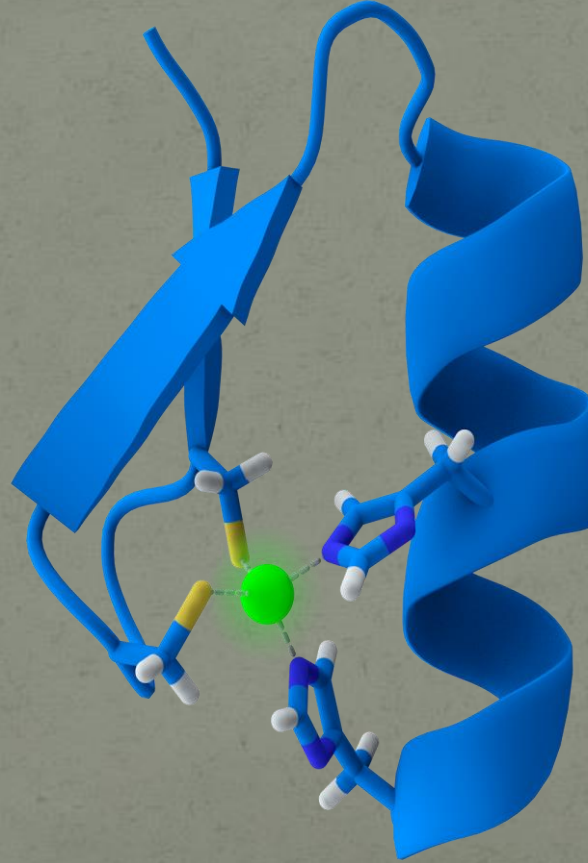
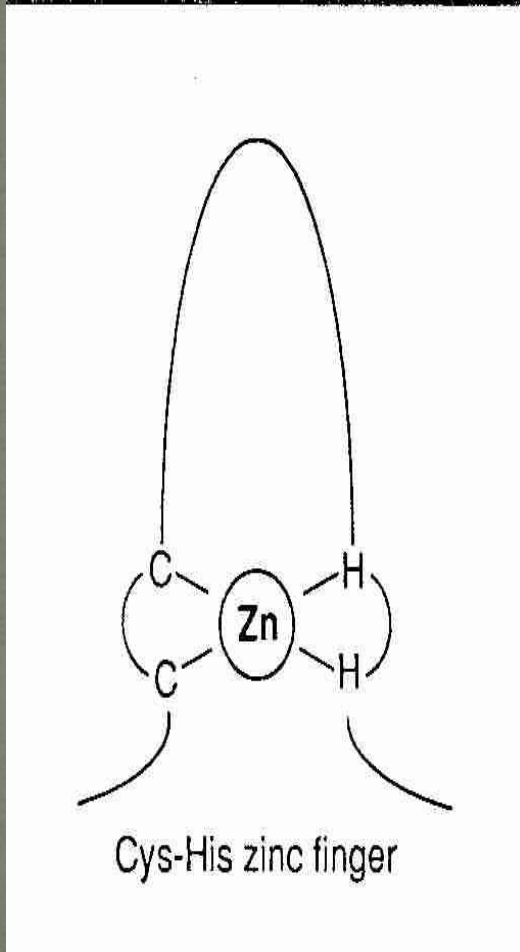
Meganükleaz ile düzeltme

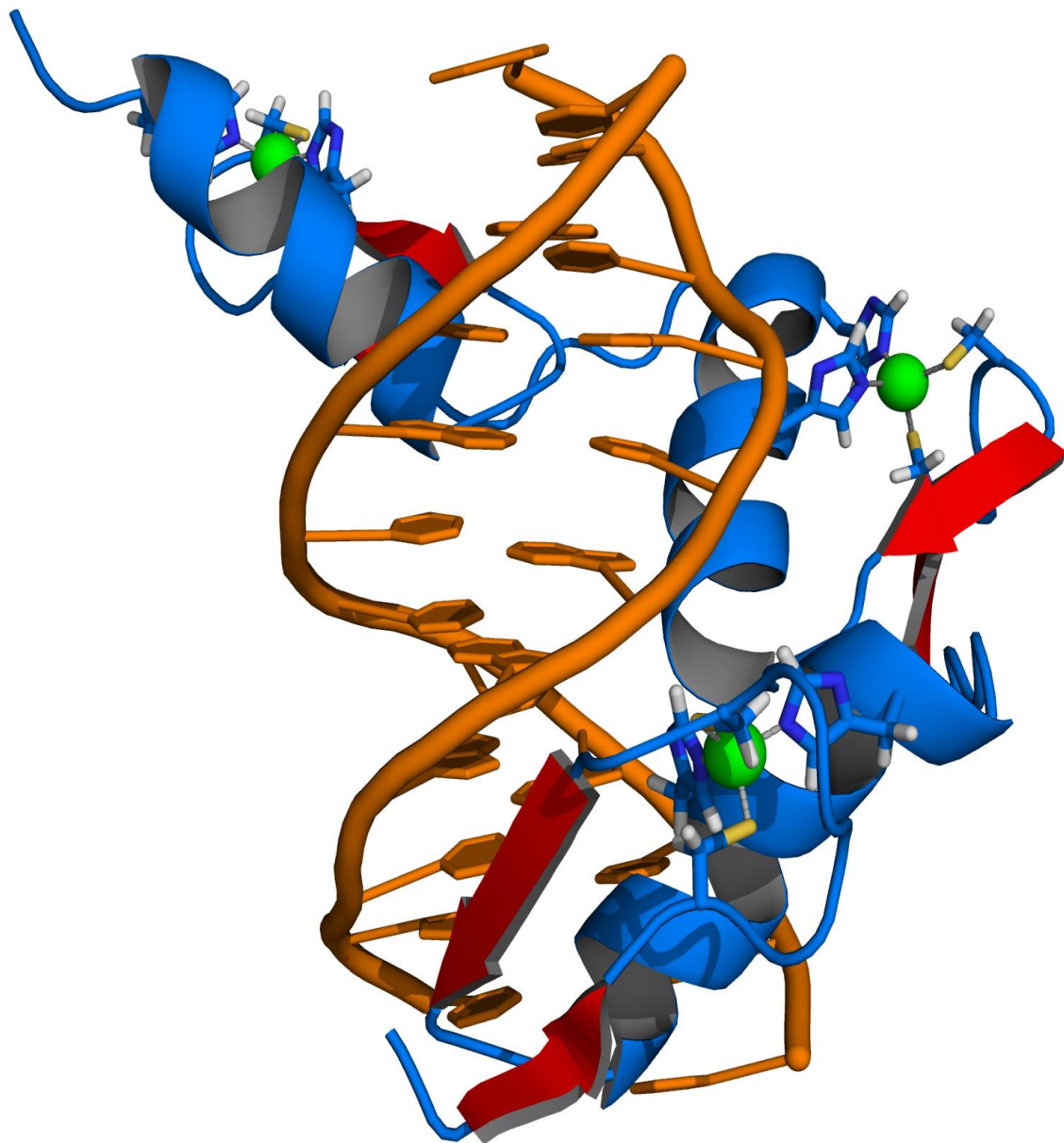
Hibrit Meganükleaz



Zinc Finger (Çinko Parmığı)

DNA'ya bağlanan transkripsiyon faktörleri gibi tüm proteinlerde bulunur.





Çinko Parmak Nükleaz

Her parmak üç nükleotit tanır. Çinko parmaklara nükleaz kesim kısmı eklenmiştir

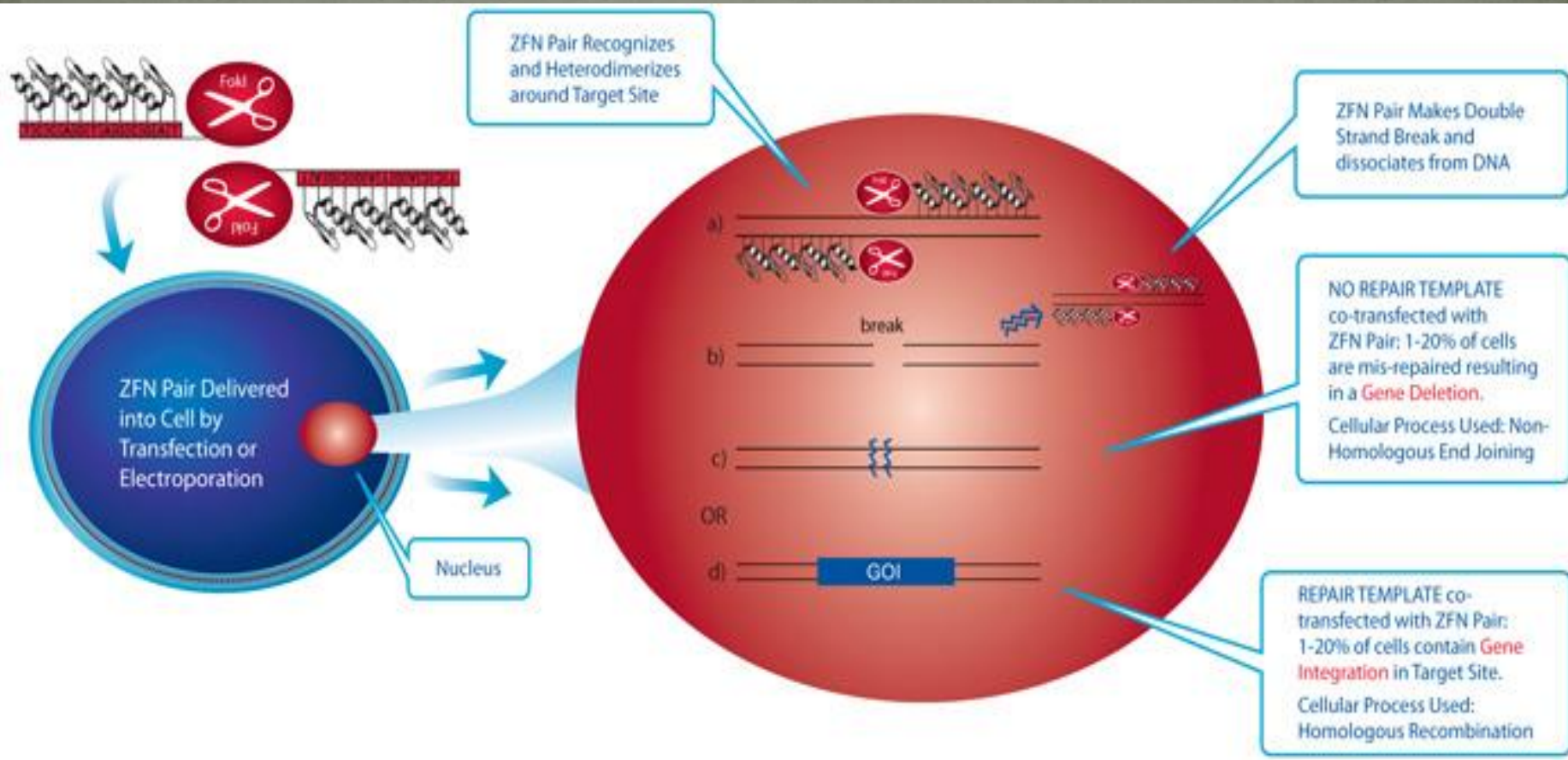
ZFN



Zinc finger domains

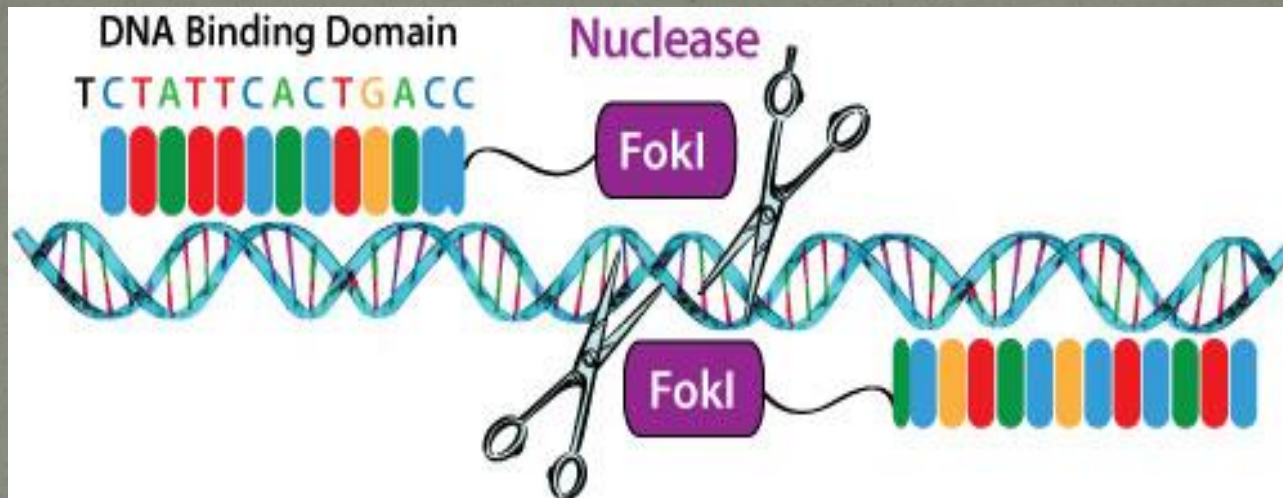


Çinko Parmak ile Düzeltme (Zinc Finger Editing)



TALEN

Transcription Activation Like EndoNuclease



TALEN



TALE subunits

active FokI catalytic subunit heterodimer

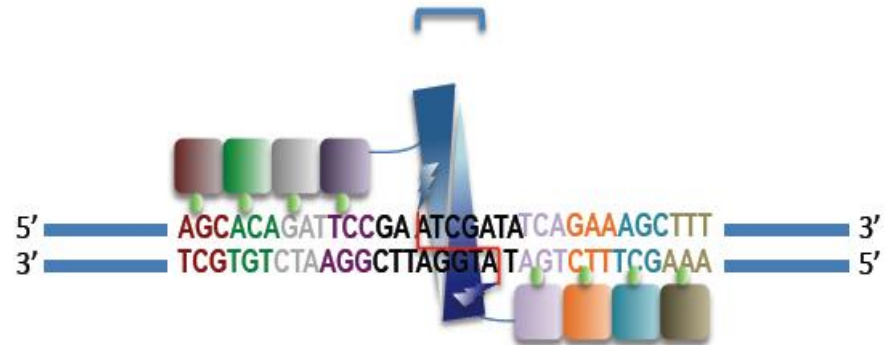
Hybrid Meganuclease



ZFN



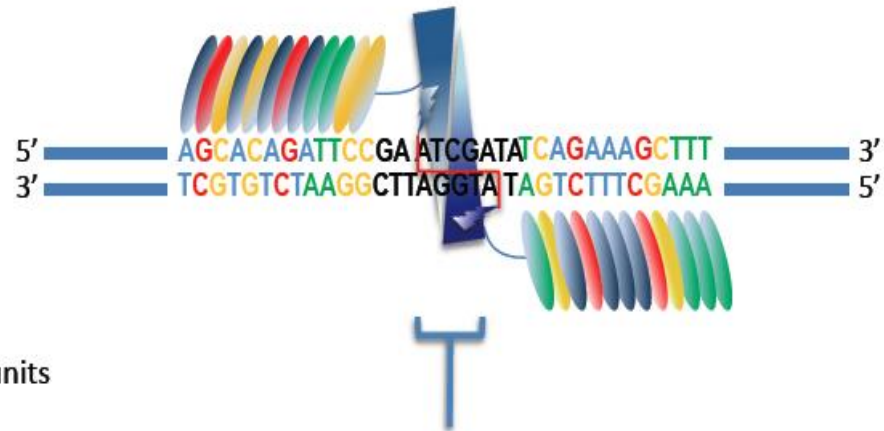
Zinc finger domains



TALEN



TALE subunits



active FokI catalytic subunit heterodimer

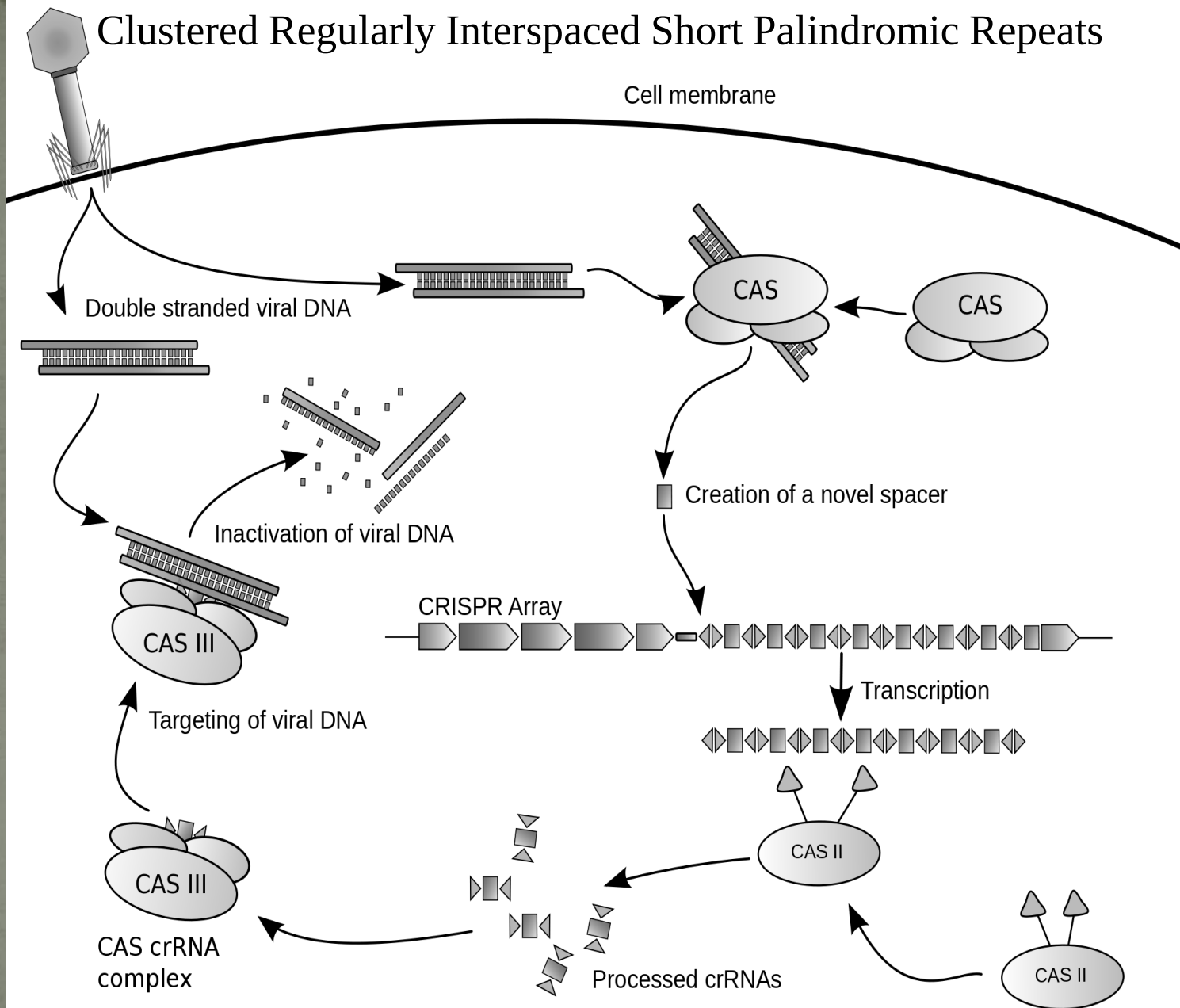
CRISPR ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats")

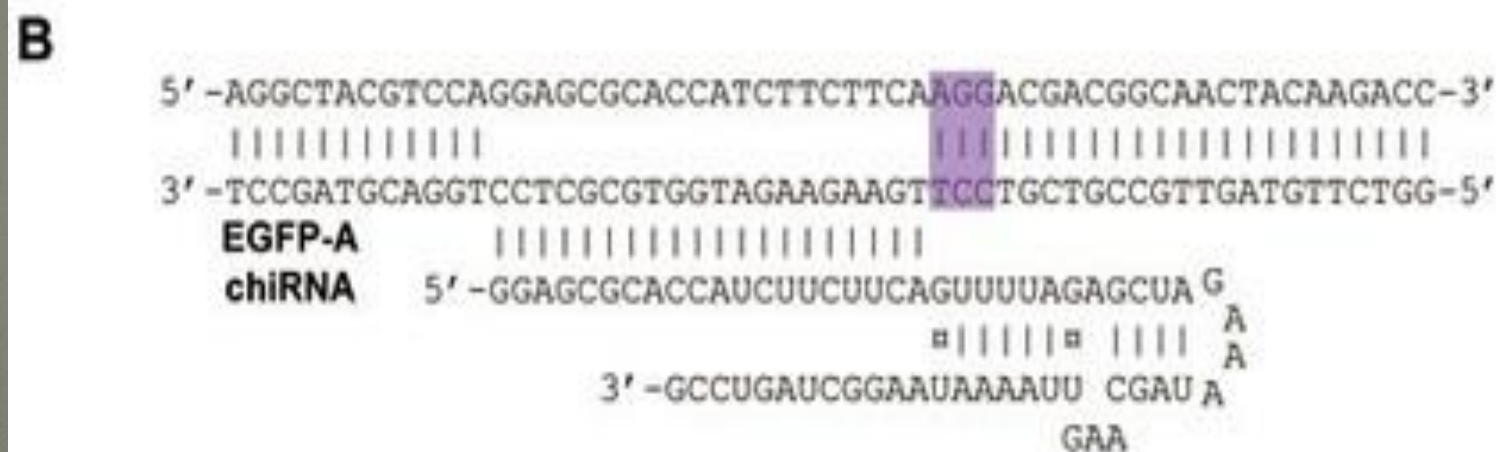
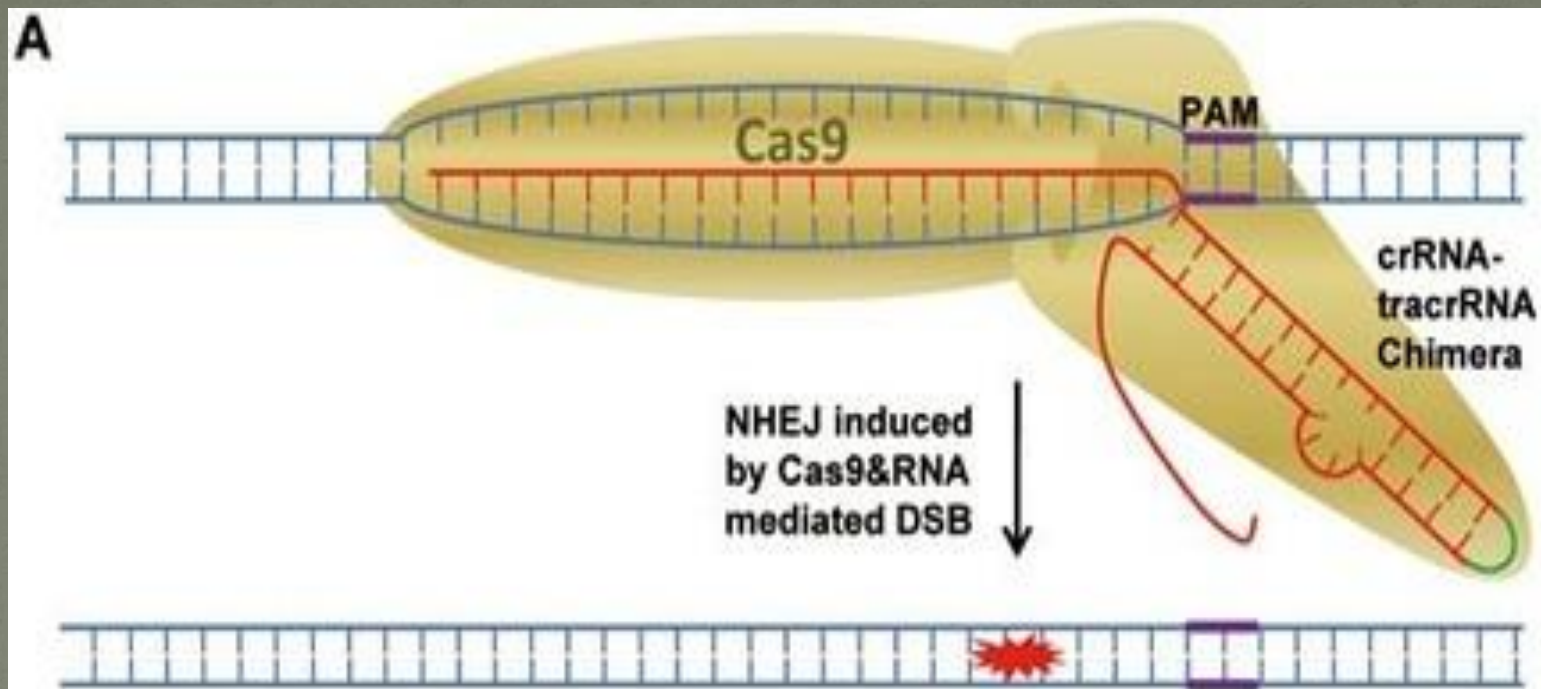
- Gruplaşmış düzenli aralıklarla tekrarlayan kısa palindromic dizilerdir. (Palindrom, “geriye doğru tekrarlayan” anlamına gelir; belli bir DNA dizisi için kullanıldığında baştaki kısım dizinin ortasından sonra geriye doğru ters yönde dizi okunacak şekilde ileriye devam eder)
- Bu diziler bakterileri bakteriyofajlardan korumak için evrimleşmiş dizilerdir ve bakteriyofaj nükleik asitlerine homoloji gösterirler.

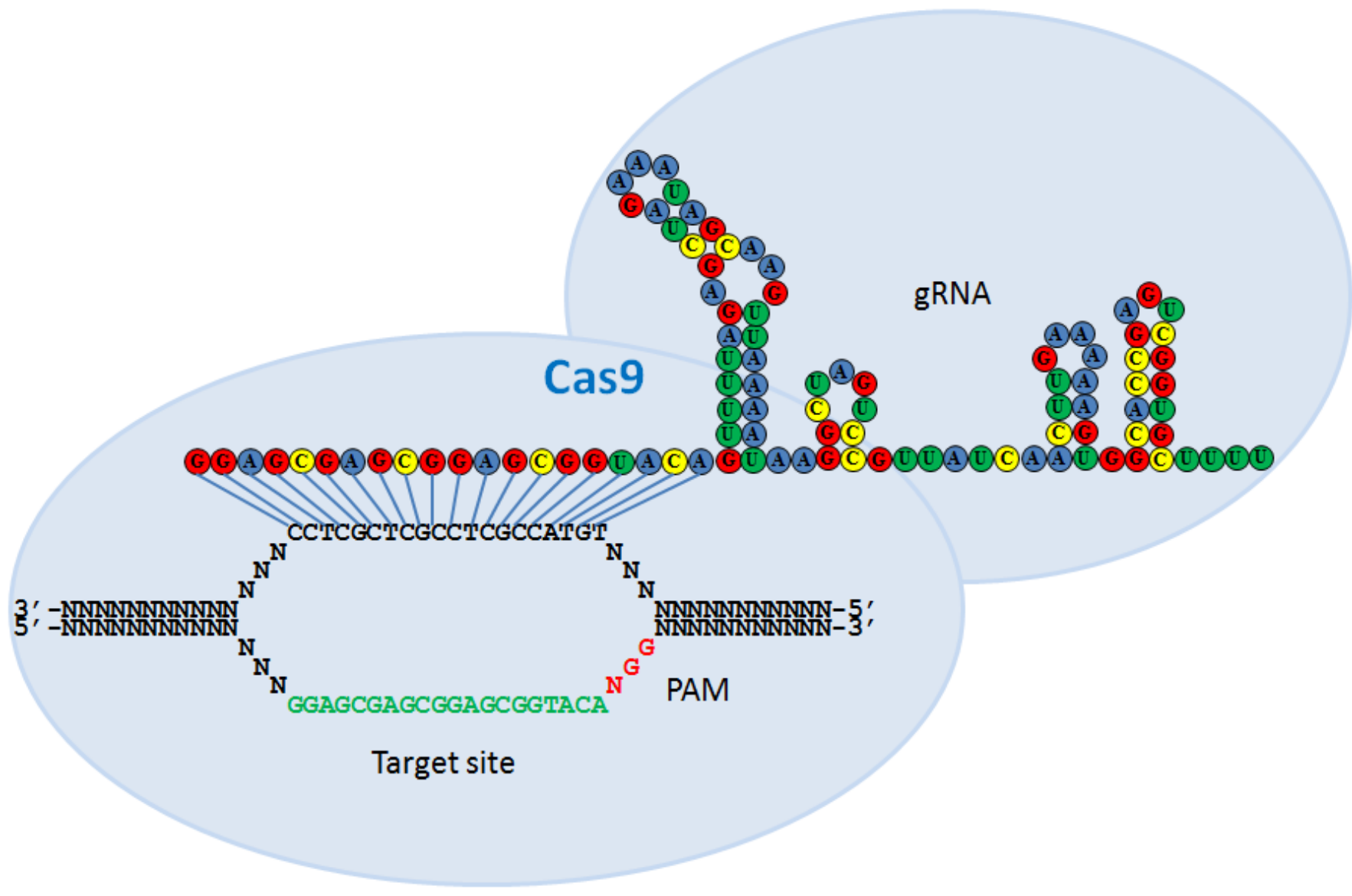
Cas (“Crispr Associated)

- Bakteriyofaj DNA’sı bakteri hücrelerinden girdiğinden CRISPR’den sentezlenen kısa RNA’lar “Cas” (“Crispr Associated) nükleaz denen bir enzime bağlanır. Bu enzim bağlanan RNA’yı rehber olarak kullanarak bunun homoloji gösterdiği DNA dizisini bir noktadan keser ve o noktadaki nükleotidi rehber RNA’daki nükleotide uygun olacak şekilde değiştirir.
- Bakterilerde virüslere karşı bir koruma sistemi olan CRISPR/Cas sisteminin 2013’de insan hücrelerinde de etkili bir şekilde gen düzeltme yapabildiği gösterilmiştir.

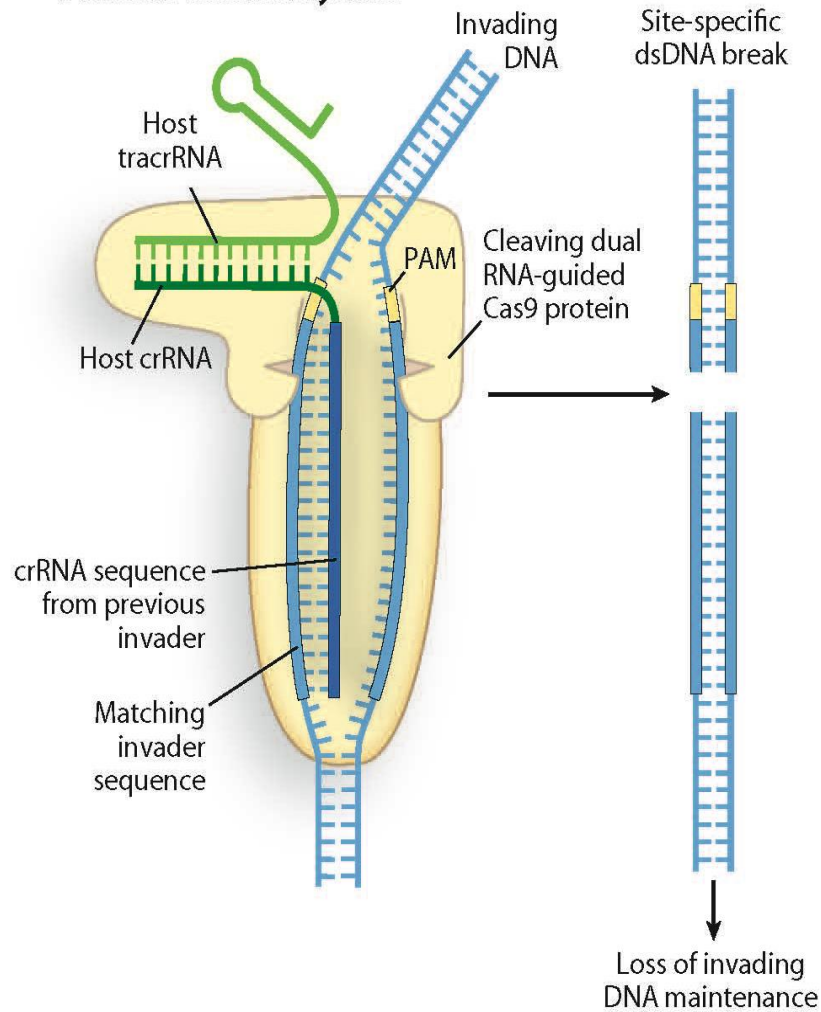
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats



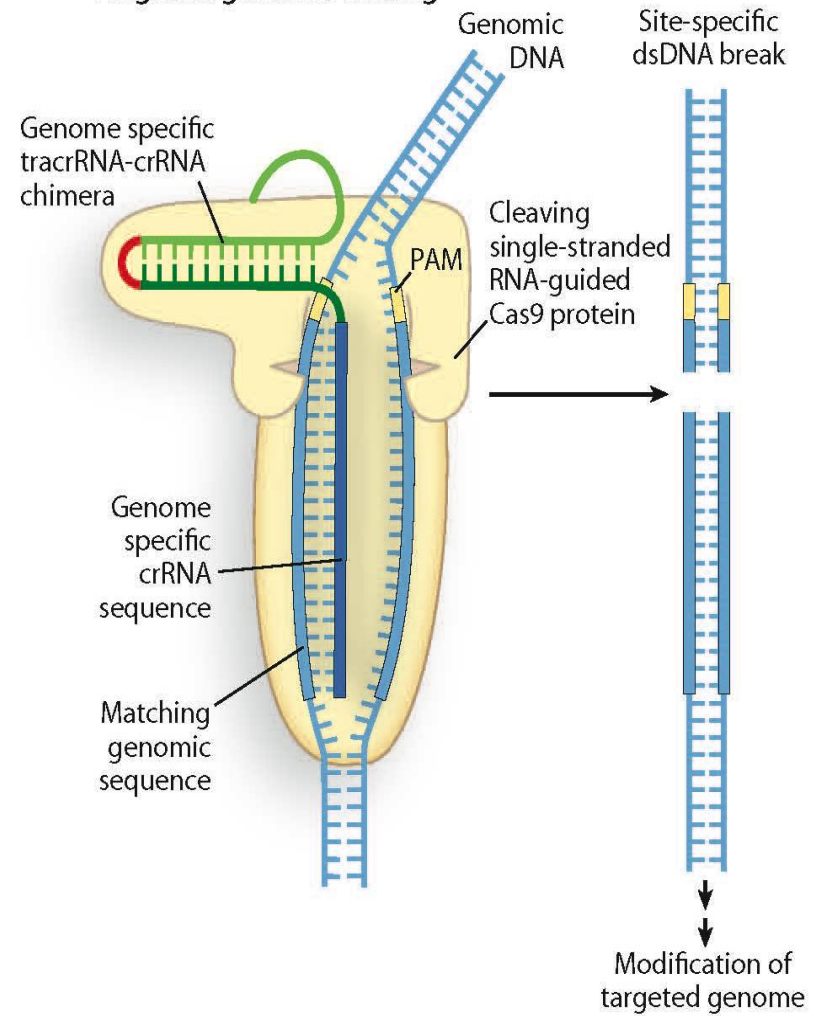


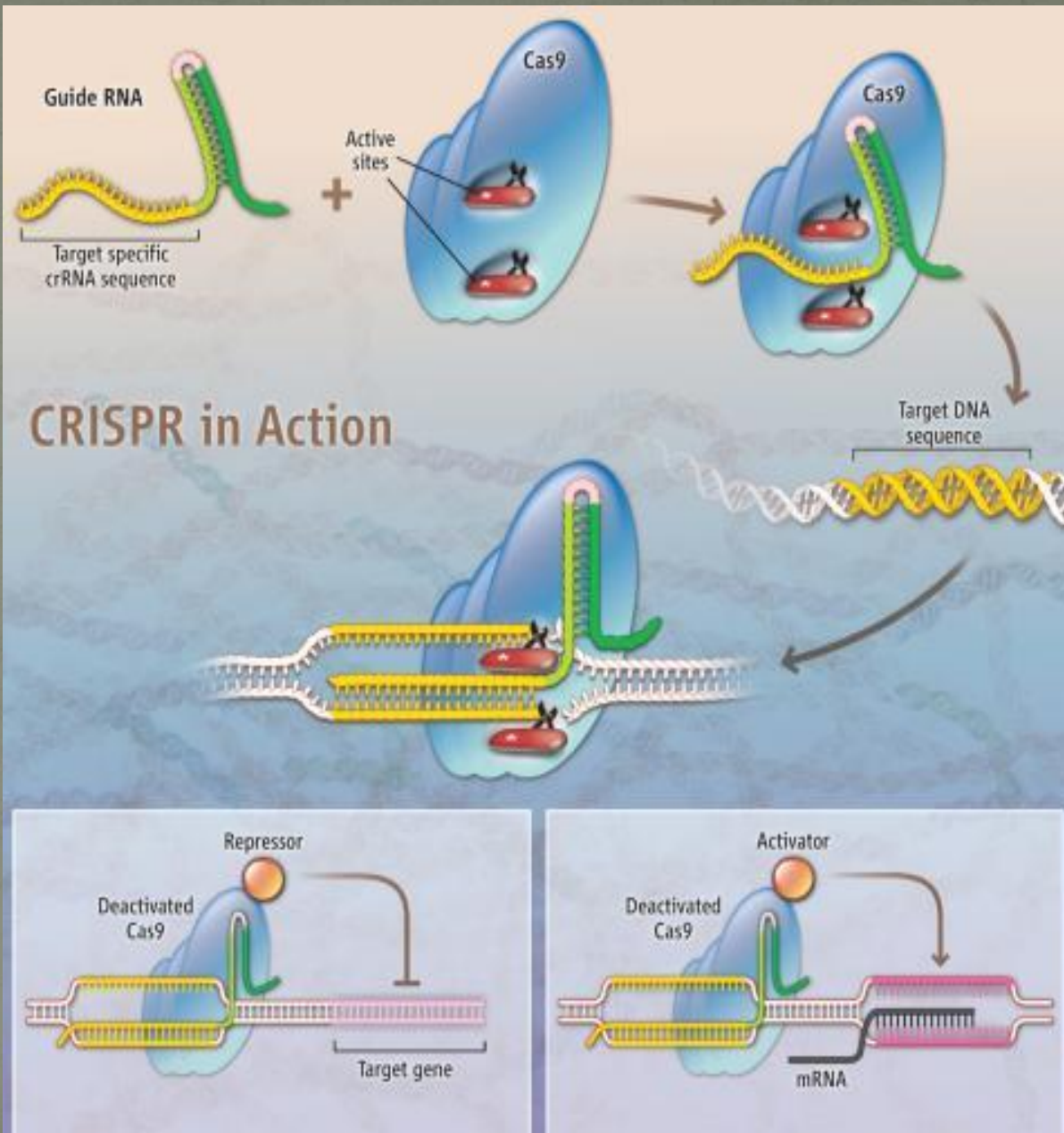


Bacterial immune system



Targeted genome editing



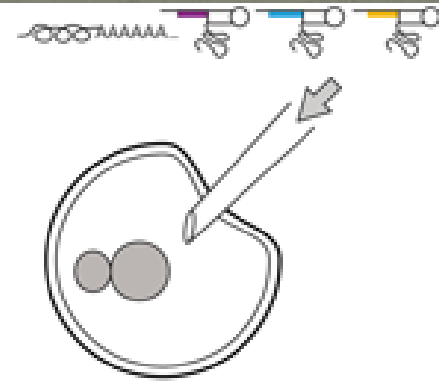


Lingling ve Mingming



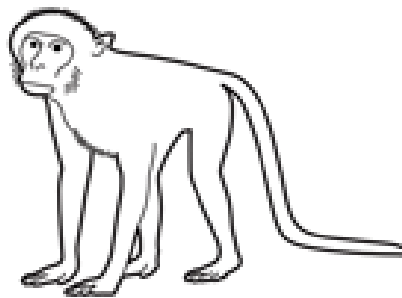
1 Sperm injection

Lab technicians inject a single sperm into an unfertilized egg.



2 Genome editing

The fertilized egg is injected with "guide" RNAs that target a specific gene, and a template for the DNA-cutting enzyme.



3 Surrogate mother

Researchers transfer healthy-looking embryos, now dividing into many cells, into female monkeys. Typically, three embryos are transferred into a surrogate.



4 Primate babies

The twins Mingming and Lingling are born with multiple genetic changes, the first live primates created in experiments using CRISPR genome editing.



Araştırma Laboratuvarımız



