

68845

İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ANGİOTENSİN II TİP1 RESEPTÖRÜ cDNA'SININ RESTRİKSİYON
ENZİMLERİ İLE HARİTALANMASI

HÜSEYİN KAHRAMAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI
MALATYA
1997

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

İş bu çalışma jürimiz tarafından Biyoloji Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS
TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan Prof. Dr. Engin GÖZKARA.....

Üye Prof. Dr. İsmet YÜKSEL.....

Üye Prof. Dr. Bülbin Sunar AKBAŞAK.....



ONAY

Yukarıda imzaların adı geçen öğretim üyelerine ait olduğunu onaylarım.

...../...../1997

Enstitü Müdürü

ÖZET

Ang II, periferik renin angiotensin sisteminin (R.A.S) aktif oktapeptidi olup; kan basıncı ayarlanmasında, vücuttaki su ve tuz metabolizmasında etkilidir. Beyinde ise otokrin olarak R.A.S. sisteminin varlığı gösterilmiş olup (32) etkisinin beyinin belirli bölgelerine yerleşmiş özel reseptörlerle gösterdiği ispatlanmıştır (33). Ang II reseptörleri, AT 1 ve AT 2 olarak sınıflandırılmıştır (9). AT 1'in Ang II'nin bütün faaliyetlerini göstermede etkili reseptör tipi olduğu kabul edilir. Yapılan bu çalışmada kullanılan materyal ise Dr.Akbaşak'ın çalışmalarından elde edilen Ang II reseptörü AT1X'in rekombinant klonlarıdır. Şöyleki, beyin Ang II reseptörünü kodlayan bölgesini taşıyan pGEM 7Zi(-) plazmid vektörüne klonlanmış olan P-15 rekombinant klonuna benzeyen Ang II tip 1 reseptör cDNA klonları ve periferik Ang II tip 1 reseptör cDNA klonu P-59'dan farklı Ang II tip 1 reseptör cDNA klonları tespit edildi. Bu klonlardan Ang II tip 1 reseptörlerinden beyin'e özgün olan yeni bir tipi AT 1 X olarak isimlendirilmiştir (Dr. Akbaşak tarafından). Özgün AT 1 X beyin reseptör sekansları içermekte olan P-15 rekombinant klonun sekans analizi ile farklılığı aynı yöntemler ile elde edilen fakat periferik Ang II AT 1 A reseptör sekansı taşıyan P-59 rekombinant klonundan farklıdır. Bu çalışmada, P-15 rekombinant klonun özelliklerini taşıyan fakat bütün Ang II tip 1 reseptör cDNA'sını kodlayan kontrol bölgelerini içeren sıçan hipotalamik cDNA kütphanesinde izole edilen 8 tam boy 3.2 kb'lık rekombinant klonu restriksiyon enzimleri ile analiz edilmiştir. İçlerinden 46-A ve 51-A klonlarının Ang II tip 1 beyine özgün AT1X sekanslarını kodlayan ve kontrol bölgelerini içeren klon olduğu saptanmıştır. Sekans analizi ile bu bulgu kontrol edilecektir.

ABSTRACT

Ang II, peripheral renin angiotensin (R.A.S) is system's octapeptid; at adjusting blood pressure and it is effected at metabolism water and salt in body. In brain as otocrine there is existance of system showed (32).It had been proved that in some parts of brain showed receptors settled (33). Ang II receptors are classified as AT 1 and AT 2. AT 1 is accepted to show effective activities receptor. The material used at this study is Dr. Akbaşak's study resuyIts and derived Ang II receptors and AT 1 x's recombinant clons. Let's say brain Ang II receptors coded pGEM77f(-) plasmid vectors cloned P-15 recombinant and looks like Ang II type 1 receptor cDNA clons and peripheric Ang II type 1 and receptor cDNA clon different from P-59 Ang II type receptor cDNA clons were cleared.From there clons Ang II type 1 receptors which belong to the brain a new type is called AT 1 x (by Dr.Akbaşak). AT 1 x brain receptor which is got from the same way but peripheric Ang II AT 1 A receptor which carries P-59 recombinant clons. At this study P-15 recombinant which carries clons specialities Ang II type 1 receptor cDNA and coded control areas rat hypothalamic cDNA isolated 8 full size 3.2 kb recombinant clon restriction enzyms and there are analised. Through them 46-A and 51-A clons ANG II type 1 belong to the brain AT 1x secans and coded and contain control area are proved. With secans analysis and finding will be controlled.

TEŐEKKÖR

Yaptığım çalışmalarım esnasında kendi özgün cDNA klonlarını kullanmam için izin veren, gerek bilgi gerekse malzeme ve kaynak sağlama hususunda hiçbir yardımını esirgemeyip beni yetiştiren danışman hocam sayın Prof. Dr. Bülbin Sunar AKBAŞAK'a en büyük teşekkürlerimi bir borç bilirim.



İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Plasmidler ve İşlevleri.....	2
2.1.1 Plasmid Vektörler.....	6
2.1.2.E.coli'nin Deneylerde Kullanım Nedeni.....	7
2.2. P.C.R. ve Amplifikasyonu.....	7
2.3. Restriksiyon Endonükleazlar.....	10
2.4. R.A.S. Sistemi ve İşlevi	14
2.5. Angiotensinler I.....	16
2.6. Angiotensin II ve III.....	17
2.7. Ang II Reseptör Alt Tipleri	20
3.MATERYAL VE METOD.....	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Malzemeler.....	25
3.2. Kullanılan Aletler.....	26
3.3. Klonlar ve Özellikleri.....	26
3.4. Deney Koşulları.....	27
3.4.1. Terrefik Broth Hazırlanışı	27
3.4.2. Terrefik Agar Hazırlanışı.....	27
3.4.3. İzolasyonda Kullanılan Solüsyonlar.....	27
3.4.4. DNA İzolasyonu	29
3.4.5. DNA Restriksiyonunun Yapılışı	31
3.4.6. Agaroz Gel Yapılışı.....	31
3.4.7. P.C.R Amplifikasyonu.....	32

4. SONUÇ.....	34
5. TARTIŞMA.....	62
KAYNAKLAR.....	63



TABLO VE ŞEKİLLERİN DİZİNİ

Tablo 2.1. Doğal Bulunan Plasmid Vektörler.....	5
Tablo.2.2.Yapışkan Uç Oluşturan ve Çalışmada Kullanılan Enzimler....	5
Tablo 2.3. Küt Uç Oluşturan ve Çalışmada Kullanılan Enzimler.....	13
Şekil 2.1. Angiotensin Oluşum Mekanizması.....	15
Tablo 2.4. Ang II'nin Biyolojik Etkileri	18
Şekil 2.2. AT 1 Reseptörünün Sinyal Mekanizması	22
Şekil 2.3. AT 2 Reseptörünün Sinyal Mekanizması.....	23
Tablo 2.5. Ang II Alt Tiplerinin Dağılımı.....	24
Tablo.4.1 A ve B cDNA KlonlarınınRestriksiyon Enzimleri İle Kesimi	
Sonucu Ortaya Çıkan Fragmentler.....	57
Tablo4.2. P-59 ve P-15'e Benzeyen Klonlarının Restriksiyon	
Enzimleri İle Kesim Paterni.....	59
Şekil 4.1. AT 1 mRNA Sekansı	60

1.GİRİŞ

Angiotensin II (Ang II); metabolizma, büyüme, santral sinir sisteminde etkiye sahip, sıvı homeostasisinde etkili olan ve çeşitli biyolojik etkilerin düzenlenmesine katkıda bulunan bir polipeptittir. Ayrıca bilinen en güçlü vazokonstriktör maddedir (2.8.9).

Klonlama, kısaca bir canlıdan alınan DNA fragmentinin bir diğer canlı DNA'sının içine-özellikle bakterilerdeki plasmidlerin içine restriksiyon enzimleri ile ekleme yapılacak bölge kesilerek- aktarımıdır. Bu yöntem sayesinde, genlerin etkisi sonucunda oluşan biyolojik aktivitelerin incelenmesi kolaylaşmıştır.

Restriksiyon enzimleri DNA'da çeşitli bölgelerde kesim yapan enzimlerdir. Çeşitli restriksiyon enzimlerinin kesme alanlarının bağıntılı pozisyonları ile DNA molekülünün kesilip incelenmesi kısaca restriksiyon analizi olarak bilinmektedir (28).

Polimeraz zincir reaksiyonu (P.C.R) ilk defa 1985 yılında tanımlanmıştır. P.C.R'da genetik materyalin çoğaltılması esas alınır. Amaç hedef DNA'nın Taq veya rTth polimeraz ile *in vitro* koşullarda çoğaltılması amacı güdülmektedir. Pikogram seviyesindeki örnek bu yöntem ile mikrogram seviyesine çıkarılabilmektedir. Bunun için ayrıca ortama uygun primer ve 4 adet dNTP'ların eklenmesi gerekmektedir (30).

Yaptığımız bu çalışmada *E.coli*'ye klonlanmış olan Ang II tip 1 reseptör cDNA'sının restriksiyon enzimleri ile haritalanması ve P.C.R ile yapılan çalışmanın doğruluğunun kontrol edilmesi amacı güdülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Plasmidler ve İşlevleri

Prokaryotik hücrelerde doğal olarak bulunan plasmidler, genellikle içlerinde bulundukları hücreler için gerekli olmamakla birlikte faydaları olan gen sekansları ile bakterilerin restriksiyon ve modifikasyon sistemlerine uyumunu kolaylaştırır.

Plasmidler bakterilerde extra kromozomal DNA replikonlarıdır.

Plasmidlerin molekül ağırlıkları genellikle $4-8 \times 10^6$ Dalton arasında değişmekte olup içerdikleri DNA, orta büyüklükte ki 100 polipeptidi yönetmeye yetecek genetik bilgiyi taşıyabilir. Kendi bağımsız replikasyonlarını yöneten genleri içerirler. Genellikle bakterinin her bölünme döngüsünde bunlarda 1 defa bölünürler ve oluşan kopyaları 2 yavru hücreye gider. Her bakteride 1-20 arasında değişen plasmid molekülü mevcuttur. Bu genetik elemanlar bulundukları ve aktarıldıkları bakteriye birtakım değişik biyolojik yapı ve fonksiyon kazandırır. Bakterilerin plasmidler tarafından kodlandığı bilinen fenotik özellikleri arasında : antibiyotiklere ve ağır metal iyonlarına gösterdikleri direnç, çeşitli enzim ve toksin oluşturma, kolonize olma, bakteriyosin, H₂S, üreaz oluşturma, hemoliziner, proteazların oluşumu, laktoz, süktroz, rafinoz, sitrat metabolizmasına etkinlik, U.V. ye direnç, enterotoksin ve , K-88 ve K-89 yüzeysel antijenleri ve toluen gibi maddelerin parçalanması ve de azot fiksasyonu gibi özellikleri sayılabilir. Plasmidler, genellikle bakteri kromozomunun %1-2'si kadar ve 15-200 gen arası değişen bir uzunluğa sahiptir (16-17-26).

Plasmidler, bakteri hücreleri içinde 2 durumda bulunabilirler;

- a) Bağımsız durumda; stoplazma içinde kromozom aktarımı yapabilen elementler olarak,
- b) Bağımlı (integre) durumda; kromozom yapısına girip kromozom ile bütünleşmiş olarak. Bağımlı durumda iken konakçı kromozomun bir parçası olarak tek bir replikon gibi davranırlar. Birlikte replike olurlar. Bağımsızdan -bağımlıya dönüşümü doğal olarak gözlenir.

Plasmidlerin bakteri kromozomu ile bütünleşmeleri halinde, episomlar meydana gelir. Plasmidler, çift iplikçikli bir DNA molekülünden yapılmış, stoplazma içinde çoğu çembersel yapıda, bir uçları ile bakteri membranının bir noktasına tutunarak bakteri kromozomundan ayrı bir şekilde replikasyon gösteren ve bulundukları bakterinin bazı özelliklerini genetik kontrol altında tutan, bakteri kromozomundan daha küçük DNA elementlerdir (17.26).

Plasmidler, bakterilerden başka bakterilere aktarılabilir ve yeni bakterinin fenotipik özelliklerini değiştirebilirler. Bulundukları bakterilerden kendiliğinden kaybolacakları gibi, plasmid replikasyonunu inhibe eden bazı maddeler (akridin boyalar vb) aracılığı ile deneysel olarak ortadan kaldırılabilirler. Plasmidler, bakteriden bakteriye genellikle konjugasyon ile aktarılırlar. Bakteri DNA'sının replikasyonuna mani olan mutasyonlar, plasmid replikasyonunda bloke ederler (16.23).

Plasmidlerin hepsinde kendi replikasyonlarını sağlayan genler ile çeşitli fenotipik karakterleri yöneten 1-2 ile çok sayıda gen bulunur. Bazı plasmidlerde bakteriden bakteriye kendi transferlerini sağlayan tra (transfer) genleri bulunur. Bunlara konjugatif plasmidler adı verilir. Bu tür genleri bulunmayanlara non-konjugatif plasmidler adı verilir. Bu sonuncular, ancak F faktörlerinin bakteride bulunması ya da diğer konjugatif plasmidler aracılığı ile harekete geçirilerek konjugasyon ile başka bakterilere aktarılabilirler.

Gram(-) bakteriler arasında plasmidler, çoğunlukla konjugasyon ile aktarılırlar. Gram(+) bakteriler arasında da konjugasyona benzer olayla da aktarılan plasmidler vardır.

Bir bakteride bulunan plasmidlerin sayısı, büyüklüğü ve nitelikleri uzun zaman aynı kalır. Yavru hücrelerde aynen aktarılırlar. Bu şekilde aynı bakteriden kaynaklanan kökenlerdeki plasmid tablosunun aynı olmasının epidemiyolojik araştırmalarda önemi vardır (17).

Hücre içindeki plasmidler, başlıca üç yöntemle saptanır;

- i) Fonksiyonları gözlenerek ve plasmid kriterlerine uygunlukları araştırılarak,
- ii) Eşit yoğunlukta dengeleme yöntemiyle santrifüjleme, ayırma, arıtma ve kimyasal inceleme yöntemiyle,
- iii) Elektromikrograflarda göstermek suretiyle,

Son yılların ürünü olan Gen Kesme ve Ekleme Yöntemleri ve Rekombinant DNA teknikleri, hemen hemen her türün arzulanan ve amaca uygun olan genlerinin plasmidlerin yapısına yerleştirilmesine, bunların bakteri hücrelerinin içine sokulması suretiyle bir çok maddenin bakterilere yaptırılmasına ya da üretimlerinin arttırılmasına olanak sağlamıştır. Örneğin; amilaz sentezinden sorumlu olan bir dizi genin bir *Bacillus subtilus* suşu içinde bir araya getirilmeleri suretiyle amilaz enzim üretiminin 200 kat arttırılması mümkün olabilmektedir.

Aynı gruptan veya aynı karakterlere sahip plasmid, bakterinin stoplazmik membranında ki yapışma yerlerinin spesifik ve aynı olması nedeniyle, aynı hücrede bulunamaz. *E.coli K12* suşunda F faktörü için bir, R-faktörü için iki ve kolisin (colicin) faktörleri içinde değişik yapışma bölgelerinin bulunduğu bildirilmiştir (26).

Ayrıca plasmidlerin bir hücrede belli bir kopyası bulunur. Bu sınırlama stoplazmik membrandaki özel bağlanma yeriyle ilişkilidir. Aynı tür genetik element bir bakteride plasmid karakterinde ise, bir diğer bakteride bu özelliğe sahip olmayabilir. Örneğin; F-laktoz , *Pr. mirabalis*'te plasmid, *E.coli*'de epizom halindedir (27).

En iyi bilinen plasmidler aşağıda verilmiştir;

1) *E.coli K12*'nin F faktörü , 2) Col plasmidleri, 3) R faktörleri, 4) Penisilinaz plasmidleri ve *Staphylococ* 'ların diğer bazı plasmidleri, 5) *Salmonella typhi*'nin Fo plasmidi, 6) *Pseudomonas*'larda ki metabolik yolların yıkıcı plasmidleri, 7) Bakterilerin bazı özelliklerini kontrol eden genleri taşıyan, durumları kesinlik kazanmamış olan bazı kromozom dışı elementler. Bu plasmidler diğerlerine oranla daha iyi incelenmiştir.

Tablo 2.1. Doğal Olarak Bulunan Bazı Plasmidler ve Sorumlu Oldukları İşlevleri

<u>İşlev</u>	<u>Örnekler</u>
Fertilite	F, R1, Col I
Bakteriyosin Üretimi	CloDF13, Col E 1
Antibiyotik Üretimi	Scp 1
Ağır Metaller(Cd, Mg) Direnç	Pl 258, R 6
Ultraviyoleye Direnç	Col 1 b, R 46
Enterotoksin Üretimi	Ent
Bitkilerde Ur Oluşumu	T 1 (26).

Tablo 2.2. Yapışkan Uç Oluşturan ve Çalışmada Kullanılan Enzimler

<u>Etken</u>	<u>Enzim</u>	<u>Tanıma ve Kesme</u>
4 baz tanıyanlar	Hinf I	5'....G/ CGC....3'
	Hpa I	5'....C/CGG....3'
5 baz tanıyanlar	Ava I	5'....G/GACC....3'
	EcoR II	5..../CC(A/T)GG....3'
6 baz tanıyanlar	BamH I	5'....G/AATCC....3'
	EcoR I	5'....G/AATTC....3'
7 baz tanıyanlar	BstE II	5'....G/GTNACC....3'
	Sau I	5'....CC/TNAGG....3'

2.1.1. Plasmid vektörler

Doğal olarak bulunan plasmidler, gen aktarımında büyüklükleri nedeniyle pek fazla kullanılmamaktadır. Bunların yerine rekombinant olarak özellikleri geliştirilmiş, gereksiz gen sekansları çıkarılmış plasmidler tercih edilmektedir.

Plasmidler, çift iplikçikli, sarmal ve sirküler yapıda olup replikasyon orjinine sahip olmaları ve seleksiyonda önemli fonksiyonu olan bazı spesifik antibiotiklere rezistanslık sağlayan genleride kodlamaları ile ayrıca belli uzunlukta yabancı genleri kabul etmelerini sağlayan restriksiyon enzimlerini tanıyan bölgelere sahip olmaları nedeni ile plazmidler vektör olarak kullanılmaları mümkün olmaktadır.

Plasmid DNA'larının bazı bölgeleri (Tet, Amp vb.) vardır ki bunlar hücre içinde replikasyonları için pek önemli değildirler. Ayrıca bu bölgelere ek olarak restriksiyon enzimlerinin kesici bölgelerini de içerirler. Rekombinant plasmid elde etmede, bu sekansların içine aktarılması istenen yabancı DNA fragmenti birleştirilir ve klonlama başarılı ise bazen bu antibiotiklere inaktif hale gelir. Diğer genler aktivitesini korur. böylece istenen özellikleri taşıyan rekombinant klon diğerlerinden ayrılmış olur.

Klonlamada bir tek kesim yerine sahip enzimler ve plasmidler tercih edilmektedir. Yabancı gen, bu markerlerden birinin içine transfer edilerek, genin inaktivasyonu sağlanır. Klonlamada, antibiotik rezistanslık genleri taşıyan plasmidlere sahip *E. coli* suşları tercih edilir. Seçilen suş, CaCl_2 'li ortamda üretilerek dış membran geçirgenliği artırılır ve vektör DNA'sının içine girmesi kolaylaştırılır.

Gen klonlanmasındaki genel prensipler ise;

- a) Gen taşıyan DNA'nın veya RNA'nın saf olarak elde edilmesi,
- b) Genin yerinin belirlenmesi,
- c) Genin çıkarılması,
- d) Taşıyıcı(vektör) DNA'nın elde edilmesi,
- e) Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi,

- f) Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması,
- g) Seleksiyon,
- h) Gen ürününün kontrol edilmesi (23).

2.1.2. E.coli'nin Genetik Deneylerde Sık Kullanımının Nedenleri

Çok sayıda suşa sahip olması,
Çok kısa zamanda bölünerek çoğalabilmesi,
Tüm suşların genetik haritalarının tam olarak çıkarılmış olması,
Temel besiyerlerinde üremesi,
+ 37°C'de üremesi,
İzolasyonunun çok kolay olması,
Kloramfenikol ile kromozom DNA'sının replikasyonu önlenip, transfer edilmiş plasmid DNA'sının replikasyonu artırılabilir,
Zararsız olmaları,
Muhafazalarının kolay olması
Genetik stabilitesinin güvenilir olması.

2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (P.C.R.) ve Amplifikasyonu

P.C.R. ilk defa, Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlandı. İlk P.C.R. uygulamalarında enzim olarak *Escherichia coli*'den elde edilen enzim kullanılıyordu. Bu enzim, yüksek ısıya dayanıksız olduğu için her siklusta ortama yeniden konuluyordu. Yapılan çalışmalar neticesi, *Thermus aquaticus*'ta yüksek sıcaklığa dayanıklı DNA polimeraz (Taq polimeraz) elde edildi ve çalışmalara bu enzimle devam edildi (30).

PCR'de, genetik materyalin çoğaltılması esas olarak alınmaktadır. PCR'nın temelini, hedef DNA'nın spesifik deoksitrikleotid primerleri ve ısıya dayanıklı DNA polimeraz (Taq ve ya rTth polimeraz) enzimi yardımı ile *in vitro* koşullarda çoğaltılması

teşkil etmektedir. Örneklerde tek bir uygun DNA sekansı bulunsa bile, bu yöntemle bunu 1 saat 15 dk içinde pikogram (pg) seviyesinden mikrogram (μ g) seviyelerine çıkarmak mümkündür.

Test ortamına tampon ile birlikte, çift iplikçikli hedef DNA'lar nanomolar (nmol) miktarda konur. Bundan sonra ortama, yeterli miktarda 4 tür deoksinükleotid trifosfat (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) ve spesifik oligonükleotid DNA primerleri (iki tür 25-30 bazlık) ile ısıya dayanıklı Taq polimeraz (veya rTth polimeraz) 0.25 μ l /ünite ilave edilir. Reaksiyona bundan sonra 3 aşamada devam edilir;

- i) Hedef DNA'ların denatürasyonu (95°C de), DNA çift iplikçığının birbirinden ayrılması;
- ii) Primer DNA'ların bağlanması (50°C de), sentezin başlaması;
- iii) Elengation (70-72°C de), yeni DNA iplikçığının sentezinin tamamlanması.

Tüp içinde bulunan karışım önce 95°C'ye kadar ısıtılarak çift iplikçikli DNA'nın denatürasyonu sağlanır ve tek iplikçikli hale getirilir. Bu işlemin sonunda tüp hemen 50°C'ye kadar ısıtılarak primerlerin, tek iplikçiklerin 3'-uçlarındaki nükleotidlere bağlanması sağlanır. DNA'nın sentezi (polimerizasyon) için tüp 70-72°C'deki su banyosuna konur. Bu ısıda termostabil Taq polimeraz enzimi, primerleri başlama noktasına bağlanıp tek iplikçik DNA'yı da kalıp olarak kullanarak sentezi yapar ve yeni çift iplikçikli DNA'lar meydana gelir.

Böylece her aşaması yaklaşık 1dk 30 sn kadar süren bu işlemin sonunda pg'dan μ g miktarındaki cDNA'ya ulaşmak mümkündür. Bu üç aşamalı birinci dönem bittikten sonra tekrar denatürasyon, bağlanma ve polimerizasyon işlemlerine aynı sırada devam ederek uygulama sürdürülür. Eğer 25 dönem devam edilirse 2 dk'lık aralıkla yaklaşık 1saat 15 dk içinde μ g seviyelerinde DNA elde edilebilir. Bundan sonra, hedef DNA'nın teşhisinde Southern Blot Hibridizasyonu veya Restriksiyon Analizi yöntemlerinden biri kullanılarak yapılır.

Sentezlenecek hedef DNA'nın uzunluğu ve sayısı ile kaç kez tekrarlanacağı, ortama konan primer ve dNTP miktarı ile yakından ilişkidir. Polimeraz enziminin bir defa ve

yeterli miktarda konması 25-30 reaksiyon için uygun bulunmaktadır. Çünkü, enzim ısıdan etkilenmemektedir.

Bu reaksiyonda spesifik oligonükleatid DNA primerlerinin (iki tür 15-30 bazlık ve tek iplik) özel bir önemi vardır. Bunlar, hedef DNA'nın sekanslarına karşı hazırlanmış baz sıralarındaki başka kontaminant DNA ile karşılıklı reaksiyon vermezler veya birleşmezler. Bu nedenle hedef DNA baz sıralarının çok iyi bilinmesi ve primerlerinde bunda bulunan ve başka yabancı DNA'da bulunmayan sekanslara karşı hazırlanmış olmaları gereklidir. Primerler, tek iplikçikli hedef DNA'nın, 3'-uçlarındaki sekanslar bağlanarak, Taq polimeraz için, 5'→3' yönünde bir basamak oluşturur ve sentez çok kısa sürede tamamlanır. Hedef DNA'nın 3'-ucundaki bazlar ile primer DNA' daki bazlar birbirlerinin komplementerleridir. Bu nedenle çok kolayca bağlanabilirler.

Primer DNA'ları basamak olarak kullanılacak olan termostabil polimeraz enzimi, genellikle termofil mikroorganizmalardan olan *Thermus aquaticus* veya *Thermus thermophilus*'tan elde edilmektedir (Taq ve rTth). Bu enzimler, 95-100°C sıcaklığa dayanmakta ve enzim aktivitelerinde 70-72°C'ler arasında optimal derecelerde çalışmaktadır. Test ortamına yeterli miktarda ve bir kez ilave edildiklerinde 25-30 kez aynı program döngüsü içinde aktivite gösterebilmektedirler.

Denemeler, (+) ve (-) kontroller ile birlikte hazırlanmalıdır.

PCR'ın birçok avantajı bulunmaktadır. Bunlar arasında patolojik materyallerden hastalık ajanlarının tespitinin çok kısa bir süre içinde yapılabilmesi ve şüpheli olguların teşhisinin kesinleştirilmesi yapılabilmekte, genetik bozuklukların saptanmasına, bireysel genetik identifikasyonlar, fingerprintler, adli tıp, babalık tayini, soy kütüklerinin hazırlanması, DNA analizlerinin yapılması sayılabilir. Buna karşın önemli olan bir dezavantaj ise ortama giren tek bir kontaminant DNA'da (eğer primer ile ortak bazlara sahipse) aynı derecede amplifiye olacak ve sonuçları etkileyecektir (23).

Amplifikasyon ürünü ile oluşacak kontaminasyonu; elimine etmek için urasil N-glycosylase (UNG) enziminin kullanılması, kısa dalgalı U.V. ışınları ile muamele ve

amplifiye edilen DNA'nın fotokimyasal modifikasyonu gibi işlemleri uygulamak mümkündür. UNG, DNA'daki deoksiurasilleri bularak onları molekülden uzaklaştıran bir enzimdir.

Amlifikasyon tüpüne, deoksitimidin trifosfat (dTTP) yerine deoksiurasil trifosfat (dUTP) konularak amplifikasyon gerçekleştirilmekte, böylece sentezlenen DNA'nın yapısına deoksiurasiller girmektedir. Bu DNA'lar, UNG ile muamele edildiğinde, enzim tarafından deoksiurasiller uzaklaştırılmaktadır. Deoksiurasilleri giderilen DNA molekülleri, alkali ve ısıнын etkisi ile parçalanmakta ve sonuç olarak, amplifikasyon tüpüne karışmış olsalar bile amplifiye olmamaktadırlar.

Ayrıca bir diğer kontaminasyonu engelleme şekli; kısa dalga boylu U.V.ışınlarıyla yapılmaktadır. U.V. ışınları ile muamele edilince kontamine DNA molekülündeki komsu timinler arasında dimerler oluşmakta ve DNA'nın yapısı bozulmaktadır. Böylece DNA'nın amlifikasyonu mümkün olmamaktadır (30).

2.3. Restriksiyon Endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar (R.E), çift iplikçikli DNA'da spesifik bölgelerden kesim yaparak DNA'dan gen taşıyan bir DNA segmentinin çıkarılmasında etkin ve spesifik fonksiyonları vardır (23).

R.E. enzimleri tarafından tanınan diziler, çoğu kez palindromlardır ve simetri oluştururlar. Restriksiyon enzim çalışmalarında en ilginç olaylardan biri, elektronmikroskobu gözlemleriyle belirlenen ve bir çok restriksiyon enzimi tarafından üretilen fragmentlerin kendiliğinden ligasyonla dairesel hale gelmesidir. Bu sirküler yapılar ısıtılarak yeniden düz iplikçik haline getirilebilirler. Eğer sirkülasyondan sonra bunlar 3'-OH ve 5'-P gruplarını birleştiren *E.coli* DNA ligazı ile muamele edilirse daireselleşme sürekli duruma girer (29).

Bakterilerin büyük bir bölümü bir veya birkaç türde R.E.enzimi sentezlerler. Bunların esas görevleri, dışarıdan bakteriye giren ve bazı özel gen veya markerler taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonlara mani olmak ve türlerin genetik yönden stabilitesini korumaktır (23).

Kısaca, R.E.'lar, palindromik dizilimli kırılmalar yapar ve bu kırılmalarda genellikle biri diğerinin tam karşısı değildir. Enzimler, komplementer uçlu DNA fragmentleri meydana getirir. Bir çok restriksiyon enzimi, DNA'nın kaynağını dikkate almadan bir baz dizisini tanır. Dolayısıyla bir organizmanın DNA molekülünden bir restriksiyon enzimi ile elde edilen fragmentler, başka bir organizmanın DNA'sı üzerine de aynı enzimin aktivitesi ile elde edilen fragmentler ile aynı yapıştırıcı uçlara sahiptir (29).

Bugün farklı spesifiteye sahip 400'ün üzerinde R.E. bilinmektedir (25).

Restriksiyon enzimleri rekombinant DNA teknolojisinin ilerlemesindeki temellerin birini oluşturmuştur. Birçok R.E., tek bir diziyi tanıdığı için özel bir enzimin bir organizmanın DNA'sında yaptığı kesme sayısı sınırlıdır. Yaklaşık olarak 3100 baz çifti içeren tipik bir bakteriyel DNA molekülü birkaç yüzle birkaç bin arasında değişen fragmente kesilirken, memelilerin nüklear DNA molekülü 1 milyondan fazla fragmente kesilir. Viral ya da plasmid DNA'sı gibi küçük DNA molekülleri özel öneme sahiptir. Çünkü bunlar, enzimler için sadece 1-10 kesilme bölgesine sahiptir veya hiç kesilme olmayabilir.

Bir R.E. tarafından kesilerek meydana getirilen DNA'nın bir parçası diğer bir R.E. ile daha küçük parçalara bölünebilir. Dizilim özgüllüğünden dolayı belirli R.E.leri belirli DNA molekülleri için bir orjinal fragmentler seti meydana getirir. Bir diğer enzim, aynı DNA molekülünden farklı bir fragment seti meydana getirir (29).

R.E.in 3 tipi bilinmektedir. Tip I ve tip III enzimleri, herbiri endonükleaz ve tek protein molekülü üzerine metilaz aktivitesine sahiptir, ve de DNA'da spesifik baz sıralarını tanır. Ancak kesme işlemini başka baz sıraları arasından yapar. Bundan dolayı, bu grup enzimler, gen manüplasyonunda kullanılmaz (Eco B, Eco K). Örneğin tip I R.E. tanınan sekanstan en azından 1000 bp'lik alandan rasgele DNA'yı bölerken

tip III, enzimleri tanınan sekanstan 24 ile 26 bp'lik uzunluğu keser. 2500 tür civarında tip II R.E. ile hemen hemen 200 farklı sekans spesifitesi bakterilerden karakterize edilebilmiştir. İkinci grupta bulunanlar ise tanıma ve kesme yönünden daha spesifiktirler yani sadece kesme bölgelerindeki 4 lü veya 6 lı baz dizilerini tanıdıktan sonra kesebilirler. Bu baz spesifitesi onların gen haritalamasında ve rekombinant DNA teknolojisinde amaca yönelik olarak seçilip kullanılmasını sağlar.

R.E. ile DNA molekülünün muamelesi sonucu tanımlanan fragment ürünleri, gel elektroforez vasıtasıyla büyüklüklerine göre ayrılabilir. Ayrıca elektroforez veya alkali CsCl'de gradiyent ultrasantrifüj vasıtasıyla da ayrılabilir.

Çeşitli R.E.in bölme alanlarının bağıntılı pozisyonları ile DNA molekülünün diyagramda gösterilmesi restriksiyon haritalaması olarak bilinir (23.28).

Tip II enzimleri DNA'daki aktivitelerine göre 4 gruba ayrılır;

i) Yapışkan uç oluşturanlar : Bu tür R.E. lar, çift iplikçikli DNA'da genellikle 4-7 bazlık uzaklıktan olmak üzere karşılıklı keserek iki yapışkan uç oluştururlar. Klonlamada bu tarz kesimden oldukça fazla yararlanılır (tablo2.2).

Bölünen DNA segmentinin iki ucunda birbiriyle veya aynı uçlara sahip yabancı gen DNA segmentinin uçlarıyla birleşmeye hazır iki yapışkan uç meydana gelir.

ii) Küt uç oluşturanlar : Bazı enzimlerde çift iplikçikli DNA'da kesimler yaparak küt uçlar meydana getirir (tablo 2.3).

iii) İzoizomerler : Gerek yapışkan uç gerek küt uç oluşturan R.E'dan bazıları DNA üzerinde aynı yeri tanıyabilir ve oradan kesim yapabilir.

BamH I	5'....G/GATCC....3'	(5' ucundan yapışkan uçlar)
Tha I	5'....GG/CC....3'	(5' ucundan küt uçlar)

iv) Değişik Tanıma Yapanlar : Azda olsa bazı R.E'ların birden fazla tanıma ve kesme bölgeleri bulunabilmektedir.

Tablo 2.3. Küt Uç Oluşturan ve Çalışmada Kullanılan Enzimler

<u>Etken</u>	<u>Enzim</u>	<u>Tanıma ve Kesme</u>
4 baz tanıyanlar	Alu I	5'....AG/CT....3'
	Hae III	5'....GG/CC....3'
6 baz tanıyanlar	Bal I	5'....TGG/CCA....3'
	Hpa I	5'....GTT/AAC....3'
	Acc I	5'....GT/ AGAC...3'
		5'....GT/ATAC....3'
		5'....GT/CGAC....3'
		5'....GT/CTAC.....3'
	Aat II	5'.....GACGT/C...3'
	Hind III	5'.....A/AGCTT....3'
	Bam H I	5'.....G/GATCC.....3'

Hind III 5'....GTC/AAC....3'
5'....GTC/GAC....3'

5'....GTT/AAC....3'
5'....GTT/GAC....3'

Bu tür enzimler, gen manüplasyonlarında birçok kesim bölgesine sahip olması nedeniyle genomik DNA analizinde kullanılmaktadır. R.E.'ların DNA üzerindeki bu aktiviteleri için bazı optimal kosullara (ısı, tampon vs) gereksinimi vardır. Aksi halde enzimlerin aktivitesi azalır. Mezofilik bakterilerden elde edilen R.E.ları genellikle 37-40 °C arasında aktif olmasına karşın, termofiliklerde optimal ısı 70°C ye kadar çıkabilir.

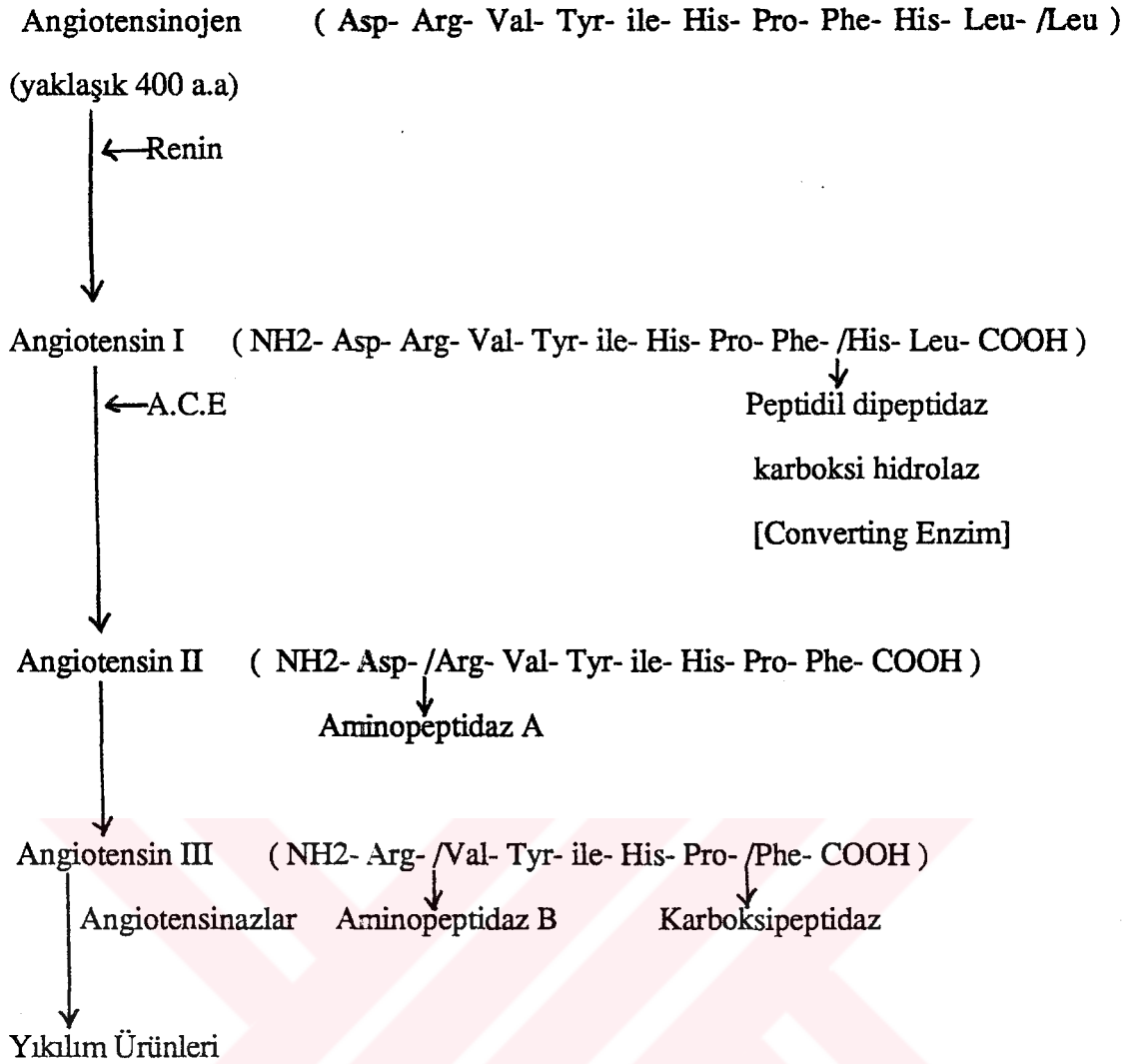
Hücrelerin sentezlediği, R.E.ları dışarıdan giren DNA sekanslarına etkili olmasına karşın kendi genomu için zararsızdır. Modifikasyon enzimleri olarak tanımlanan proteinler, kendi sentezledikleri R.E.larını tanıma ve kesme bölgelerini modifiye ederek (metilasyon) kesilmeye mani olurlar. *E.coli*'nin çoğunda DNA'yı metilize eden (dam metilaz, dem metilaz gibi) enzimler vardır (23).

2.4. Renin Angiotensin Sistemi ve İşlevi

Renin Angiotensin Sistemi (R.A.S), su ve elektrolitlerin tutulmasını sağlarken artık maddelerin atılmasında hızlandırır. Kuskusuz bu arteryel hipertansiyonda son derece önemli, hayat kurtarıcı bir mekanizmadır. Bu mekanizma, çöl kosullarında olduğu gibi insan ve hayvanların dehidrasyonuna uğramasında çok önemlidir. Çünkü dehidrasyon tek başına böbrekte renin salgısını arttırıp artık maddelerin çıkarılmasıyla su ve tuz'un tutulmasını sağlar (24).

R.A.S.'nin düzenleyici etkisi, hücre memranındaki spesifik reseptörler tarafından yapılır (6).

R.A.S.'nin tam aktif duruma gelmesi için, 20 dk. süre gerekir. Angiotensin oluşumu, periferik arterleri daraltarak ve böbreklerde su ve tuz tutulmasını sağlayarak



Şekil 2.1. Angiotensin oluşumu mekanizması. Küçük oklar kesilme bölgelerine işaret etmektedir (32).

şokun ilerlemesini engeller ve Ang II, afferent arteriollerini daraltarak glomerullarda basıncı yükseltir (24).

Lokal birçok dokuda, Renin Angiotensin Sistemi (R.A.S), angiotensin salınımını autokrin mekanizması ile kontrol eder. Sıçanlardaki erken in vitro çalışmalar göstermektedir ki, ılımlı hiperglemik etkilerde Ang II'nin karaciğer üzerinden artan glikoneolizis ve azalan glikoneoliziste etkilidir. Son 10 yılda diyabet tablosunun oluşumunda R.A.S'ın rolü, özellikle kalp ve böbrekte iyi bir şekilde tanımlanabilmiştir. Renovasküler hipertansiyonda R.A.S'ın aktivasyonu gösterilmiştir (11).

2.5. Angiotensin I

Ang I'in çeşitli yapılar üzerindeki etkinliği Ang II ve Ang III'e göre zayıftır. Bu madde esas olarak Ang II'e dönüştükten sonra etkinlik kazanır (32).

Ang I oluşuktan birkaç saniye sonra Ang II'ye dönüşür. Bu dönüşüm hemen tümüyle akciğerlerdeki küçük damar çeperlerinde bulunan A.C.E. nin katalizör etkisi ile olur. Ang II, kanda birkaç dakika kadar kaldıktan sonra angiotensin dönüştürücü enzimnin angiotensinaz adı altında toplanan çok sayıda kan ve dokuda mevcut enzimler tarafından inaktive edilir (24).

Ang I, bir dekaeptittir ve angiotensinojen üstünden renin'in aksiyonu yolu ile sentezlenir ve görünüşte biyolojik aktiviteye sahip değildir. A.C.E ile Ang II oktoeptidine çevrilmektedir. Bu değişim periferel vaskülatürde bazı lokal formasyon ile akciğerlerin vasküler endotelial yüzeyine kadar yerleşmiştir. Ang II, aminopeptidaz yardımı ile N-terminal aspartik asit molekülünün ayrılmasıyla Ang III tetrapeptidine çevrilmektedir. İnsanda oldukça düşük plazma konsantrasyonunda Ang III belli olmaktadır. Fakat sıçanlar da, Ang II ile yaklaşık olarak eşit miktardadır. Plazma

angiotensinlerinde görülen aynı amino asit sekansıdır.

Beyinde, Ang I'i; Ang II'ye çeviren enzim inhibe edildiğinde kan basıncı düşmektedir (10.18.1).

Ang I'in Ang II'ye dönüşmesi daha çok kanın akciğerlerden geçişi sırasında meydana gelir (14.19.10).

2.6. Angiotensin II ve III

Ang II; sekresyon, metabolizma, büyüme, renal fonksiyonlar, vasküler düz kasların kontraksiyonunda, ontogenez ve santral sinir sisteminde işlevleri olan, sıvı homeostasisini kapsayarak çeşitli biyolojik tepkilerin düzenlenmesine katkıda bulunmaktadır. Ayrıca Ang II; elektrolit metabolizmasının düzenlenmesinde, kardiovasküler hipertrofide ve prostoglandin sekresyonunda aracılık eden, kan basıncı ve tuz metabolizmasını düzenleyen, ACTH sekresyonu, prolaktin sekresyonu, katokalamın tahliyesi, aldosteron sekresyonu ve vasokonstriksiyon arttıran nöral sistemler üzerinede etkili bir hormondur .

Angiotensin II, bilinen en güçlü vazokonstriktör maddedir. Bazı koşullarda, 1/10.000.000 gr. gibi çok küçük miktar, insanda arter basıncını 10-20 mg Hg kadar yükseltebilir. Arteriyel basınç çok fazla düştüğünde dolaşımda büyük oranda Ang II görülür (2.5.8.9.12.13.15.22).

Ang II, aspartil proteinaz, renin ve angiotensin dönüştürücü enzim ile angiotensinden biçimlendirilmektedir (32.34).

Adrenal cortex'te, adenilat siklaz aktivitesinin inhibisyonu yolu ile aldosteron sekresyonunu, Ang II; ACTH'i azaltarak sağlar.

Mesenjial hücrelerde. adenilat siklaz fosforilasyonunu buradan inaktive eder. Ayrıca Ang II, Ca-calmodilinin stimüle edilmesi aynı zamanda onun kontraktıl aksiyonunu kullanarak belirir ve c-AMP generasyonu inhibe edilir .

Tablo 2.4. Ang II'nin dokuda meydana getirdiđi biyolojik ve patofizyolojik etkileri

	<u>Biyolojik Etkiler</u>	<u>Patofizyolojik Etki</u>
Ang II'nin Renal Etkileri	- Proximal tübülde Na rezorbsiyonu	- Plazma volümü artışı
	- Efferent arteriolde vasoconstriksiyon	- GFR'nin korunması
Ang II'nin Kardiak Etkisi	- Ang II'nin direkt hücresel etkileri	- Pozitif inotropik etki
	- Adrenerjik durumun kolaylaştırılması	- Pozitif inotropik etki
	- Coroner arterde vasokonstriksiyon	- Subendokardiyal ischaemia
	- Protoonkogen ekspresyonu	- Kardiak hipertrofi ve yeniden düzenlenmesi
Ang II'nin Vasküler Etkileri	- Arteriol direncini arttırma ve uyumunu azaltma	- Stresten sonra artma
	- Venaconstriksiyonu	- Stresten önce artma
	- Renal ve splanchnic vazokonstriksiyon	- Bölgesel kan akışının düzenlenmesi
	- Vasküler hipertrofi	- Stresten sonra artma (11).

Sadece lokal olarak kan beyin setinde sentezlenen angiotensinler, angiotensin tiplerine özgün reseptörlerini etkilemektedir. Ang II, arabeyinde hipotalamusta bulunan subfornikal organı etkiler. Buradan kök alan sinirler, susama ile ilgili merkezleri uyarırlar (18.32).

Hipotalamus içinde, para venriküler nükleus, SON, ventromedial nükleus ve supra chiasmatik nükleusta, solitary tract'ın nükleusu, vagus'un dorsal motor nükleusu ve inferior olivary nükleusta yüksek Ang II bağlanması gösterildi (32).

Ang II'nin arteriollerin düz kaslarında ve adrenal kortexteki özel reseptörlere etkisi ile arterial kan basıncının normal tutulmasında önemli rolü vardır. Ayrıca, vücutta Na^+ azlığı mevcut ise Ang II, böbrek kan akımının regülasyonunda görevlidir. Kardiovasküler hipertrofide; elektrolit dengesinde, sıvı volümü ve kan basıncının düzenlenmesinde Ang II önemli role sahiptir (4).

Ang II, adrenali direkt uyarmakla birlikte, kortizol üretiminde tesirsizdir. İnsanlarda Ang II'nin plazma düzeyi, Ang III'ünden 4 misli fazladır. Ang II ve Ang III'ler süratle, angiotensinazlar tarafından inaktive edilirler.

Ang II, spesifik glomeruloza hücre reseptörlerine bağlanır. Ang II, kortizol biosentezini etkilemez (22).

Vücut dolaşımındaki sıvılarda, aşırı miktarda Ang II bulunması, hayvanlarda su alınımları 2-3 kat artırır (24).

Ang II, böbrek üstü bezine etki ederek zona glomerulosa'dan aldosteron hormonu salgılanmasını sağlar (19).

Ang II'nin pekçok etkileri G- protein bağlı Ca^{+2} aktif hale getirecek G-tipi reseptörler vasıtasıyla gösterdiği düşünülmektedir (7.21).

Ang II'nin farklı düzenleyici etkileri, hücre membranındaki reseptörleri aracılık etmektedir. G proteinleri fosfolipaz C, adenilat siklaz ve intraselüler Ca^{+2} değişimi ve intraselüler sinyallerin çoğu bu etkileşimde yardımcı olmaktadır (13).

Vücutun su içeriği; böbreklerin etkinliği ve susama mekanizmasının kontrolündeki önemli yeri olan ADH ve renin- angiotensin- aldosteron sistemi yardımı ile sabit tutulmaya çalışılır (20).

2.7. Ang II Reseptörü ve Alt Tipleri

Ang II reseptörünün 2 alt tipi tanımlanmıştır. AT 1 ve AT 2. AT 1'inde alt tipleri vardır. Bunlar, AT1 A ve AT1 B diye isimlendirildiler (8.15).

PD 123177 için yüksek affiniteye sahip AT 2 reseptörleri ve DUP 753 için yüksek affiniteye sahip AT 1 reseptörlerinin Ang II alt tiplerinin tanımlanmasında kullanılmıştır.

Son zamanlarda AT 1 reseptörü için cDNA'sı sıçan ve sığırlardan izole edilen klonlar ile DNA bazları sayesinde tanımlanmıştır. AT1 reseptörleri, G- proteini bağlayıcı reseptörlerinin tipik özelliğine sahip ve fosfo inozitid spesifik fosfolipaz-C bağlanması ile gelen sinyalleri hücre içine transfer eder ve Ang II'ye özgü etkilerin ortaya çıkmasını sağlar (8).

Non peptit olmayan Ang II antagonistlerinin meydana çıkması AT 1 ve AT 2 reseptör tipleri arasındaki ayrımı kolaylaştırmıştır. Son zamanlarda, 4 farklı Ang II tip 1 reseptöründe alt tipleri AT 1 A, AT 1 B, AT 1 C ve AT 3; reseptörleri tanımlanmıştır. (13).

AT1C; mRNA reseptör alt tipi, böbrek ve beyinde kültürü yapılan vasküler düz kaslarda bolca ve mesanjiyal hücrelerde de bulunmuştur.

AT 1 A ve AT 1 B; her ikisinde, karaciğer, böbrek, aort, uterus, adrenal bez, ovaryum, akciğer, dalak ve kalpte; AT 3; adrenal korteks ve balgamda tanımlanmıştır. Dört Ang II tip 1 reseptör alttipide DNA baz homolojisi ve fizyolojik etkilerinin iletişimi yönünden birbirinden farklıdır (13).

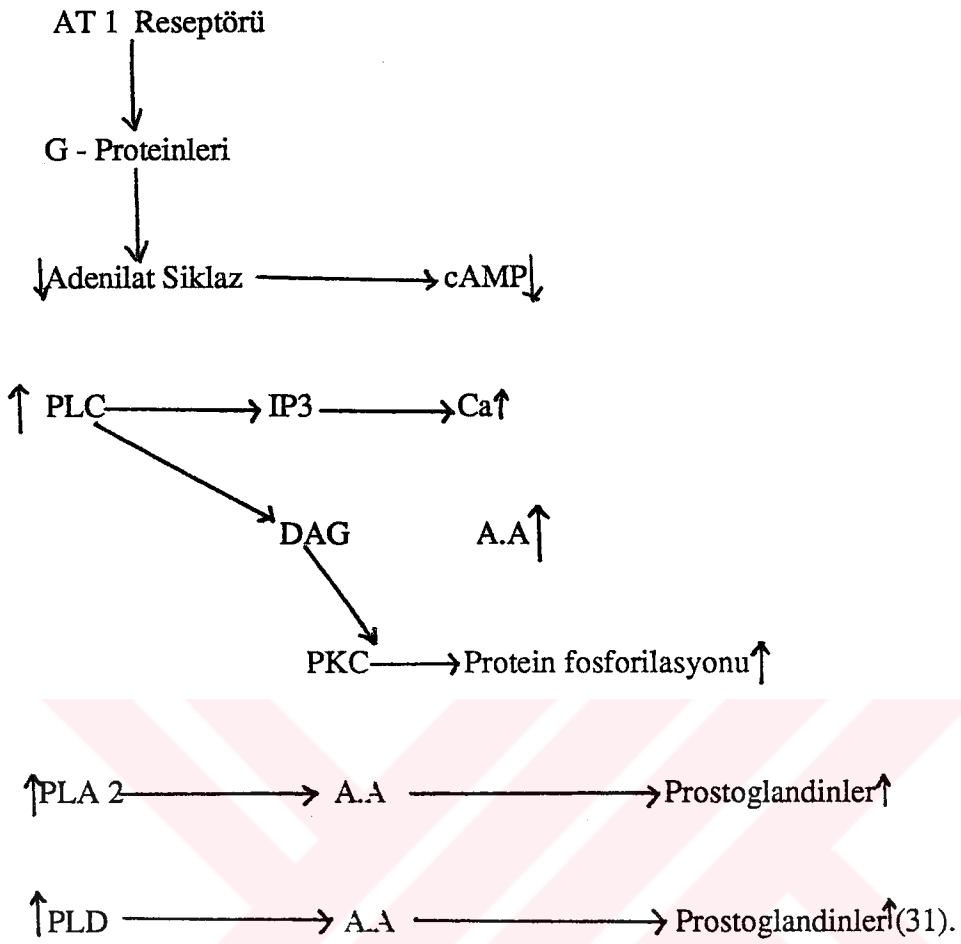
Otoradyografik çalışmalar da, spesifik reseptör analogları kullanılarak, hormon sekresyonu ve homeostasis sirkülasyonu ile uygun beyin Ang II reseptör alt tiplerinin varlığı gösterilmiştir. AT 1 ve AT 2 reseptörleri; lateral septum, locus coeruleus, superior colliculum ve talamik nükleuslar gibi alanlarda sınırlıdır. AT 1'in beyin dokusunda 3 alt tipi vardır. Bunlar, AT1 A, AT1 B ve AT 1 X olup, kodlayıcı bölgede yüksek derecede homoloji gösterirler. Fakat 3' ve 5' transle edilemeyen bölgelerde ise sadece % 50 homolojiye sahip oldukları ratlarda belirtilmiştir. (14).

AT 1 A olarak kodlanan Ang II reseptörü, sıçan vasküler AT 1 reseptörü ile aynıdır. AT 1 B geni kodlanan yeni Ang II reseptörü ile % 94 homoloji gösterir ve ayrıca sığır adrenal AT1 reseptörü ile % 91 homoloji gösterir (3.12.6).

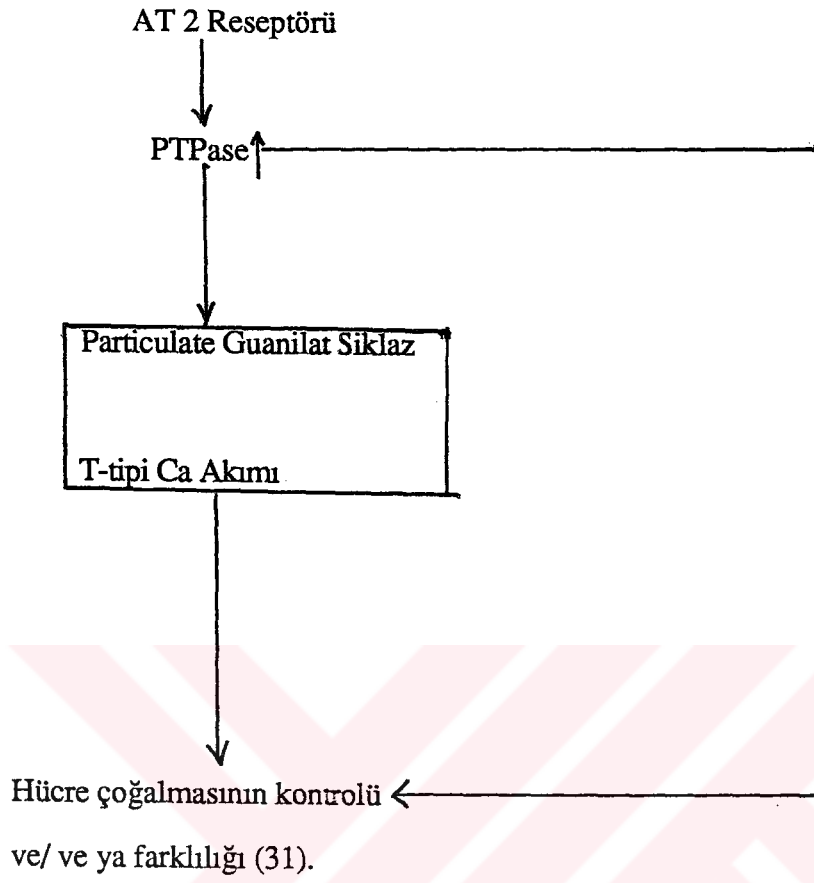
Radyoaktif izatopla işaretli Ang II ile yapılan radyoligand bağlama deneyleri ile Ang II reseptörlerinin dağılımı incelenmiştir. Beyinde hipotalamus ve diğer bazı bölgelerde reseptör konsantrasyonu periferik yapılardakinden farklı bulunmuştur (32).

Ang II; AT 1 ve AT 2 hücre yüzey reseptörlerinin 2 farklı alt tipi ile birbirini etkiler. Son zamanlarda cDNA kodlu bölgelerden 359 amino asitten oluşan trans membran topolojisi (7-transmembran bölgesi) çıkarılmıştır. Restriksiyon haritalaması, hibridizasyon, P.C.R. amplifikasyonu ve sekans analizi, her iki gen kapsamının 1077 bp, proteinin 359 amino asitten meydana geldiğini göstermiştir.

Şekil 2.2. AT 1 Reseptörünün Sinyal Mekanizması



Şekil 2.3. AT 2 Reseptörünün Sinyal Mekanizması



Tablo 2.5. Ang II Alt Tiplerinin Dağılımı

A) Periferal Yerleşim		AT1	AT2
Adrenal cortex	Fare, tavsan, köpek, insan, sığır serumu	+	+
Adrenal medulla	Fare, insan	+	-
Böbrek kapsülü	Tavsan	+	+
Akciger	Fare	+	-
Karaciger	Rat, tavsan	+	-
Pankreas	Köpek	-	+
Uterus	Tavsan, rat, maymun İnsan	+	+
Ovaryum	Rat	-	+
Plasenta	İnsan	+	-
Vas deferens	Tavsan	+	-
Epididimis	Rat	+	-
B) Santral Yerleşim			
Beyin	Rat, tavsan, maymun	+	+
Cerebellum	Rat, sığır	±	+
Anterior pituitary	Murine tümör	+	-

(31).

Burada AT 1 ve AT 2 Ang II reseptör tiplerinin bulunduğu hayvan türleri ve lokal organlardaki yerleşim bölgeleri gösterilmektedir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tris- Sigma 100 gr. %99 T-1378 Lot 94H5703 (77-86-1)

Brom Fenol Blue- Fluka 10 gr. 18040 (37725-61-3)

Glukoz- Sigma 100 gr. Lot 75H0729 G-8270 (50-99-7)

EDTA- 7R00551 1Kg.

K₂HPO₄- Merck Art 510 721A224600 1Kg.

Bakteriyolojik Agar- OXOID Agar No:1 L-11 Exp 6/99 500 gr.

Yeast Extract- OXOID L-21 Exp 6/98 500gr.

Trypton- OXOID L-42 500gr.

KAc- Sigma Lot 25H0797 P-1147 (127-08-23)

Hind III (R.E)- Sigma Lot 45H0829 R- 1137 (81295-22-9) 1 Vial

Aat II (R.E)- Sigma Lot 45H0724 R- 3507 (84067- 31-2) 500 Unit

Acc I (R.E)- Sigma Lot 34H0070 R-6142 (87683-74-7) 5 Vial 50 Unit/ Vial

EcoR II (R.E)- Sigma Lot 45H0676 R-1636 (81295-15-0) 1 Vial

Lambda DNA Eco 911 (BstE II) Marker, 15 SMO 111 Lot JK 15 MBI

Fermentas

BsuR I (Hae III) (R.E)- ERO151 MBI Fermentas

Alu I (R.E)- EROO11 MBI Fermentas

BamH I (R.E)- EROO51 MBI Fermentas

Ampisina 1 gr. Apisilin M.N.I.San 6/97

3.2. Kullanılan Aletler

0,85X Elektroforez Hood EP H-5

DS-34 Poloroid Marka Kamera

Elektroforez Güç Kaynağı Supply ECPS 3000 / 150 PHARMACIA

Santrifüj Runne Heidelberg Mod.RS 80-1

Clifton Su Banyosu

DS-334 5inch 1000 Elektroforez Filtre Seti

FiX 20mHV Transluminatör

Soğutmalı Masaüstü Mikrosantrifüj Ole Dich Instrumentmarkers APS

157.MP.RF

667 Siyah Beyaz Poloroid Film 3 1/4 X 4 1/4 Pack Film

3.3. Kullanılan Klonlar ve Özellikleri

P 15 N / P 39 / P 20 / 50 A / 46 A / 46 B / 46 E / 57 J / 51 A / 50 C / 50 D / P 59

AT 1 cDNA'sının bulunduğu bakteriyel klonlardır. Kullanılan bakteri. *E.coli* JM810 suşudur.

P 15 , P 39 , p 59 ve P 20' de kullanılan plasmid ; pGEM - 7Zf (-)' dir.

50 A , 46 A , 46 B , 46 E , 57 J , 51 A , 50 C , 50 D' de kullanılan plasmid ; pCDV I Okayama- Berg ekspresyon vektörü.

Kullanılan bu 12 adet klon A.B.D. de Dr. AKBASAK tarafından klonlanmış ve bu şekli ile kuru buz içinde getirilmiştir.

3.4. Deney Koşulları

3.4.1. Terrefik broth hazırlanışı

DNA replikasyonu için bakterilerin üretilmesinde sıvı terrefik broth (Tartof ve Hobs 1987) kullanılmıştır. Bunun hazırlanışı ise :

900 ml. d.H₂O içine

12 gr. Bacto tripton

24 gr. Bacto yeast extract

4 ml. Gliserol kondu. Çözöldükten sonra otoklavda steril edilmiştir. Ayrıca 100 ml. içine 0.17 M KH₂PO₄ ve 0.72 M K₂HPO₄ konuldu. Steril edildikten sonra her iki çözöltü karıştırıldı. Bu karışım işlemleri 65°C'de yapıldı.

3.4.2. Terrefik agar hazırlanışı

Yukarıdaki karışım aynen hazırlanır. 1Lt. için, içine 14 gr. Bakteriyolojik agar kondu ve steril edildikten sonra kullanıldı.

3.4.3. Plasmid izolasyonunda kullanılan solusyonlar

A Solusyonu

5 X Glukoz : 250 mM 50 ml. için 2.252 gr. glukoz üzerine steril dH₂O kondu ve eritildi. +4°C de saklandı.

5 X EDTA : 50 mM 50 ml. için 0,939 gr. EDTA üzerine dH₂O ile 50 ml. hacime tamamlanır. pH:7.5'e ayarlanır ve +4°C de saklanır.

5 X Tris : 125 mM 50 ml. için 0.752 gr. Tris üzerine dH₂O ile 50 ml hacime tamamlanır. pH: 7.5'e ayarlanır ve +4°C de saklanır.

B Solusyonu :

10 N NaOH : 40 gr. NaOH 100 ml. de çözüldü. Kullanılırken 2 N'e seyreltilerek kullanıldı.

% 10 SDS : 59 gr. SDS 50 ml. hacime tamamlanır. 68°C de çözüldükten sonra pH:7.5'e ayarlanır. Oda ısısında saklanır.

C Solusyonu :

Asetat Tamponu : 14.7 gr. potasyum asetat ve pH:5.5 ve de son hacim 50 ml. olacak şekilde glasiyel asetik asit konuldu.

D Solusyonu :

Amonyum Asetat : 7.5 M , 50 ml. için 28.75 gr. tartılır. Son hacim 50 ml. olacak şekilde tamamlanır.

5 X TBE (Elektroforez) Tamponu :

54 gr. Tris+ 27.5 gr. Borik asit + 20 ml. pH:8.0 EDTA son hacim 1 Lt' ye tamamlanır.

Elektroforez

Gelinin

Hazırlanması :

0.77 gr. Agaroza (%1.1) +15 ml. 5 X TBE+ 55 ml. H₂O karışımı kaynar su

banyosu içinde berak olanadek çözülür. 65°C sıcaklığa gelince içine 3 µl EtBr konularak karıştırılır ve jel dökülür. Oda ısısında 1 saat kuruduktan sonra kullanılır.

Elektroforez Tank Solusyonu :

50 ml. 5 X TBE solusyonu ve 350 ml. dH₂O konulur.

Gel Loading Buffer Solusyonu :

0.5 M 1.5 ml. pH: 8.0 EDTA + 40 mg Bromfenol Blue + 5 ml Gliserol. Kalan hacim 10 ml olacak şekilde dH₂O ile tamamlanır. Karanlıkta ve +4°C de saklanarak kullanılır.

EtBr Solusyonu (10 mg/ml) :

100 mg EtBr. 10 ml. dH₂O içinde çözülür. Karanlıkta ve +4°C de saklanarak kullanılır.

Ampisilin Solusyonu : Kullanılan amp. toz halinde satılıyor. Biz bunu stok olarak 50 mg/ml olacak şekilde sulandırarak kullandık. Karanlıkta ve +4°C de saklayarak kullandık.

DNA Replikasyonu :

Deney tüplerine hazırlanmış olan steril Terrefik Broth'tan 10 ml. konularak içine katı kültürden özeyle 2 kez ekim yapılmış ve tüpler çalkalandıktan sonra O/N +37°C su bonyosunda inkübasyona bırakılarak bakterilerin çoğalması sağlanmıştır (250 ml Terrefik Broth içine 12.5 µl amp konulmuştur).

3.4.4. DNA izolasyonu :

- 1) O/N üretilen 12 adet bakteri kültürleri santrifüj tüplerine konarak oda ısısında 20 dk. 8000 rpm de santrifüj edildiler.
- 2) Bu işlem sonrasında 12 adet tüpün süperlatantları atılır.

3) Taze olarak,

A Solusyonu : 4 ml dH₂O+1.5 ml. Glukoz+1.5 ml. EDTA+ 1.5 ml. Tris

B Solusyonu : 10 ml. dH₂O+ 2 ml 2 N NaOH+2 ml %10 SDS

4) Tüplerde kalan peletlerin üzerine 0.5 ml. A solusyonu kondu ve pelet çözölürölerek süspanse edildi.

5) Tüm tüpler 2 dk. buz içinde bekletildiler.

6) Tüm tüplere 1 ml A solusyonu kondu.

7) Tüm tüpler hafifçe vortexlenerek karışimleri sağlandı.

8) Tüm tüpler tekrar 2 dk. buz içinde tutuldular.

9) Soğuk solusyon C den tüm tüplere 0.5 ml kondu ve vortexlenerek karışimleri sağlandı.

10) Tüm tüpler 5 dk. oda ısısında tutuldu.

11) Tüm tüpler +4°C de 8000 rpm'de 15 dk. santrifölj edildiler.

12) Tüplerin süperlatantları her bir tüp için ayrı ayrı 2 adet ependorf tüpüne eşit hacimlerde bölündü (950 µl) ve tüpler buz içine kondu.

13) Ependorf tüp hacimlerinin yarısı kadar (475 µl) miktarda buz içindeki amonyum asetat solusyonu kondu.

14) Ependorf tüpleri +4°C'de 12000 G'de 15 dk. santrifölj edildiler.

15) Ependorf tüp hacimleri tekrar santrifölj tüplerine kondu.

16) Tüp hacimlerinin 2 katı kadar soğuk %95'lik EtOH konuldu (6 ml).

17) Tüplerin ağız kısımları parafilmlelenip -20°C'ye O/N kondu.

18) Etesi gün tüm tüpler +4°C'de 8000 rpm'de santrifölj edildiler.

19) Tüm tüplerin süperlatantları atıldı.

20) Peletlerin üzerine soğuk %70 EtOH 6 ml. kondu.

21) Tüm tüpler, +4°C'de 8000 rpm'de santrifölj edildiler.

22) Tüplerin süperlatantları atıldı.

23) Tüpler ters çevrilip oda ısısında 2.5 saat kurutuldu.

24) Tüm tüplere steril dH₂O'dan 100 µl konuldu ve tüp duvarındaki peletler çözdürülerek homejenasyon sağlandı.

25) -20°C'de saklanarak kullanıldılar.

3.4.5. DNA restriksiyonunun yapılışı

Alu I, BsuR I restriksiyon enzimleri için aşağıdaki yol izlenmiştir.

5µl DNA+1µl 10 X enzim tamponu+ 2 µl enzim+ 1 µl BSA+1µl dH₂O

Bam H I için aşağıdaki yol izlenmiştir.

5 µl DNA+2 µl dH₂O+1µl 10 X enzim tamponu+2µl enzim

Acc I, Hind III, Eco R II , Aat II için aşağıdaki yol izlenmiştir.

6 µl DNA+1 µl 10X enzim tamponu+3µl enzim

Yukarıda ki işlemlerde ilk önce 10 X tampon sonra enzim ve en sonda DNA konulmuştur. Bu işlemlerin tamamı buz içinde yapılmıştır.

Bu işlemin sonunda karışım için tüpler hafifçe santrifüj edilmiştir. Tüpler daha sonra 16 saat boyunca +37°C su banyosunda restriksiyona bırakılmıştır. Bu sürenin sonunda tüpler, +37°C'den alınarak +65°C su banyosunda işlemin durdurulması için 5 dk.tutulmuştur. Bu işlemin sonunda tüpler hafifçe santrifüj edilerek buz içine konulmuştur.

3.4.6. Agaroz gel elektroforezinin yapılışı :

Hazırlanan jel tankın içine kondu ve tanka 50 ml 5 X TBE+350 ml. dH₂O kondu. R.E.ile muamele edilmiş olan tüplere 2 µl jel loading buffer (6 X) ; kontrol içeren tüplere 1 µl jel loading buffer +5 µl DNA konulur; son olarak 1 µl marker+4 µl dH₂O+1 µl jel loading buffer konulur.

Tüm tüplerdeki içeriklerin karışımı için hafifçe santrifüj edilir.

Daha sonra bunları sırası ile normal klon ve restriksiyona uğramış klon yanyana gelecek şekilde gel havuzuna pipetlenir.

Her seferinde gelin son havuzuna marker pipetlenmiştir. Kontrol amacı ile.

Elektroforez işlemi $V=70$, $mA=20$, $W=007$, $W=150$ de ve toplam 3 saat olacak şekilde yapılmıştır. Çünkü; voltaj, mA ve W arttığı zaman DNA bantlarının düzensiz hareketine sebep olur ve sonuçta eğri bantlar elde edilir ve de kırılmalar olabileceği için iyi bir gözlem yapmak olanaksız olacaktır.

Elektroforez işlemi sonunda fotoğrafları (Poloroid) çekilmiştir.

Her seferinde gel analizinde 3 adet klon kullanılmıştır (3 adet restriksiyona uğramış kolon ve 3 adet uğramamış klon).

3.5. P.C.R. Amplifikasyonu

1) Primerler, AT 1 L 210 pmol/ μ l olacak şekilde ve AT 1 R 210 pmol/ μ l olacak şekilde stok solüsyonları hazırlandı.

2) Reaksiyon karışımı içinde DNA miktarı, 80 ng/ μ l ve primerler 10-50 pmol/ μ l olacak şekilde konuldu

3) 50 μ l hacimlik PCR karışımına;

5 μ l 10X PCR reaksiyon karışımı,

5 μ l dNTP karışımı,

5 μ l 25mM $MgCl_2$

2 μ l AT 1 L stoktan

2 μ l AT 1 R stoktan

2 μ l DNA

0,25 μ l Taq polimeraz

28.75 μ l d.dH₂O konuldu.

4) P.C.R. amplifikasyonu için;

a) 90°C'de 2 dk 1 kez,

b) 95°C'de 25 sn

c) 60°C'de 25 sn

d) 72°C'de 40 sn

30 kez

5) İşlem bitiminden sonra Bölüm 3'te açıklandığı şekilde agaroz gel hazırlandı. 24 µl PCR tüp karışımı+5 µl loading buffer gel havuzuna pipetlendi. Yine Bölüm 3'te verildiği gibi elektroforez işlemi yapıp fotoğraf çekimi yapıldı.



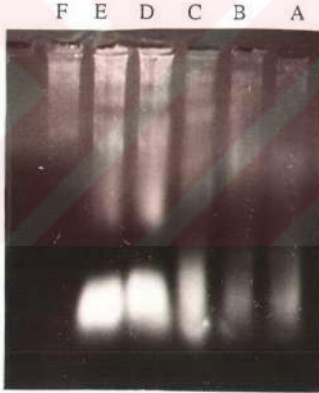
4. SONUÇ

Bu çalışmada; hypothalamic cDNA librarysinden elde edilen klonlar, pGEM 7Zf (-) rekombinant vektörüne kodlanan AT 1A alt tipi ve AT 1X' e özgün beyin alt tipi arasında restriksiyon analizi karşılaştırılması yapılmıştır. AT 1 A periferik Ang II tip 1 reseptörünü temsil eder ve tek klonu P-59 dur. AT 1 reseptörünü temsil eden klon P-59 ve P-15 tir.

A) Yukarıda numaraları verilen klonların sahip oldukları plasmidleri, aşağıda verilen restriksiyon enzimleri ile muamele edilmiş ve kesilen DNA fragmentlerinin fotoğrafları ve moleküler ağırlıkları belirtilmiştir.

B) XX, kesim olmadığıının ifadesidir.

Altındaki resimde RNaz muamelesi sonucu elde edilen DNA görülmektedir.



A) 2 µl RNaz

B) 1.5 µl RNaz

C) 1.0 µl RNaz

inkübasyonu.

D.E.F) Normal DNA enzim

RNaz inkübasyonu yok.

Bu resimde A,B ve C'de RNaz ile muamele edilmiş nükleik asitlerden jelin alt kısmında görülen DNA'lar degradasyona uğramıştır. D, E ve F de ise RNaz ile muamele edilmiş DNA'lar görülmektedir. R.E'lar ise sadece DNA'lar üzerinde etkili

olduğundan çalışmaları etkilemeyeceği düşünüldüğünden RNA ve DNA'yı birbirinden ayırma işlemi yapılmamıştır.

1) Enzim

Acc I

Kesme Sekansı

GT↓AGAC

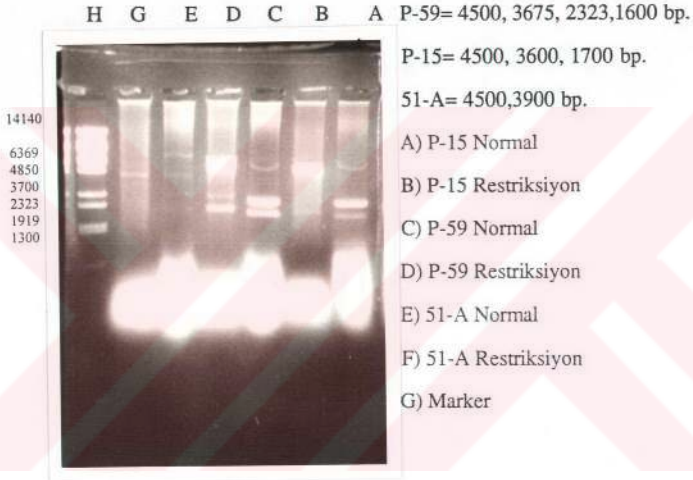
GT ↓ATAC

GT ↓CGAC

GT↓CTAC

Acc I enzimi AT 1 A 'dan 2 bant DNA fragmenti keser.

a) Resim 1: P-59,P-15, 51-A Acc I restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



Resim 1 de görüldüğü gibi 51-A Ang II tip 1 cDNA klonu Acc I enzim inkübasyonu sonucunda bir adet 4500 bp fragmenti ile beyin Ang tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona ve periferik Ang II tip 1 reseptör klonuna benzemektedir.

2) Enzim

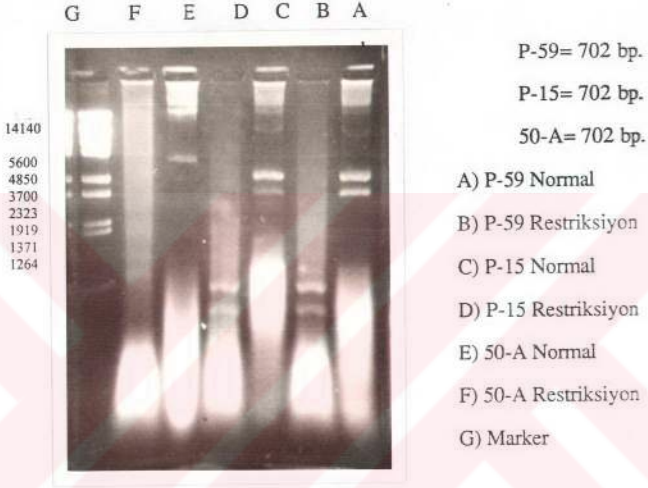
Kesme Sekansı

Alu I

AG↓CT

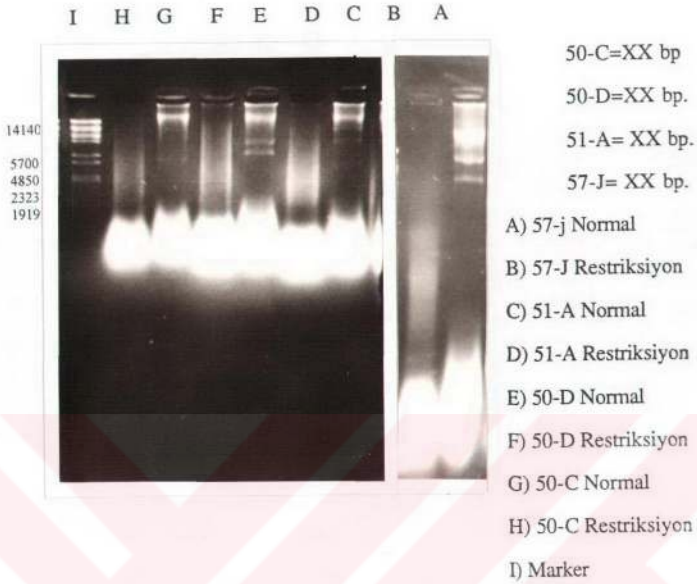
Alu I AT 1A'dan 9 bantlık DNA fragmenti keser

Resim 2'de P-59, P-15 ve 50-A klonları Alu I restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



Resim 2'de görüldüğü gibi 50-A Ang II tip 1 cDNA klonu Alu I enzimi ile inkübasyonundadır adet 702 bp'lik fragmenti ile beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona benzerken periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59 dan farklıdır. Buda 50-A'nın P-15'in özelliklerine sahip olduğunu göstergesidir.

Resim 3'te 50-C, 50-D, 51-A ve 57-J klonları Alu I restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



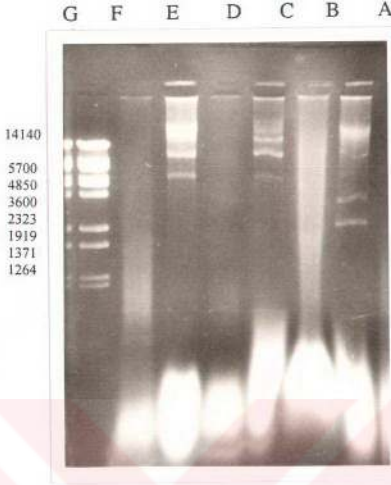
Resim 3'te ki klonlarda kesim olmadığından bu klonlar beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona ve periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59 dan farklıdır.

Resim 4'te 46-A, 46-B ve 46-E klonları Alu I restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.

46-A= 1280 bp.

46-B= XX bp.

46-E= 702 bp.



A) 46-A Normal

B) 46-A Restriksiyon

C) 46-B Normal

D) 46-B Restriksiyon

E) 46-E Normal

F) 46-E Restriksiyon

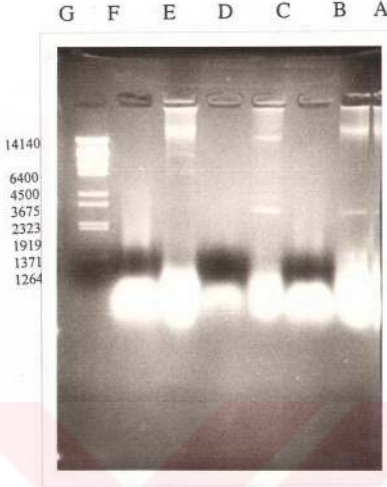
G) Marker

Resim 4'te 46-E Ang tip 1 reseptör cDNA klonu Alu I enzimi ile inkübasyonunda 702 bp'lık fragmenti ile beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona benzerken periferik AngII tip 1 reseptör klonu P-59'dan farklıdır.

Resim 5'te P-20 ve P-39 klonları Alu I restriksiyon enzimi ile inkübe edilmiştir.

P-20= XX bp.

P-39 XX bp



- A) P-20 Normal
- B) P-20 Restriksiyon
- C) P-39 Normal
- D) P-39 Restriksiyon
- E) Marker

Resim 5'teki klonlar Alu I enzimi muamelesi sonucu kesim olmaması nedeniyle beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona ve periferik Ang II tip 1 reseptörü klonu P-59'dan farklıdır.

3) Enzim

Bam H I

Ayrıca rat genomik DNA'sını 2 kez keser.

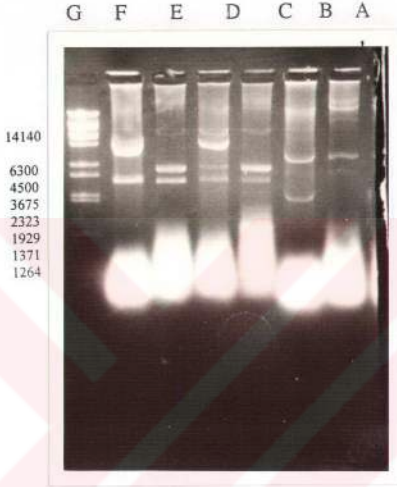
Resim 6'da P-15, P-59 ve 50-A klonları Bam H I restriksiyon enzimi ile muamele edilmiştir.

Kesme Sekansı

G↓GATCC

P-15= 14140, 4900, 3000, 1929,

1500 bp



P-59= 2400, 1500 bp.

50-A= 14140, 2323, 1200 bp.

A) 50-A Normal

B) 50-A Restriksiyon

C) P-15 Restriksiyon

D) P-15 Normal

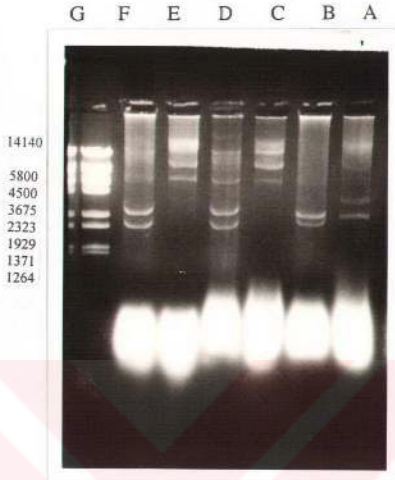
E) P-59 Restriksiyon

F) P-59 Normal

G) Marker

Resim 6'da 50 -A Ang tip 1 cDNA klonu Bam H I enzim inkübasyonunda 2323bp'lik fragmenti ile beyin Ang II tip 1 reseptörünü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona benzemezken periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'a benzemektedir

Resim 7'de 46-A, 46-B ve 46-E klonları Bam H I restriksiyon enzimi ile inkübe edilmiştir.



46-A= 4700, 2323, 1945 bp.

46-B= 4850, 2445, 1940 bp.

46-E= 5400, 2323, 1923 bp.

A) 46-A Normal

B) 46-A Restriksiyon

C) 46-B Normal

D) 46-B Restriksiyon

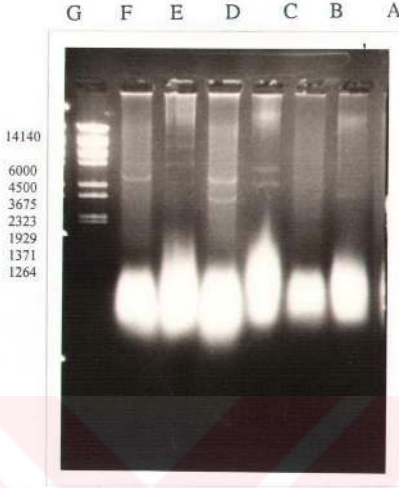
E) 46-E Normal

F) 46-E Restriksiyon

G) Marker

Resim 7'de 46-A 46-B ve 46-E Bam H I enzimi ile inkübasyonunda oluşan 1945, 1940 ve 1923 bp'lik bantlar, beyin Ang II tip 1 reseptör bölgesini taşıyan P-15 benzerken periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'da benzerdir.

Resim 8'de 50-C, 50-D ve 51-A klonları Bam H 1 restriksiyon enzimi ile inkübe edilmiştir.



50-C= 2500 bp.

50-D= 2400, 1900 bp.

51-A= 2500 bp.

A) 50-C Normal

B) 50-C Restriksiyon

C) 50-D Normal

D) 50-D Restriksiyon

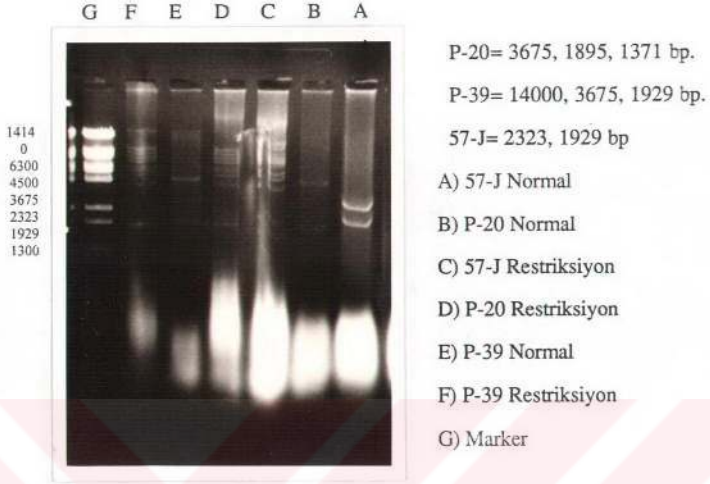
E) 51-A Normal

F) 51-A Restriksiyon

G) Marker

Resim 8' 50-D Bam H 1 enzim inkübasyonunda 1900 bp lik fragmenti ile beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 rekombinant klona benzerken, periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'dan farklıdır.

Resim 9'da P-20, P-39 ve 57-J klonları Bam H 1 restriksiyon enzimi ile inkübe edilmiştir.



Resim 9'da P-39 ve 57-J klonlarının Bam H 1 enzim inkübasyonu sonucu 1929 bp fragmenleri ile beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15'e benzerken, periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59 dan farklıdır.

4) Enzim

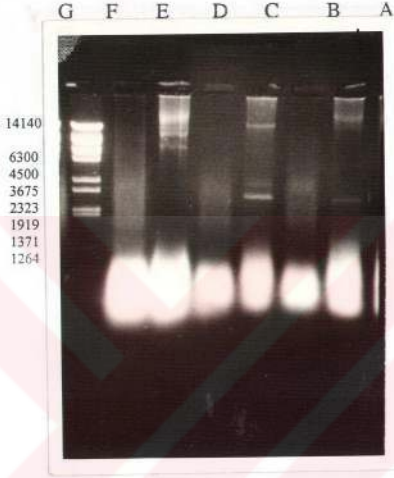
Kesme Sekansı

Bsu R I

GG↓CC

Bsu R 1 enzimi AT1 A'dan 12 bantlık DNA fragmenti keser.

Resim 10'da P-20, P-39 ve 57-J klonları Bsu R 1 restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



P-20= 1500 bp.

P-39= XX bp.

57-J= XX bp.

A) P-20 Normal

B) P-20 Restriksiyon

C) P-39 Normal

D) P-39 Restriksiyon

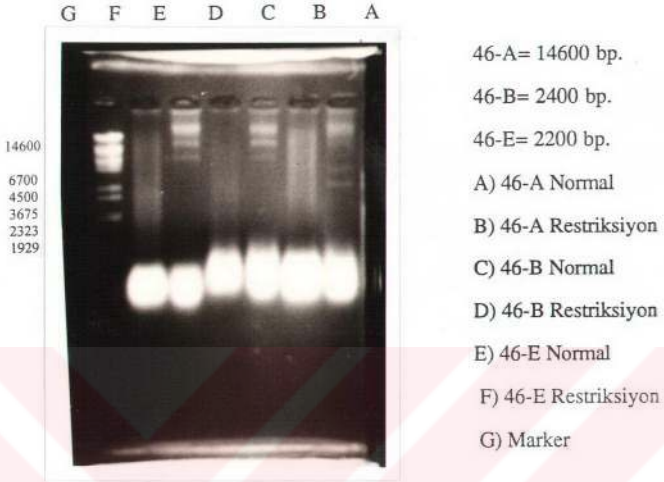
E) 57-J Normal

F) 57-J Restriksiyon

G) Marker

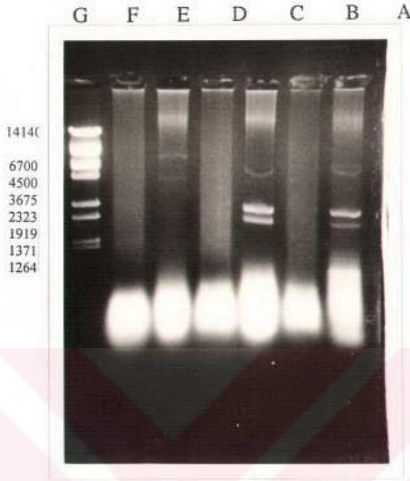
Resim 10'da 57-J klonu Bsu R1 ile inkübasyonunda kesime uğramadığını için beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 klonuna benzemektedir.

Resim 11'de 46-A, 46-B ve 46-E klonları BsuR 1 restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



Resim 11'de 46'lı klonların Bsu R 1 enzim inkübasyonunda kesime uğramayan P-15 ve P-59 rekombinant klonlarına benzememektedirler.

Resim 12'de P-15, P-59 ve 51-A klonları Bsu R 1 restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



P-15= XX bp.

P-59= XX bp

51-A= XX bp.

- A) P-15 Normal
- B) P-15 Restriksiyon
- C) P-59 Normal
- D) P-59 Restriksiyon
- E) 51-A Normal
- F) 51-A Restriksiyon
- G) Marker

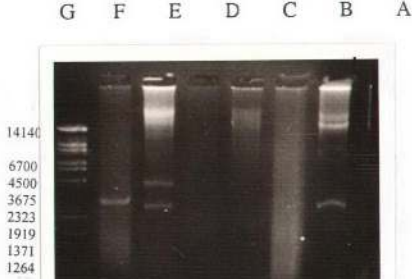
Resim 12'de 51-A klonu Bsu R 1 enzimi ile inkübasyonunda kesime uğramadığı için hem P-15 ve hem de P-59 rekombinant klonlarına benzemektedir.

Resim 13'te 50-A 50-C ve 50-D klonları Bsu R1 restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.

50-A= 702 bp.

50-C= XX bp.

50-D= 2600 bp.



A) 50-A Normal

B) 50-A restriksiyon

C) 50-C Normal

D) 50-C Restriksiyon

E) 50-D Normal

F) 50-D Restriksiyon

G) Marker

Resim 13'te 50-C klonunun Bsu R 1 enzim inkübasyonunda kesime uğramadığı için P-15 ve P-59 rekombinant klonlarına benzemektedir.

5) Enzim

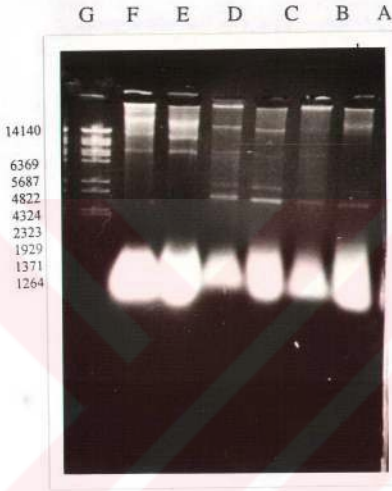
Kesme Sekansı

Aat II

GACGT↓C

Aat II enzimi AT 1A'dan kesim yapmamaktadır.

Resim 14'te P-20, P-39 ve 57-J klonları Aat II restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



P-20= 14600, 4822, 2100,1500 bp

P-39= 15000, 4900, 2323,1929bp

57-J= 16000, 14000,5800 bp.

A) P-20 Normal

B) P-20 Restriksiyon

C) P-39 Normal

D) P-39 Restriksiyon

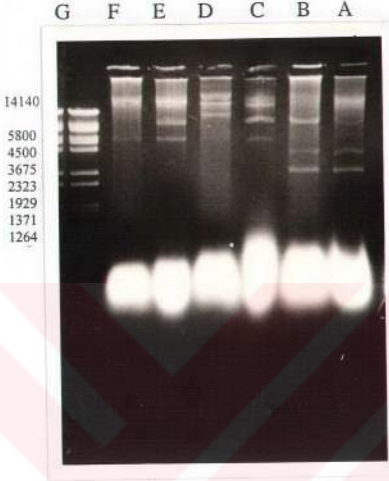
E) 57-J Normal

F) 57-J Restriksiyon

G) Marker

P-15 ve P-59 klonları ile karşılaştırma yapılamadığı için analiz yapılamamıştır.

Resim 15'te 46-A, 46-B ve 46-E klonları Aat II restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



46-A= 14000, 3675, 2323 bp.

46-B= 16000, 14300, 4900 bp.

46-E= 14400, 4700 bp.

A) 46-A Normal

B) 46-A Restriksiyon

C) 46-B Normal

D) 46-B Restriksiyon

E) 46-E Normal

F) 46-E Restriksiyon

G) Marker

P-15 ve P-59 klonları ile karşılaştırma yapılamadığı için analiz yapılamamıştır.

6) Enzim

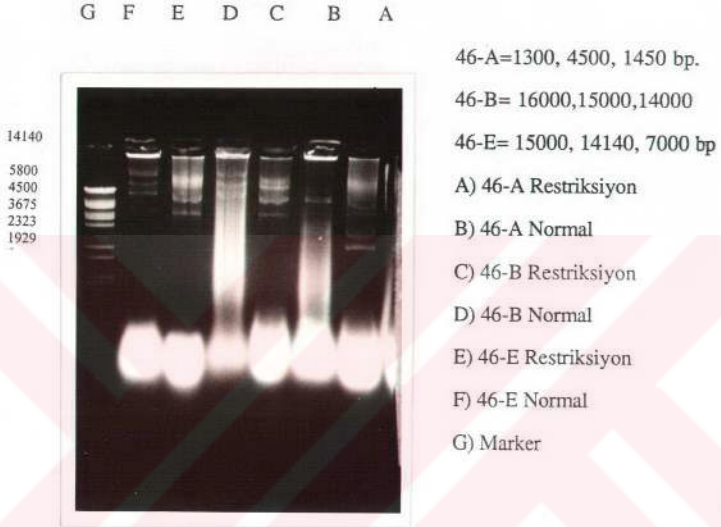
Kesme Sekansı

Hind III

A↓AGCTT

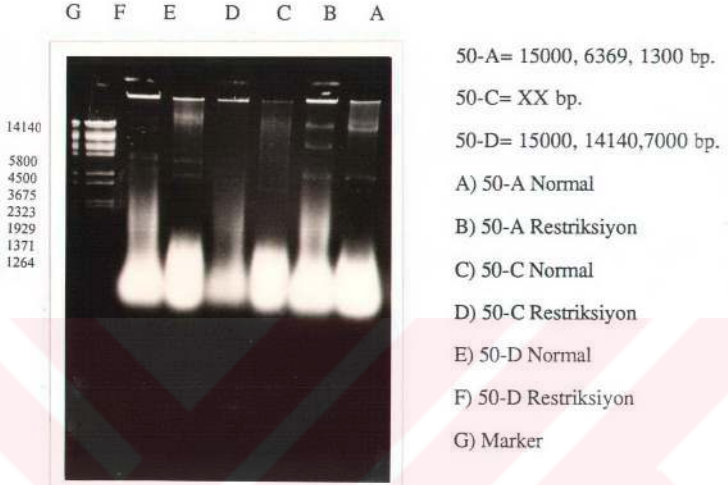
Hind III enzimi AT1 A'dan kesim yapmamaktadır.

Resim 16'da 46-A, 46-B ve 46-E klonları Hind III restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



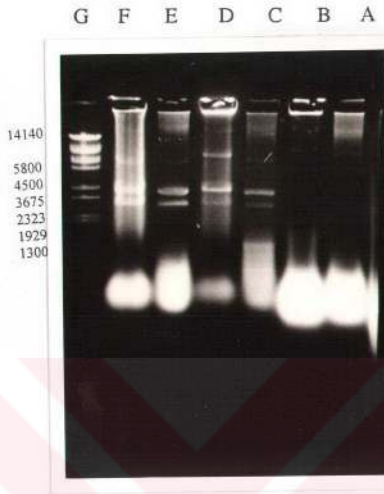
Resim 16' da 46-A kolonunun Hind III enzim inkübasyonu sonucunda 1450 bp'lik fragmenti ile beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 klonuna benzerken periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'dan farklıdır.

Resim 17'de 50-A, 50-C ve 50-D klonları Hind III restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



Resim 17'de 50-A klonunun Hind III enzim inkübasyonunda oluşan 1300 bp fragmentleri beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15'ten farklı ve periferik Ang II tip1 P-59 rekombinant klonu ile aynıdır.

Resim 18'de P-59, P-15 ve 51-A klonları Hind III restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



P-59= 4600, 1500, 1400 bp.

P-15= 5700, 1500, 1450 bp.

51-A= 1500, 8400, 3675 bp.

A) 51-A Restriksiyon

B) 51-A Normal

C) P-15 Normal

D) P-15 Restriksiyon

E) P-59 Normal

F) P-59 Restriksiyon

G) Marker

Resim 18'de 51-A klonunun Hind III enzim inkübasyonunda oluşan fragmentler Beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 ve periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'dan farklıdır.

Resim 19'da P-20, P-39 ve 57- J klonları Hind III restriksiyon enzimi ile inkübe edildi.



P-20= XX bp.

P-39= 15000,4324, 1500

57-J= 16000, 14140 bp.

A) P-20 Normal

B) P-20 Restriksiyon

C) P-39 Normal

D) P-39 Restriksiyon

E) 57-J Restriksiyon

F) 57-J Normal

G) Marker

Resim 19'da 3 klonunda Hind III enzim inkübasyonunda oluşan fragmentleri beyin Ang II tip 1 reseptörü kodlayan bölgesini taşıyan P-15 ve periferik Ang II tip 1 reseptör klonu P-59'dan farklıdır.

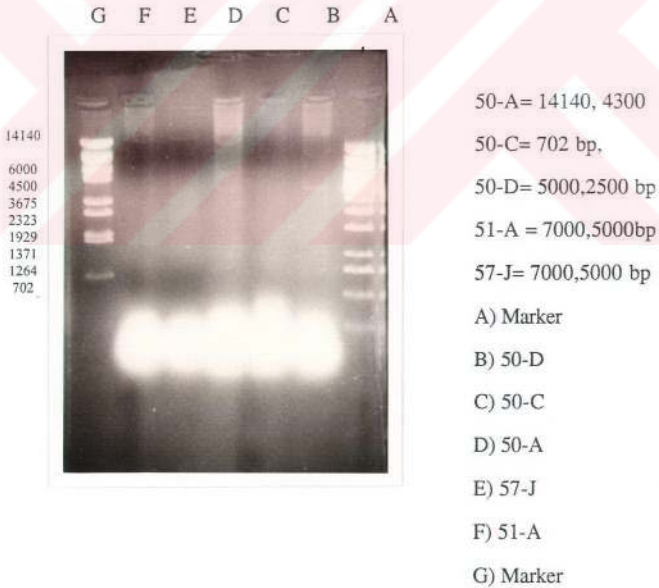
İzole Edilen Ang II Alt Tiplerini İçeren Rekombinant Hipotalamik cDNA Klonlarının P.C.R. İle Kontrolü

Çalışmalarımızda istediğimiz Ang II tip 1 alt tipinin olup olmadığını anlamak amacıyla uygun sekansların PCR'da çoğaltılarak doğruluğu gösterilmiştir. Bunun sonucunda spesifik angiotensin klonlarından 46-A ve 51-A'nın Angiotensin tip 1 reseptör alt tipleri olduğu kesinleşmiştir.

Buradaki pozitif kontrol P-15 ve P-59'dur.

P.C.R amplifikasyonu sonucu elektroforez işlemi sonrası elde edilen neticeler aşağıda resimlerde belirtilmiştir. Resimlerin yan taraflarında DNA fragmentleri ve moleküler ağırlıkları belirtilmiştir.

Resim I



Resim II



46-A= 14000 bp,

46-B= 14000 bp,

46-E= 800-1000 arası

P-15=2323,1929,702 bp

A) Marker

B) 46-A

C) 46-B

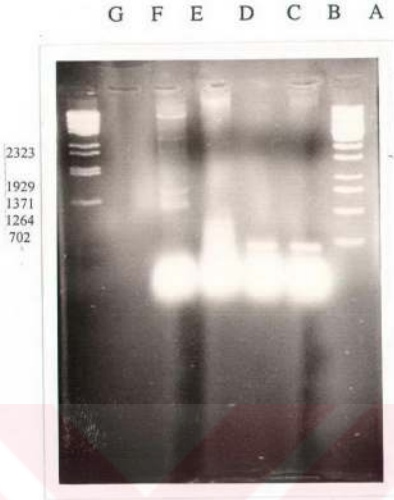
D) 46-E

E) Boş

F) P-15

G) Marker

Resim III



P-20=X bp

P-39= 5000,2400,1929

1000,702 bp

51-A= 500-700 bp arası

57-J= 500-700 bp arası

A) Marker

B) 51-A

C) 57-J

D) P-20

E) P-39

F) Boş

G) Marker

Tablo 4.1.A. cDNA Klonlarının Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi Sonucu

Ortaya Çıkan Fragmentler

Restriksiyon Alanları	46-A	46	46-E	50-A	50-C	50-D	51-A	57-j
Hind III Kesmiyor	3	3	1	1	0	2	1	2
Aat II Kesmiyor	0	0	0	N.A	N.A	N.A	N.A	0
Bam H 1 Kesmiyor	2	2	2	2	0	2	1	Çok
Alu 1 5 alan	Tümünde kesilen fragmentler 700 bp den küçük olduğundan RNA ile karışmıştır							
Acc I 2 alan	1	1	1	2	2	2	1	N.A
Bam H 1 Kesmiyor	Tümünde kesilen fragmentler 700 bp den küçük olduğundan RNA ile karışmıştır.							

Tablo 4.1.B. cDNA Klonlarının Restriksiyon Enzimleri İle Kesimi Sonucu

Ortaya Çıkan Fragmentler

Restriksiyon Alanları	P-59	P-15	P-20	P-39
Hind III Kesmiyor	0	0	0	0
Aat II Kesmiyor	N.A	N. A	0	2
BsuR I 7 alan	Tümünde kesilen fragmentler 700 bp den küçük olduğundan RNA ile karışmıştır			
Bam H 1 Kesmiyor	2	1	çok	çok
Alu I 5 alan	2	2	çok	çok
Acc I 2 alan	1	1	1	N.A

Not: Acc I analizi Dr. Akbaşak tarafından yapılmıştır

N.A : Analiz edilmemiştir.

Tablo 4.2. P-15 ve P-59'a Benzeyen Klonların Restriksiyon Enzimleri ile Kesim Paterni

ENZİM	Klon P-59'a Benzeyen Klonlar	Klon P-15'e Benzeyen Klonlar
Alu I	Yok	46-E ve 50-A
Bam H I	46-A, 46-B, 50-D,51-A	46-A, 46-B,46-E 50-D ve 57-J
Bsu R I	50-C, 51-A ve 57-J	50-C, 51-A ve 57-J
Acc I	51-A	51-A
Hind III	46-A ve 50-A	46-A

Şekil 4.1. AT 1 A mRNA Sekansı (8)

1ATGACCCCTTAACCTCTTCTGCTGAAGATGGTATCAAAAGAATCCAAGATGAC
TGCCCCAAG

61

GCTGGCAGGCACAGTTACATATTTGTCTGATCCCTACCCTCTACAGCATCAT
CTTGTG

121

GTGGAATATTTGGAAACAGCTTGGTGGTGATTGTCATTTACTTTTACATGAA
GCTGAAG

301

TGTAAGATCGCTTCGGCCAGCGTGAGCTTCAACCTCTACGCCAGTGTGTGT
TCCTTCTCACG

361

TGTCTCAGCATCGACCGCTACCTGGCCATCGTCCACCCAATGAAGTCTCGC
CTTCGCCGC

421

ACGATGCTGGTGGCCAAAGTCACCTGCATCATCATCTGGCTGATGGCTGGC
TTGGCCAGT

481

TTGCCAGCTGTCATCCACCGAAATGTATACTTCATCGAGAACACCAATATCA
CACTGTGC

541

GCGTTTCATTATGAGTCTCGGAATTCGACGCTCCCCATAGGGCTGGGCCTT
ACCAAGAAT

601

AATCTGGGCTTCTTGTTCCCTTTCCTATCATTCTCACCAGCTATACCCTTATT
TGAAAA

661

GCTCTAAAGAAGGCTTATGAAATTCAAAAGAACAACCAAGAAACGATGAC
ATCTTTAGG

721

ATATTATGGCGATTGTGCTTTTCTTCTCTTTTCCTGGGTCCCCACCAAATA
TTCAT

781

TTCTGGATGTGCTGATTCAGCTGGGCGTCATCCATGACTGTAAAATTCTGA
CATCGTG

841

GACACTGCCATGCCCATCACCATCTGCATAGCGTATTTTAACAACCTGCCTGA
ACCCTCTG

901

TTCTACGGCTTCTGGGGAAGAAATTTAAAAAGTATTTCCTCCAGCTCCTGA
AATATATT

961

CCCCAAAGGCCAAGTCCCACTCAAGCCTGTCTACGAAAATGAGCACGCTT
TCTTACCGG

1021

CCTTCGGATAACATGAGCTCATCGGCCAAAAAGCCTGCGTCTTGTTTTGAG
GTGGAGTGA

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar bize restriksiyon analizi yapılan 8 klonun 46-A ve 51-A'nın Ang II tip 1 beyine özgü reseptörünü yani AT 1 X'i ihtiva ettiğini hem restriksiyon analizi hemde P.C.R. kontrolü ile göstermektedir. Bu her iki klon, sadece kodlanan bölgeyi ihtiva eden P-15 rekombinant klonu ile aynı restriksiyon özelliklerini ihtiva etmektedir. Daha önceden çalışmada yapılan sekans analizi bu klonun % 5 oranında periferik AT 1 A'dan farklı olduğunu göstermiş olup beyine özgün Ang II tip 1 AT X diye tanımlanması ile sonuçlanmıştır. İşte bu çalışma ile hipotalamik cDNA kütüphanesinden Dr. Akbaşak tarafından izole edilen 8 adet klon içinden sadece 46-A ve 51-A'nın AT 1 X'in restriksiyon özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir. Ayrıca bu iki klon P.C.R 'da da Ang II oktapeptidini kodlayan tüm genetik kontrol bölgesini içeren 3.2 kb lık tam bir ekspresyon klonu olduğunu pozitif bant vererek ispatlamıştır. Bundan sonraki çalışmalar bu 2 klonun sekans analizi üzerinde yoğunlaşıp, farklı bölgeleri yani hem 3' hem de 5' translasyona uğramış DNA sekanslarında tanımlanması yönünde olmalıdır. Bu klonların özgün DNA yapısına sahip olması beyindeki Ang II tip 1 reseptör heterojenitesi tanımlanarak fizyolojik özelliklerinin araştırılmasında faydalı olacağı kanaatindeyiz.

KAYNAKLAR

- 1) M. Ian Philips, Elisabeth A . Speakman : Levels of Angiotensin and Molecular Biology of the Tissue Renin Angiotensin Systems. Regulatory Peptides, 43 (1993) p 3,6.
- 2) Ryoichi Takayanagi, Keizo Ohnaka et al : Molecular Cloning, Sequence Analysis and Expression of a cDNA Encoding Human Type 1 Angiotensin II Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 183, No: 2 March 16, 1992, p 910-912.
- 3) Terry S. Elton, Clifford C. Stephan et al : Isolation of Two Distinct Type 1 Angiotensin II Receptor Genes. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 184, No: 2 April 30, 1992, p 1067-1070.
- 4) Hiroaki Furuta, Deng- Fu Guo, Tadashi Inagami : Molecular Cloning and Sequencing of the Gene Encoding Human Angiotensin II Type 1 Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communication. Vol. 183, No: 1 February 28, 1992, p 8-11.
- 5) Hiroaki Yoshida, Deng Fu- Guo et al : Analysis of the Evolution of Angiotensin II Type 1 Receptor Gene in Mammals (Mouse, Rat, Bovine and Human). Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol. 186, No: 2 July 31, 1992, p 1042-1043.
- 6) Derk J. Bergsma, Catherine Ellis, et al : Cloning and Characterization of a Human Angiotensin Type 1 Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 183, No: 3 March 31, 1992, p 989-991, 994.
- 7) Hong Ji, Kathryn Sandberg, Yue Zhang, Kevin J. Catt : Molecular Cloning, Sequencing and Functional Expression of an Amphibian Angiotensin II Receptor. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 194, No: 2 July 30, 1993, p 756, 760.

- 18) Noyan A : Fizyoloji. 1990, p 616-617, 832.
- 19) Terzioğlu M : Fizyoloji. 1993, p 398-399.
- 20) Kayaalp Oğuz S. : Tibbi Farmakoloji . Cilt, 2, 1982, p 1115.
- 21) Telefoncu A. : Biyokimya. 1992, p 378.
- 22) Robert K. Murray and Peter A. Mayes : Harper Biochemistry. 1990, p 632-635.
- 23) Arda M. : Bioteknoloji. Kükem Derneği Bilimsel Yayınları. No: 1, s 32-36, 115-120.
- 24) Guyton C. : Medical Physiology. 1986, p 349, 379, 367-369, 472, 594-595, 629, 1317-1318.
- 25) Price C. Fundamentals of Enzimology. Oxford University Press. 1989, p 73-74.
- 26) Akman M. : Bakteri Genetiği. C. Ü. Tıp Fak. Yayını. 1983, p 17, 373, 374, 379, 382-383, 416.
- 27) Arda M. : Genel Bakterioloji. A.Ü. Veteriner Fak. Yayını. 1985, p 317-319.
- 28) Voet D. : Biochemistry. 1995, p 883-887.
- 29) Benjamin L. : Gene Expression. 1975.
- 30) Durmaz R.: P. C. R. Teknolojisi ve Mikrobiyolojide Kullanımı. Mikrobiyoloji Bülteni. 29, 1995, s 305, 308-309.
- 31) Serge P. Botteri ; Marc de Gasparo et al : Angiotensin II Receptor Subtypes, Characterization, Signalling, Mechanism and Possible Physiological Implications. Frontiers in Neuroendocrinology. Vol.14 No: 2 1993 P 138, 150
- 32) John W. Wright and Joseph W. Harding. : Regulatory Role of Brain in the Control Physiological and Behavioral Responses. Brain Research Reviews. (17) 1992) p 228- 250.
- 33) Juan M. Saavedra : Brain and Pituitary Angiotensin . The Endocrine Society 13: 2 1992 p 329-330.
- 34) Aguilera G., Sunar Akbaşak B. et al : The R.A.S. and Stress Response. Annals Newyork Acad. Sci. 1995

8) Naoharu Iwai and Tadashi Inagami : Identification of Two Subtypes in the Rat Type 1 Angiotensin II Receptor. Federation of European Biochemical Sciences. Vol . 298, No: 2, 3, 1993, p 257. 260.

9) Sham S. Kakar, Kristen K. Riel and Jimmy D. Neill : Differential Expression of Angiotensin II Receptor Subtypes mRNAs (AT1A and AT1B) in the Brain. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 185, No: 2 June 15, 1992 p 688-689.

10) N. Iwai, Y. Yamano et al : Rat Angiotensin II Receptor : cDNA Sequence and Regulation of the Gene Expression. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 177, No: 1 May 31, 1991, p 299.

11) Andrew D. Morris and Richard Donnelly : Angiotensin II: An insulin- Sensitizing Vasoactive Hormone?. J. of Clinical Endocrinology and Metabolism. Vol . 81, No: 4, 1996, p 1303- 1305.

12) Sham S. Kakar, Jeffy C. Sellers, Daniel C. Devor et al : Angiotensin II Type 1 Receptor Subtype cDNAs: Differential Tissue Expression and Hormonal Regulation. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 183 No: 3 March 31, 1992, p 1090-1095.

13) Alfred W. A. Hahn, Uwe Jonas et al : Identification of a Fourth Angiotensin AT1 Receptor Subtype in The Rat. Biochemical and Biophysical Research Communications. Vol . 192, No: 3 May 14, 1993, p 1260-1264.

14) Akbaşak S. B. : Localization of a Novel mRNA for Encoding a Possible Angiotensin II Receptor Subtype in the Rat Brain. Tr. J. of Medical Sciences. 25, 1995, p 93-96.

15) Greti Aguilera, Shakti Kapur et al : Developmental Changes in Angiotensin II Receptor Subtypes and AT1 Receptor mRNA in Rat Kidney. Kidney International. Vol 46, 1994, p 973-975.

16) Kılıçturgay K : Temel Mikrobiyoloji ve Parazitoloji. 1992, p 60-61.

17) Bilgehan H : Temel Mikrobiyoloji ve Bağışıklık Bilimi. 1992, p 161-162.

ÖZGEÇMİŞ

28.04.1972 yılında Şumnu'da doğdu. İlk ve orta öğrenimini Bandırma'da tamamladı. 1990 yılında İnönü Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümünde lisans eğitimine başladı. Haziran 1994'te mezun oldu. 1994 yılında İnönü Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilimdalında Yüksek Lisans eğitimine başladı. Yine 1994 yılında İnönü Üniversitesi Biyoloji bölümünde Araştırma Görevlisi olarak göreve başladı. Halen bu görevine devam etmektedir.

Poster

B.S. AKBAŞAK , H.KAHRAMAN

Molecular Cloning, Restriction and Sequence Analysis Revealed a Novel cDNA Encoding Rat Brain Type I Angiotensin Receptor

Kayseri 15. Gevher Nesibe Tıp Günleri Kongresi

27-30.Mayıs.1997 KAYSERİ.