



Rekombinant DNA Teknolojisi

Gen Klonlama ve Manipulasyonunun Temelleri

Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi
Fen Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
2021

1 Giriş

Çoğu moleküler biyoloji tekniğinin temel materyali genlerdir. Bu tekniklerin çoğu genlerin nasıl çalıştığının anlaşılmasını kolaylaştırmak için geliştirilmişlerdir. Bir grup moleküler biyoloji tekniğini içeren rekombinat DNA teknolojisi de aynı amaca hizmet etmek üzere geliştirilmiştir. Daha önceki birçok çalışmanın da olağanüstü katkısı ile 1970'lere gelindiğinde iki farklı biyolojik orijinden gelen DNA moleküllerinin birleştirilmesi mümkün olmuştur. Elde edilen bu DNA molekülü rekombinant DNA olarak anılmıştır. Esasında bazı doğal süreçler sonucunda da (genetik rekombinasyon gibi) rekombinant DNA molekülleri oluşabiliyorsa da rekombinant DNA kavramı daha çok farklı biyolojik orijinlere sahip DNA moleküllerinin yapay olarak birleştirilmesiyle oluşan DNA moleküllerini ifade etmek için kullanılmaktadır. Genel bir rekombinant DNA tanımı şöyle yapılabilir: **Rekombinant DNA**, doğal olarak genellikle birlikte bulunmayan DNA dizilerinin bir araya getirilmesiyle yapay olarak oluşturulmuş herhangi bir DNA molekülüdür. Rekombinant DNA elde etmek üzere uygulanan tekniklerin tamamına da **rekombinant DNA teknolojisi** denilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisi rekombinat DNA elde etmek ve elde edilen DNA üzerinde bazı araştırmalar ve modifikasyonlar yapmak üzere kullanılan birçok tekniği içerir. Bunlar arasında gen klonlama, PCR, DNA dizileme, yönlendirilmiş mutasyon, genomik, genom düzeltme gibi bazıları sayılabilir. Bu ana tekniklerin uygulanması için birçok temel teknik de rekombinant DNA teknolojisinde kullanılmaktadır. Bunlardan bazıları da şunlardır: DNA izolasyonu, restriksiyon endonükleaz kesimi, jel elektroforaz, DNA uç modifikasyonu, ligasyon, DNA transferi, konak hücre tasarımı, DNA işaretleme, DNA blotlama, DNA hibridizasyonu, primer tasarımı ve cDNA oluşturma gibi. Lisans düzeyinde verilecek olan bu derste sınırlı süre içinde bu teknolojinin temellerinin sunulması planlanmıştır. Öncelikle DNA klonlama ve manipülasyon konuları merkezde tutularak teknikler sunulmaktadır.

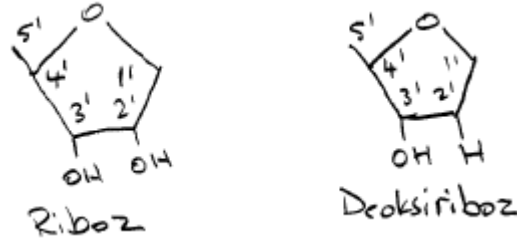
Rekombinant DNA tekniklerinin anlaşılabilmesi için DNA hakkında bazı temel bilgilerin yeterince özömsenerek anlaşılmış olması gerekmektedir. Öncelikle DNA ikili sarmal yapısının iyi bir şekilde bilinmesi zorunludur. Ayrıca DNA replikasyonu, transkripsiyon ve translasyon boyunca genetik bilgi akışının nasıl gerçekleştiğini bilmek gerekmektedir. Her ne kadar bu bilgilere sahip olanların bu dersi alıyor olması beklenmekte ise de DNA yapısı, replikasyonu ve ekspresyonu hakkında başlangıçta özet bilgiler sunulması uygun bulunmuştur.

1.1 DNA, RNA ve proteinler

Hücrelerde DNA ve RNA olmak üzere iki tip nükleik asit molekülü bulunur. DNA, hücrenin genetik bilgisinin şifrelenerek depolandığı bir polimerdir. DNA polimeri iki polimerik iplikçiğin antiparalel olarak konumlandığı ikili sarmal bir yapıdır. Herbir polimerik iplikçiğin altbirimleri olan nükleotitlerin yapısına katılan bazlar arasındaki spesifik eşleşme ile iki iplikçik, sarmal bir yapı oluşturmak üzere eşleşirler. Bu iki zincir üzerindeki bazların spesifik eşleşmesi komplementerlik (tamamlayıcılık, eşleniklik) olarak adlandırılır. Dolayısıyla çift zincirli bir nükleik asitin oluşabilmesi iki zincirin komplementer olarak homolog olmasına bağlıdır.

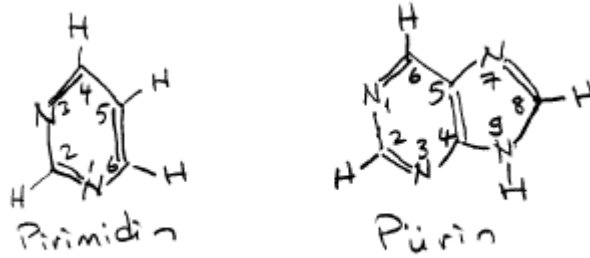
Her bir polimerik zincir nükleotit denilen temel birimlerin peş peşe bağlanmasıyla oluşur. Nükleotitler hücrede üç farklı grup molekülün bir birine bağlanmasıyla oluşturulur. Bunlar bir 5 karbonlu şeker, bir halka yapıli baz ve fosforik asit molekülüdür. Nükleik asitlerin yapısına katılan iki farklı 5 karbonlu şeker vardır, biri riboz diğeri deoksiribozdur (Şekil 1.1). Deoksiribozun 2' pozisyonunda H varken ribozunkinde OH bulunur. Riboz şekeri RNA nükleotitlerinin yapısına katılırken deoksiriboz DNA nükleotitlerinin yapısına katılır. 2' pozisyonu dışında 5 karbonlu şekerlerin

diğer üç pozisyonu DNA ve nükleotit yapısının oluşmasında rol alırlar. 5 karbonlu şekerin 1' ucuna halkasal baz molekülü bağlanırken 5' ucuna fosforik asit molekülü bağlanır, böylece bir nükleotit yapısı oluşur. Bir nükleotitin yapısına katılmış durumdaki 5 karbonlu şekerin (riboz veya deoksiriboz) 3' ucu nükleik asit polimerleşmesi sırasında yapıya yeni bir nükleotitin bağlanma noktası olarak iş görür. Böylece bir nükleotit polimerinin uzaması 3' pozisyonundan gerçekleşir.



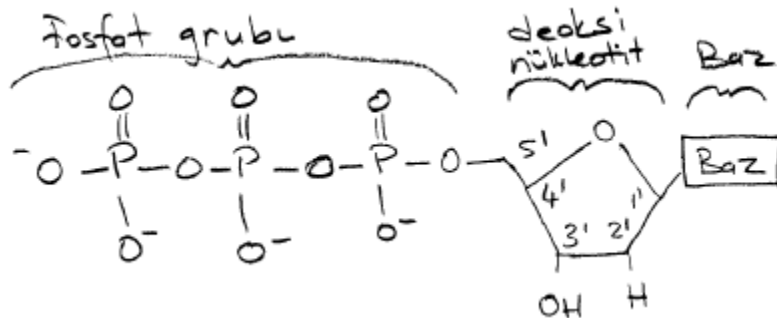
Şekil 1.1: Nükleik asitlerin yapısına katılan 5 karbonlu riboz ve deoksiriboz şekerlerinin yapısı.

Nükleotit yapısına katılan bazlar iki gruptur: pürin bazları ve pirimidin bazları. Pürin bazları adenin (A) ve guanin (G) olup bir çift aromatik halkadan oluşurlar (Şekil 1.2). Pirimidin bazları ise tek aromatik halkadan oluşan sitozin (C) ve timin (T) bazlarıdır. Nükleotit oluşurken bu bazlardan biri 5 karbonlu şekerin 1' pozisyonuna bağlanırlar. Fosforik asit grubu (PO_4^{3-}) 5 karbonlu şekerin 5' ucuna bağlanarak nükleotit yapısına katılır.



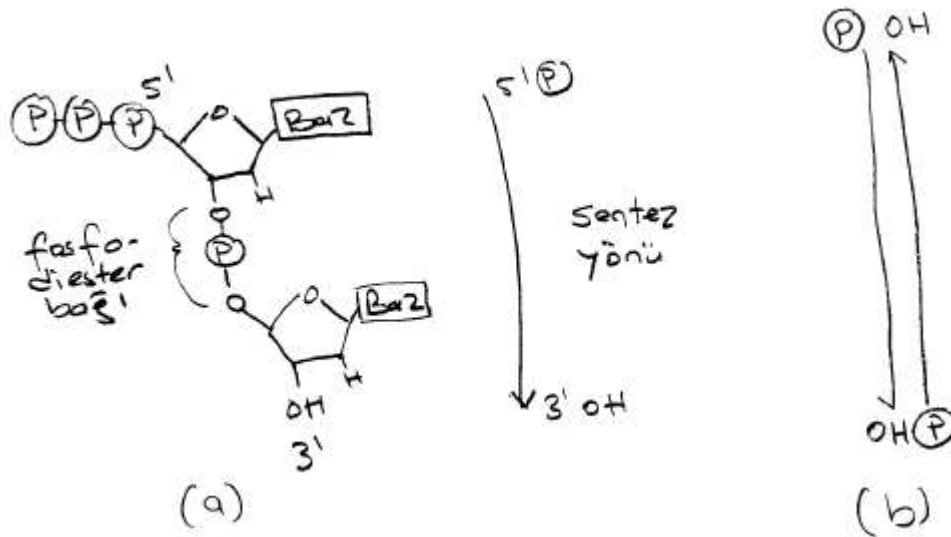
Şekil 1.2: Nükleik asitlerin yapısına katılan pirimidin ve pürin azotlu bazlarının genel yapısı.

Bir şeker ile bir bazın bağlanmasıyla oluşan yapıya şeker riboz ise **nükleosit**, deoksiriboz ise **deoksinükleosit** adı verilir. Bir nükleosit veya deoksinükleosit yapısına fosfat grubunun bağlanmasıyla oluşan yapıya **nükleotit** veya **deoksinükleotit** adı verilir (Şekil 1.3). Bir nükleosit veya deoksinükleosite 1 ila 3 fosfat grubu bağlanır. Bu moleküller bağlı olan fosfat grubu sayısına göre isimlendirilir. Eğer tek bir fosfat grubu bağlıysa monofosfat, iki bağlıysa difosfat ve üç bağlıysa trifosfat ifadesi eklenir. Sözelimi deoksiguanozin monofosfat, adenozin trifosfat gibi. Çoğunlukla bir DNA veya RNA polimerine katılacak olan nükleotot veya deoksinükleotit trifosfat formundadır.



Şekil 1.3: Bir deoksinükleotit trifosfat monomerinin yapısı. Deoksiribozun 1' pozisyonuna glikozidik bağ ile bir baz ve 5' pozisyonuna da posfodiester bağı ile fosfat grupları bağlanmıştır.

Nükleik asitlerin monomerleri peş peşe birbirlerine bağlanarak polimerik bir zinciri oluştururlar (DNA veya RNA zinciri). İki nükleotitin birleşerek bir dinükleotit oluşturması birinci nükleotitin 3' OH ucu ile ikinci nükleotitin 5' fosfat grubu arasında meydana gelen bir fosfodiester bağı ile gerçekleştirilir. Bu bağlanma sonucunda oluşan dinükleotit molekülünün bir ucu 5' fosfat diğer ucu da 3' OH şeklindedir. Bu durum, DNA (ve RNA) zincirlerinin yönlerinin ifadesinde kullanılır. Bir DNA zincirinin bir ucu 5' fosfat (5' P) diğer ucu da 3' OH şeklindedir (Şekil 1.4a). Bir dinükleotide veya daha uzun bir DNA polimerine yeni bir nükleotit biriminin bağlanması polimerin 3' OH ucuna, yeni nükleotit 5' P ucuyla bağlanması şeklinde gerçekleşir, yeni bağlanan nükleotitin 3' ucu polimerin 3' ucu haline gelir. Polimerleşme (nükleik asit zincirinin uzaması) aynı şekilde devam eder, yani bir nükleik asit zincirinin sentezi daima 5'-3' yönünde gerçekleşir. Adenin, sitozin ve guanin bazları her iki nükleotitin (hem DNA hem de RNA nükleotitleri) de yapısına katılır. Ancak timin sadece DNA nükleotitinin yapısına urasil de sadece RNA nükleotitinin yapısına katılır. Dolayısıyla DNA molekülleri urasil bazı, RNA molekülleri de timin bazı içermezler.



Şekil 1.4: a) DNA molekülünün polimerleşmesi ve zincirin yönü. RNA molekülü de aynı şekilde polimerleşir, fark ise deoksiriboz yerine riboz şekeri içeren nükleotitlerin birbirine bağlanması ve deoksitimin nükleotit yerine urasil nükleotitinin bulunmasıdır. b) Bir çift zincirli DNA'da (veya RNA'da) zincirlerin yönü.

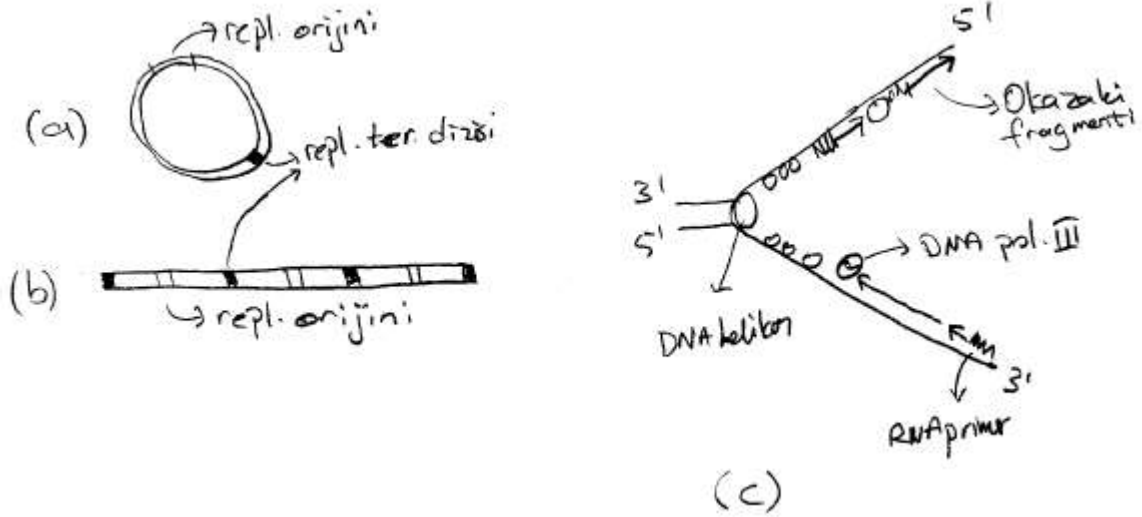
Nükleik asit sentezi sırasında nükleotitlerin şeker ve fosfat birimleri birbirine kovalent olarak bağlı durumdadır ve polimerin bu yapısı şeker-fosfat omurgası olarak isimlendirilir. Baz birimleri ise şeker-fosfat omurgasının diğer tarafında ve şeker birimine kovalent olarak bağlanmamış durumdadırlar. Çift zincirli DNA moleküllerinde her iki zincirin şeker fosfat omurgaları dışa gelecek şekilde antiparalel olarak bir ikili sarmal oluştururlar. Baz molekülleri ise sarmalın iç kısmında konumlanırlar. Böylece DNA yapısını oluşturan iki zincir zıt yönde pozisyon almış durumdadır (Şekil 1.4b). DNA molekülünün belli bir pozisyonundaki zincirlerden biri üzerindeki baz diğer zincir üzerindeki baz ile eşleşir. Bu eşleşme spesifik olup iki DNA zincirinin bir arada kalmasını sağlayan hidrojen bağlarıyla birbiriyle ilişkilidir. Karşı zincirlerdeki bazlar arasındaki bu spesifik eşleşme komplementerlik olarak adlandırılır. Komplementerlik belli iki baz arasında, belli bir pürin ile belli bir pirimidin arasında meydana gelir. Bu eşleşmeler DNA'da A-T ve C-G arasında meydana gelebilir. Eğer nadir durumlarda çift zincir oluşturulacaksa RNA'da bu eşleşme A-U ve C-G arasında gerçekleşir.

Bir DNA molekülünün büyüklüğü nükleotit sayısı (basitçe baz sayısı) ile ölçülür. Çift zincirli DNA için temel birim baz çiftidir (bç = bp). 1000 bç 1 kilo baz çiftidir (kb). Aynı şekilde 1 000 000 bç 1 megabaz çiftidir (Mb). Yine 1000 kb da 1 Mb'a denk gelir. 1 kb büyüklüğündeki bir çift zincirli DNA 6.6×10^5 dalton molekül ağırlığına sahiptir (330 gr/mol).

1.2 DNA replikasyonu ve gen ekspresyonu

Hücreler bölünme safhasına geçmeden önce hücre döğüsünün sentez safhasında mevcut DNA moleküllerinin replikasyonu gerçekleştirilir. Replikasyon sırasında DNA molekülünün her iki zinciri kalıp olarak kullanılarak her birinin komplementer zinciri sentezlenir, böylece hücredeki DNA miktarı iki katına çıkarılır. Bölünme sırasında iki katına çıkarılmış DNA molekülleri yavru hücrelere paylaştırılır.

Hücrede replikasyonu yapılan DNA moleküllerinde replikasyonun başladığı özel diziyne sahip bir bölge vardır. Bu bölge **replikasyon orijini** olarak adlandırılır. Replikasyon orijini sadece bu orijini tanıyıp bağlanabilen proteinlerin mevcut olması durumunda kullanılabilir. Dolayısıyla uzak akraba organizmalar replikasyon orijinini tanıyan proteinleri uygun olmadığı için yabancı bir DNA'nın replikasyonunu başlatamaz. Prokaryotların tek bir halkasal genomu üzerinde tek bir replikasyon orijini vardır. Bu orijin açılarak iki adet replikasyon çatalının zıt yönde hareket etmesiyle kromozomun replikasyonu başlatılır. Replikasyon, molekülün diğer yarısı üzerinde bulunan bir **replikasyon terminasyon dizisinde** her iki replikasyon orijininin birleşmesiyle tamamlanır. Bir replikasyon orijini ve bu orijinin her iki tarafında bulunan replikasyon terminasyon dizisinin arasında kalan DNA bölgesine **replikon** (replikasyon birimi) denir. Prokaryotların halkasal genomu tek bir replikon şeklinde organize olmuştur (Şekil 1.5a). Ökaryotların doğrusal genomları üzerinde çok sayıda replikasyon orijini ve dolayısıyla çok sayıda replikon vardır (Şekil 1.5b). Her bir replikon az çok bağımsız olarak çalışır.



Şekil 1.5: DNA replikasyonu. a) Prokaryotik kromozomun, b) ökaryotik kromozomun replikon organizasyonu. c) Prokaryotlarda bir replikasyon çatalında meydana gelen olaylar.

Başlatıcı proteinin yardımıyla iki altbirim halinde **DNA helikaz** replikasyon orijinine bağlanır ve her bir helikaz birbirine zıt yönde DNA molekülünün çift zincirlerinin açılmasını sağlar. Her bir helikazın çift zinciri açtığı bu bölgelere **replikasyon çatalı** denir (Şekil 1.5c). Replikasyon çatalında açılan DNA zincirlerinden birinin yönü 3'-5' iken diğerininki 5'-3' dür. 3'-5' kalıp zinciri üzerine bir RNA primer bağlanarak sağlanan 3' OH ucuna DNA polimeraz III tarafından kalıp zincirin komplementeri olan nükleotitler tek tek bağlanır. Bu zincirin sentez yönü DNA helikaz ile aynı yönde devam eder ve **ilerleyen zincir** adını alır. Replikasyon çatalındaki kalıp zincirlerden 5'-3' yönünde olan üzerinden DNA

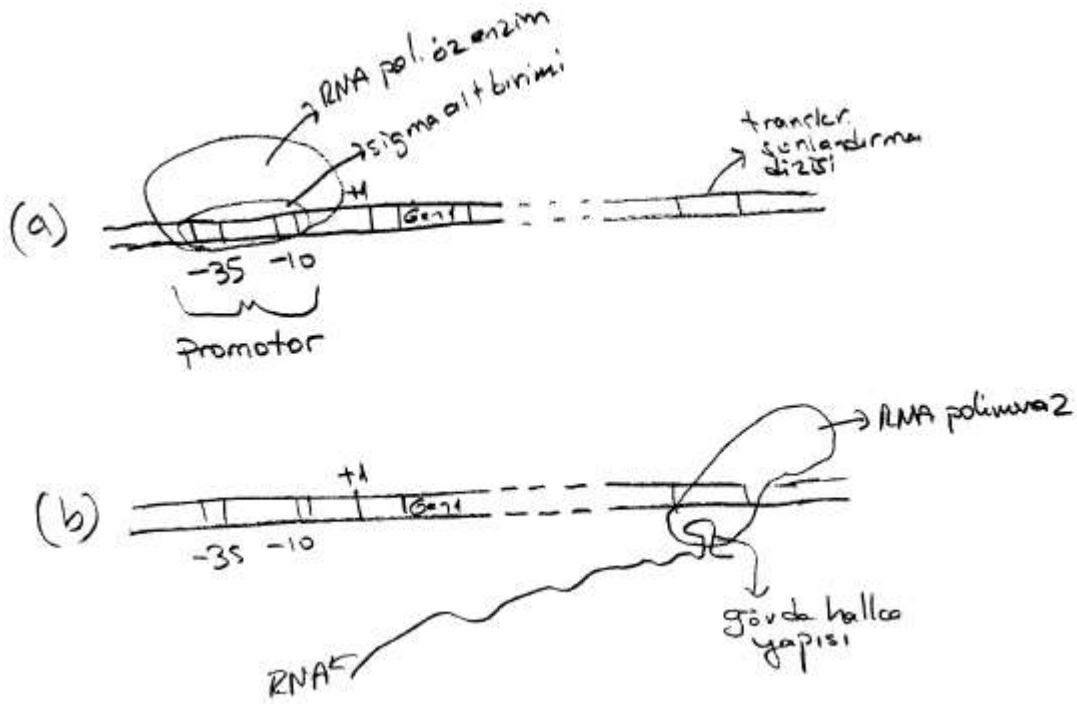
sentezi replikasyon çatalının tersi yönünde olmak zorundadır. Bir yandan ilerleyen zincir sentezi devam ederken diğer yandan 5'-3' zincirinde tersi yönde yeni zincir sentezi yine DNA polimeraz III tarafından yürütülür. Replikasyon çatalına göre replikasyon yönü ters olduğu için bu zincire **gerileyen zincir** de denir. Gerileyen zincir sentezi replikasyon çatalının ilerlemesiyle parçalı bir şekilde devam eder. Bu gerileyen zinciri oluşturan her bir parçaya **Okazaki fragmenti** denir. İki Okazaki fragmenti arasında kalan RNA yapısındaki primerler **DNA polimeraz I** enzimi tarafından yıkılarak yerine komplementer DNA nükleotitleri bağlanır. Son olarak da iki Okazaki fragmenti **DNA ligaz** tarafından birbirine bağlanır. Bu sentez işleyişi replikasyon orijinlerinin replikasyon terminasyon bölgesine ulaşana kadar devam eder ve bu bölgede replikasyon sonlandırılır, iki yeni yarı-korunmuş DNA molekülü birbirinden ayrılır.

DNA'nın genetik bilgi depolamanın yanında genetik bilginin ekspresyonu (RNA ve proteinlere aktarımı) fonksiyonu da vardır. **Gen ekspresyonu** iki basamakta gerçekleştirilir. Birinci basamak **transkripsiyon** olup DNA üzerindeki genetik bilgi RNA moleküllerine aktarılır. İkinci basamak ise **translasyon** olup bu süreçte mRNA üzerinde şifrelenmiş olan genetik bilgi proteinlerin amino asit dizisinin belirlenmesinde kullanılır, proteinler sentezlenir. Sentezlenen proteinler hücrede belirli görevleri yürütürler.

DNA üzerindeki belli gen bölgelerinin transkripsiyonunun gerçekleşebilmesi için başta RNA polimerazlar olmak üzere farklı protein faktörlerin tanıyıp bağlandığı promotor denilen özel diziler ihtiyaç duyulur. DNA'dan RNA sentezlemekle görevli olan RNA polimerazlar ancak tanıdıkları promotor dizilerine bağlanabilirler, uzak akraba organizmalara ait promotora bağlanamazlar.

Transkripsiyon sırasında RNA polimerazın RNA sentezlemeye başladığı ilk DNA baz çifti pozisyonu +1 olarak kabul edilir ve bu noktanın yukarısı (–) rakamlarla ifade edilir. Bir model olarak *Escherichia coli* bakterisine ait laktoz genlerinin transkripsiyon mekanizması şöyle özetlenebilir: Genin bulunduğu DNA bölgesindeki transkripsiyon başlama noktasının yukarısında **promotor bölgesi** yer alır. Promotor bölgesi içinde iki korunmuş özel dizi vardır (Şekil 1.6a). Bunlardan bir **-10 dizisi** veya **Pribnow dizisi** olarak adlandırılır. İkinci korunmuş dizi ise **-35 dizisi**dir. RNA polimerazın sigma altbirimi bu dizileri tanıyıp ve promotor bölgesine bağlanır, bu bağlanmayla beraber RNA polimeraz öz enzimi de promotora bağlanır. Bağlanma tamamlandıktan sonra RNA polimeraz DNA çift zincirini açar, açılan iki zincirden 3'-5' DNA zincirini kalıp olarak kullanarak bir RNA molekülünü bu kalıp zincirin komplementeri olarak sentezler. Transkripsiyonu yapılan bölge içinde prokaryotlarda genellikle birden fazla gene ait bilgi mevcuttur ve bu bilgi RNA'ya aktarılır. Transkripsiyonu yapılacak DNA'nın bitiş bölgesi bir **transkripsiyon sonlanma dizisi** ile belirlenir. RNA polimeraz bu diziye ulaştığında rho-bağımlı veya rho-bağımsız sonlandırma mekanizmalarının biri ile transkripsiyonu durdurulur, sentezlenen RNA ve RNA polimeraz serbest kalır (Şekil 1.6b).

Ökaryotlarda da prokaryotlara benzer fakat daha karmaşık promotor bölgeleri vardır. Gen bölgesinin yukarısındaki promotor bölgesinde -10 pozisyonunda **TATA kutusu** ve -30 pozisyonunda **CAAT kutusu** yer alır. Promotorun bu özel dizileri **TATA bağlanma proteini** denilen özel bir protein tarafından tanınır ve bağlanır, sonra RNA polimeraz da yapıya katılır ve RNA sentezi başlatılır. Gen bölgesinin sonundaki transkripsiyon terminasyon dizilerine ulaşıldığında sentez sonlandırılır. Ökaryotik transkripsiyonda genellikle tek bir gen bölgesi RNA'ya dönüştürülür.



Şekil 1.6: Prokaryotlarda transkripsiyon. a) Transkripsiyonun başlaması, b) transkripsiyonun sonlandırılması.

Translasyon DNA'dan transkripsiyon ile mRNA molekülüne aktarılmış olan genetik bilgi kullanılarak ribozomlar üzerinde belirli bir diziye sahip olan bir polipeptitin sentezlenme sürecidir. Öncelikle ribozomların doğru bir pozisyonda mRNA'ya bağlanması gerekir (Şekil 1.7). Bu bağlanma doğru pozisyonda yapılmazsa ribozom kompleksi genetik bilginin şifrelendiği doğru okuma çerçevesini bulamaz. Prokaryotlarda mRNA molekülü üzerinde ilk gene ait başlama kodonundan belli sayıda baz yukarıda yer alan bir **ribozom bağlanma dizisi** veya **Shine-Dalgarno dizisi** vardır. Bu dizi ribozom küçük alt birimi tarafından tanınır ve bu bölgeye bağlanılır. Bu spesifik bağlanma ribozomun doğru okuma çerçevesini tanımasını sağlar. Büyük altbirimin de yapıya katılmasıyla başlama kodonundan itibaren kodon şifreleri çözülerek polipeptit sentezi başlatılır ve her defasında bir kodon ilerlenerek polipeptit sentezlenir. Ribozom kompleksi bir dur kodonuna denk geldiğinde protein sentezi durur ve sentezlenmiş olan polipeptit serbest bırakılır. mRNA üzerinde hala diğer gen bölgeleri mevcutsa translasyon o gen bölgelerinde de devam eder.



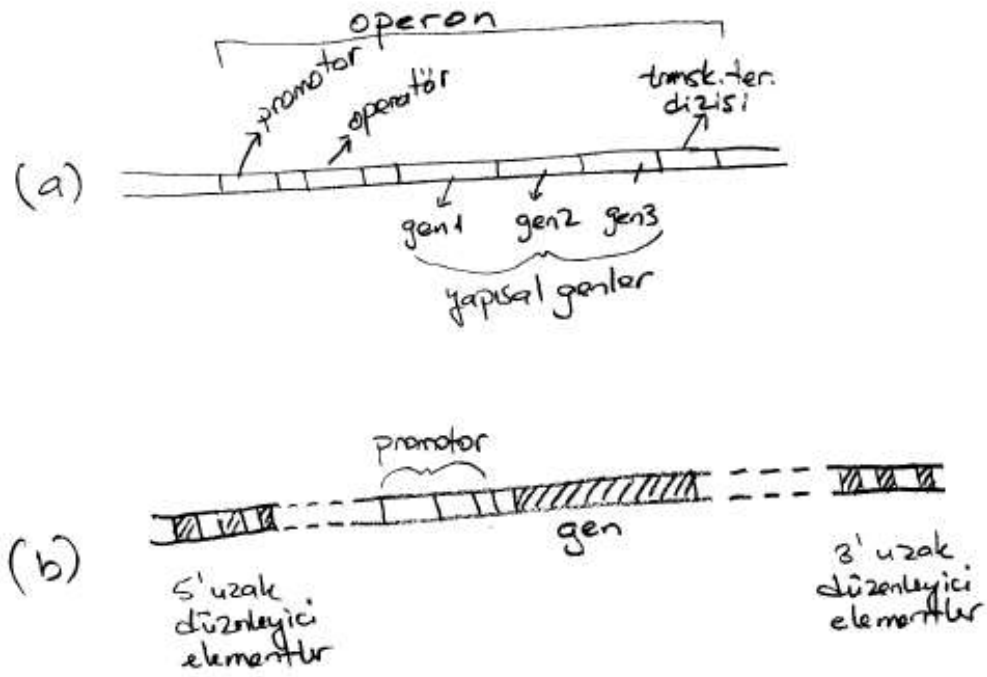
Şekil 1.7: Prokaryotlarda translasyonun başlaması (solda) ve sonlandırılması (sağda) mekanizması.

Ökaryotlarda da temel translasyon mekanizması aynıdır. Ribozom başlangıç kompleksinin doğru pozisyona bağlanması mRNA üzerindeki kep yapısının ve Kozak dizisinin yardımıyla gerçekleştirilir. Ökaryotik mRNA moleküllerinde sadece tek bir gene ait bilgi mevcuttur, bir mRNA'daki bilgilerle sadece bir adet polipeptit sentezlenir.

1.3 Gen organizasyonu

DNA üzerindeki belli bir gen bölgesi her biri özel şifreli mesajlar taşıyan bazı dizilerden oluşur. Bir geni içeren DNA bölgesi iki zincirden oluşur. Transkripsiyon sırasında bu zincirlerden biri mRNA sentezinde kalıp olarak kullanılır. Bu DNA zincirine **kalıp zincir** adı verilir. Kalıp zincirin komplementeri olan zincir ise **kalıp olmayan zincir** olarak adlandırılır. Her şeyden önce gen bölgesi bir polipeptitin amino asit sırasını belirleyen peş peşe sıralanmış çok sayıda kodondan meydana gelmiştir. Bu kodon dizisi açık okuma çerçevesi (satırı) olarak isimlendirilir. Açık okuma satırının ilk kodonu başlama kodonudur ki bu genellikle ATG (mRNA karşılığı AUG) veya GTG (mRNA karşılığı GUG) kodonudur. Amino asitleri kodlayan kodon dizinin sonunda ribozom kompleksine sentezin sona erdiğini bildiren bir anlamsız kodon (dur kodonu) yerleşiktir. Üç farklı dur kodonundan en az birinin mevcudiyeti gen bölgesinin sona erdiğini gösterir. Bu dur kodonları TTA, TAG ve TGA'dır (mRNA karşılığı UUA, UAG ve UGA'dır). Bir açık okuma çerçevesine ait doğru DNA dizisi (doğru mesaj) kalıp olmayan DNA üzerindedir. Bu nedenle kalıp olmayan zincir **anlamlı zincir** olarak da adlandırılır. Anlamlı zincirin komplementeri olan ve RNA sentezinde kalıp görevi gören zincir de **anlamsız zincir** olarak isimlendirilir.

Bir gen bölgesinde gen veya genler ve kontrol dizileri denilen diziler birlikte bulunurlar. Kontrol dizilerinin de yardımıyla bir DNA bölgesindeki genlere ait diziler RNA molekülüne dönüştürülürler. Prokaryotlarda promotör, operatör, yapısal genlerin ve transkripsiyon terminasyon dizisinin bulunduğu DNA bölgesi **operon** olarak adlandırılır. Operonlar bir çeşit **transkripsiyon birimi** olarak düşünülebilir (Şekil 1.8a). Bir operondaki protein kodlayan gen dizileri yapısal gen olarak isimlendirilir. Promotör ile yapısal gen bölgeleri arasında düzenleyici proteinlerin bağlandığı operatör bölgesi yerleşiktir. Bir operonda birden fazla yapısal gen yer alabilir. Ökaryotlarda bir operon modelinin varlığı belirlenememiştir. Yine de gen bulunduran ökaryotik DNA bölgesinin özel bir organizasyonu vardır (Şekil 1.8b). Genin yukarısında bir promotör bölgesi ve aşağısında da bir transkripsiyon terminasyon dizisi mevcuttur. İlave olarak genin oldukça yukarısında (5' tarafında) ve aşağısında (3' tarafında) uzak düzenleyici elemanlar denilen diziler genin transkripsiyonunun yönetilmesinde görev yaparlar. Tabi ki hem prokaryotlarda hem de ökaryotlarda transkripsiyonun yönetilmesinde faktör olarak isimlendirilen düzenleyici proteinler de rol alır.



Şekil 1.8: DNA üzerinde gen bölgelerinin organizasyonu. a) Prokaryotlarda operon yapısı, b) ökaryotlarda bir gen bölgesi.

Bir gen bölgesindeki promotor, operatör, Probnow kutusu, ribozom bağlanma bölgesi, başlama kodonu, uzak düzenleyici elementler, yapısal gen bölgeleri ve transkripsiyon terminasyon bölgeleri gibi bütün bileşenler özel DNA dizileridir. Bu özel diziler özel proteinler tarafından tanınarak bağlanılır ve beklenen işlev gerçekleştirilir. Şekil 1.9'da bir prokaryotik gen bölgesine ait bileşenlerin baz dizisi verilmektedir. DNA'nı sadece anlamlı zincirinin baz dizisi verilmiştir. Anlamlı DNA zincirinin baz dizisi mRNA dizisi ile özdeş bir dizi olduğu için (deosiriboz yerine riboz ve T yerine U bulunması durumu hariç) translasyon sırasında bu dizilerin pozisyonları mRNA üzerinde korunmuş durumdadır. Anlamlı DNA dizisi üzerinde öncelikle -35 ve Pribnow dizisi şeklinde promotor dizisi yer alır. Sonra +1 olarak mRNA sentezi başlangıç pozisyonu sonra ribozom bağlanma dizisi (rbs) yer alır. Daha sonra translasyonda genin başlama sinyalini veren ATG dizisinin ilk bazı +1 olarak işaretlenmiştir. Bir grup anlamlı kodondan sonra dur kodonları ve transkripsiyon terminasyon sinyali olarak iki adet gövde halka dizisi (stem loop sequence) yer alır.

Ökaryotlarda da benzer bir durum vardır, düzenleyici elementlerin kimliği ve pozisyonlarında farklılıklar görülür. En temel fark açık okuma satırı dizilerinin (eksonlar) nispeten uzun kodon içermeyen dizilerle (intron) kesintiye uğratılıyor olmasıdır. Ökaryotlarda intronlar transkripsiyon sırasında çıkarılır ve eksonların bütünleşmesi sağlanır.

Rekombinant DNA Teknolojisi

CAGCCAACTCAAGGATTTAACAGCGACAACAACGCATTACACCTTTTCTG

-35 bölgesi

GCAGGACGGAGATAAAGTCTTACCGCTTGAGCGCAAAGAGCTCCTTGGCC

-10 bölgesi +1

rbb

+1

AATTATTACTCGACGAGATCGTGACCCGTTATGATGAAAAAATCGACGT
M M K K I D V

TAAGATTCTGGACCCGCGCGTTGGGAAGGAATTTCCGCTCCCGACTTATG
K I L D P R V G K E F P L P T Y A

CCACCTCTGGCTCTGCCGGAATTGACCTGCGTGCCTGTCTCAACGACGCC
T S G S A G L D L R A C L N D A

GTAGAACTGGCTCCGGGTGACACTACGCTGGTTCCGACCGGGCTGGCGAT
V E L A P G D T T L V P T G L A I

TCATATTGCCGATCCTTCACTGGCGGCAATGATGCTGCCGCGCTCCGGAT
H I A D P S L A A M M L P R S G L

TGGGACATAAGCACGGTATCGTGCTTGGTAACCTGGTAGGATTGATCGAT
G H K H G I V L G N L V G L I D

TCTGACTATCAGGGCCAGTTGATGATTTCCGTGTGGAACCGTGGTCAGGA
S D Y Q G Q L M I S V W N R G Q D

CAGCTTCACCATTCAACCTGGCGAACGCATCGCCCAGATGATTTTTGTTC
S F T I Q P G E R I A Q M I F V P

CGGTAGTACAGGCTGAATTTAATCTGGTGGAAAGATTTTCGACGCCACCGAC
V V Q A E F N L V E D F D A T D

Dur

CGCGGTGAAGGCGGCTTTGGTCACTCTGGTCGTCAGTAACACATACGCAT
R G E G G F G H S G R Q *

Dur

Gövde halka yapısı

CCGAATAACGTCATAACATAGGCCGCAAACATTTTCGTTTGCGGTCATAGCG

İkinci gövde halka tapısı

TGGGTGCCGCCTGGCAAGTGCTTATTTTCAGGGGTATTTTGTAACATGGC

AGAAAAACAACTGCGAAAAGGAACCGTCGCGAGGAAATACTTCAGTCTC

Şekil 1.9: *E. coli dut* geninin DNA dizisi. Açık okuma satırından belirlenmiş amino asit dizisi DNA dizisinin altında verilmiştir. Özel diziler koyulaştırılmış ve altı çizilmiştir.

2 Rekombinant DNA İşlemlerinde Yaygın Kullanılan Enzimler

Rekombinant DNA işlemlerinin uygulanabilir olmasında kilit rollerden birisi de enzimlerdir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılanlardan bazıları şunlardır: Restriksiyon endonükleazlar, DNA ligaz, DNA polimerazlar, DNazlar, RNazlar, alkalin fosfataz, revers transkriptaz ve polinükleotit kinaz gibi.

2.1 DNA'yı kesen enzimler

Nükleik asitleri kesen enzimler nükleazlar olarak adlandırılır. DNA'yı kesen enzimlere deoksiribonükleazlar kısaca DNazlar, RNA'yı kesenlere de ribonükleazlar kısaca RNazlar denir. Bu bölümde DNazlardan rekombinant DNA işlemlerinde yaygın kullanılan restriksiyon endonükleazlar ve DNazI enzimi incelenecektir.

2.1.1 Restriksiyon endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar prokaryotlarda yabancı DNA'ların hücreyi istilasını engellemeye yönelik bir savunma sistemi olan **restriksiyon-modifikasyon sisteminin** bir bileşenidir. DNA'yı belli dizilerden tanıyarak bağlanıp iç kesimlerden kesen enzimlerdir. Enzim DNA zincirinin iç kısmında bulunan bir fosfodiester bağı kırar, 3' ucunda OH ve 5' ucunda P grubu kalır. Üç tip restriksiyon endonükleaz vardır: tip I restriksiyon endonükleazlar, tip II restriksiyon endonükleazlar ve tip III restriksiyon endonükleazlar. Tip I restriksiyon endonükleazlar DNA'yı belli bir bölgeden tanıyıp bağlanan ve bağlanma dizisinden 100-1000 nükleotit uzaktan rasgele bir noktadan kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin tanıma dizileri bilinse bile DNA'yı nereden kestiği bilinemez, bu nedenle rekombinant DNA işlemlerinde kullanılmazlar. Tip III restriksiyon endonükleazlar yine bir tanıma dizisinden DNA'ya bağlanan ve tanıma dizisinden 25-27 nükleotit uzaktan kesen enzimlerdir. Bu enzimlerin rekombinant DNA işlemlerinde kullanımı oldukça sınırlıdır. Rekombinant DNA işlemlerinde yaygın kullanılan restriksiyon endonükleazlar tip II restriksiyon endonükleazlardır. Yaygın kullanımından dolayı bu enzimler uygulamada sadece restriksiyon endonükleaz olarak anılır "tip II" ifadesi genellikle atlanır.

Restriksiyon endonükleazlar izole edildikleri türlerin isimlerinden faydalanılarak isimlendirilirler. Sözelimi *EcoRI* restriksiyon enzimi *Escherichia coli* bakterisinin R suşundan elde edilmiş ilk enzimdir. Enzimin ismini oluşturan ilk 3 harf tür isminden alındığı için italik gösterilir. Sonra kullanılan harfler ise organizmanın suş sembolü veya genin bulunduğu genetik elementin sembolü olabilir. *BamHI*, *Bacillus amyloliquefaciens H* suşundan elde edilen ilk enzimdir.

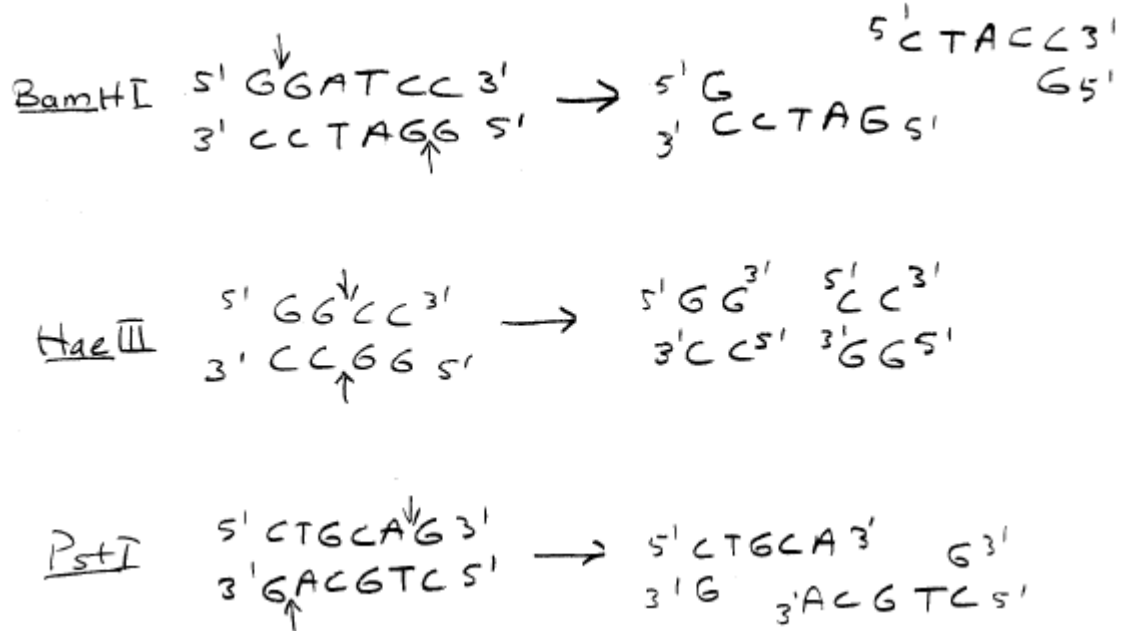
Restriksiyon endonükleazlar (tip II !) DNA molekülünü genellikle 4-8 bp uzunlukta olan bir **tanıma dizisinden** tanır ve bağlanır, DNA'yı bu tanıma dizisi içinde belli bir bölgeden keser. Kesim noktası DNA'nın iç kesimlerinde olduğu için bir endonükleazdır. Enzimler genellikle iki domainden meydana gelir ve her bir domain DNA molekülünü oluşturan zincirlerden biri üzerinde etkisini gösterir. DNA'ya bağlanmak için her enzim için özgül olan bir tanıma dizisinin bulunması gerekir. Herbir zincir üzerindeki tanıma dizisi domainlerden biri tarafından tanınır ve aynı domain tarafından özgül bölgeden kesilir. Tanıma dizileri rotasyonel simetrik dizilerdir. Ayrıca her iki zincirde de tanıma dizisi doğru yönde okunduğunda aynıdır. Yine tanıma dizileri birbirinin ayna görüntüsü olacak şekilde organize olmuştur. (Sözelimi GGATCC: TCC dizisi komplementerlik bakımından GAA dizisinin ayna görüntüsüdür). Bu diziler yazılırken genellikle zincirlerden birisinin dizisi 5'-3' yönünde yazılır diğer dizi ise bu dizinin komplementeri olup genellikle yazılmaz. Sözelimi *EcoRI* tanıma dizisi 5' GAATTC 3' şeklindedir (Tablo 2.1).

Restriksiyon endonükleazlar tanıma dizileri içinden belli bir bölgeden DNA'yı keserler. Eğer enzim tanıma dizisinin tam orta noktasındaki fosfodiester bağı kırarsa yeni oluşan fragmentin

ucu küt (kör) olur. Bu tip uçlara **kör uç** veya küt uç denir. Eğer tanıma dizisinin orta noktasının dışında diğer bir noktadan keserse yeni fragmentin ucunda tek zincirli bir uzantı oluşacaktır. Bu şekilde tek zincirli uçlar oluşturan enzimler **yapışkan uç** oluşturan enzimlerdir. Tek zincirin ucu 5' ise 5' yapışkan uç, 3' ise de 3' yapışkan uç oluşur (Tablo 2.1, Şekil 2.1) Aynı enzimle kesilen DNA'ların tek zincirli uçları birbiri ile komplementerdir. Bu nedenle birleştirilmek istenen iki DNA molekülü öncelikle yapışkan uç oluşturan aynı enzimle kesilir. Tanıma dizileri farklı olan iki restriksiyon enzimi komplementer uçlar oluşturabilir (örnek *Bam*HI ve *Sau*3A). Bu durumda da uçlar komplementer olduğu için iki DNA molekülü birleştirilebilir.

Tablo 2.1: Bazı restriksiyon endonükleazların tanıma dizileri ve oluşturdıkları uç tipleri.

Enzim	Tanıma dizisi	Uç tipi
<i>Bam</i> HI	5' GGATCC 3'	5' yapışkan
<i>Eco</i> RI	5' GAATTC 3'	5' yapışkan
<i>Hae</i> III	5' GGCC 3'	Kör (küt) uçlu
<i>Hind</i> III	5' AAGCTT 3'	5' yapışkan
<i>Hpa</i> I	5' GTTAAC 3'	Kör (küt) uçlu
<i>Pst</i> I	5' CTGCAG 3'	3' yapışkan
<i>Sau</i> 3A	5' GATC 3'	5' yapışkan
<i>Sma</i> I	5' CCCGGG 3'	Kör (küt) uçlu
<i>Sst</i> I	5' GAGCTC 3'	3' yapışkan
<i>Xma</i> I	5' CCCGGG 3'	5' yapışkan



Şekil 2.1: Bazı restriksiyon endonükleazların tanıma dizisi içindeki kesme noktaları ve oluşan fragmentlerin uç tipleri.

Bazen iki farklı enzim aynı diziyi tanıyabilir. Bu tip restriksiyon enzimleri **izoşizomer** olarak adlandırılır. İki izoşizomer aynı diziyi tanıyıp aynı noktadan kesebileceği gibi tanıma dizisi içinde farklı bölgelerden de kesebilirler. Örnek, *Sma*I ve *Xma*I 5' CCCGGG 3' dizisini tanırlar, *Sma*I tanıma dizisindeki 3. nükleotidden sonraki fosfodiester bağı kırarak *Xma*I ilk nükleotidden sonraki

fosfodiester bağı kırar. Bazı durumlarda DNA yapısındaki bazı bazlar restriksiyon modifikasyon sistemi tarafından metillenir (metil adenin ve metil sitozin). Eğer metillenmiş bazlar tanıma dizisi içindeyse tanıma dizisi modifiye edildiği için restriksiyon endonükleaz ile kesilemez.

Restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri DNA molekülleri boyunca az çok rasgele oluşurlar. Bir restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi bir DNA molekülü üzerinde 4^n sıklıkta oluşur (n , tanıma dizisi oluşturan baz çifti sayısı). Dört baz çifti uzunluğundaki bir tanıma dizisinin bir DNA molekülü üzerindeki tekrarlanma sıklığı $4^4=256$ bç iken 6 baz çiftlik bir tanıma dizisinin $4^6=4096$ bç'dir. Bu aralıklar çoğu durumda tam olarak sağlanmaz, daha kısa veya daha uzak mesafelerin olduğu durumlar yaygındır. Ancak yine de tanıma dizisi daha küçük olanlar DNA molekülünü daha büyük olanlara göre daha sıklıkla keserler.

Restriksiyon endonükleazlar rekombinant DNA işlemlerinin temel araçlarından biridir. Bir çeşit molekül makasları olarak düşünülebilir. Klonlanmak, manipüle edilmek ve küçültülmek istenilen bütün DNA moleküllerinin kontrollü kesiminde vazgeçilmez araçlardır. Birçok amaç için restriksiyon endonükleaz kesimine ihtiyaç duyulur: klonlanacak bir fragmentin küçültülmesi ve uçların uyumlu hale getirilmesi, vektör moleküllerinin klonlanacak fragment ile uyumlu uçlar oluşturacak şekilde kesilmesi ve klonlanmış bir DNA fragmentinin restriksiyon endonükleaz kesme pozisyonlarının belirlenmesi gibi.

2.1.2 DNazI

DNazların bir kısmı (DNazI gibi) DNA molekülünü herhangi bir tanıma dizisine ihtiyaç duymaksızın iç kısımlardaki fosfodiester bağı kırarak küçük parçalara ayıran endonükleazlardır. DNazI restriksiyon endonükleazların yetersiz kaldığı durumlarda DNA moleküllerini rasgele küçük parçalara ayırmak için kullanılır. Bu enzimlerin kestiği fragmentlerin uçlarındaki diziler tahmin edilebilir değildir ve çoğu durumda kör uçlar da üretmezler. Bu nedenle bu fragmentlerin ligasyonu ilave enzimatik işlemler uygulanmaksızın mümkün olmaz. Diğer uç modifiye edici ekzonükleazlar gibi enzimler kullanılarak fragment uçları kütleştirildikten sonra ancak ligasyonları yapılabilir.

2.2 DNA'yı modifiye eden enzimler

Bir grup enzim rekombinant DNA işlemlerinde DNA moleküllerinin modifikasyonu için kullanılır. Bunlar arasında fosfatazlar, polimerazlar, ekzonükleazlar ve metilazlar sayılabilir.

2.2.1 Fosfatazlar

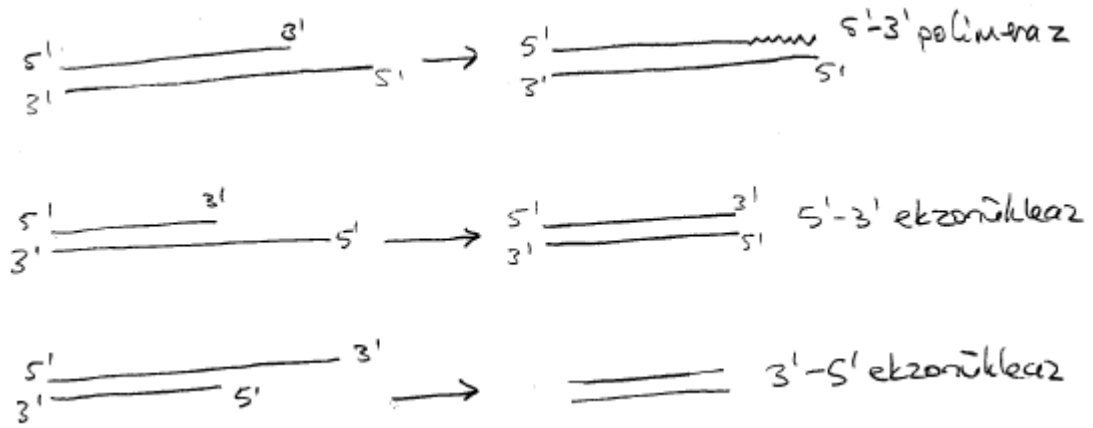
Fosfatazlar DNA moleküllerinden fosfat gruplarını uzaklaştırarak yerine hidroksil gruplarını bağlayan enzimlerdir. Rekombinant DNA işlemlerinde vektöre bağlanacak DNA moleküllerinin 5' uçlarındaki fosfat gruplarının istenmeyen kendikendine ligasyonların engellenmesi için fosfatazlar tarafından koparılır. Yaygın kullanılan fosfataz dana bağırsak alkalen fosfataz (CIAP) enzimidir. Ayrıca karides ve psikrofil bakterilerden elde edilen fosfatazlar da bu amaç için kullanılmaktadır.

2.2.2 Polimerazlar

Rekombinant DNA işlemlerinde dört tip polimeraz çalışmaların herhangi bir aşamasında kullanılmaktadır: DNA-bağımlı DNA polimerazlar (DNA polimerazlar), RNA-bağımlı DNA polimerazlar (ters transkriptazlar), DNA-bağımlı RNA polimerazlar (RNA polimerazlar) ve kalıp-bağımsız polimerazlar. Ayrıca RNA-bağımlı RNA polimerazlar da vardır ancak rekombinant DNA işlemlerinde sıklıkla kullanılan enzimler arasında değildirler.

1. **DNA bağımlı DNA polimerazlar:** DNA polimerazlar (DNA-bağımlı DNA polimerazlar) arasında rekombinant DNA çalışmalarında en yaygın kullanılanı DNA polimeraz I enzimidir. Enzimin 3 farklı

aktivitesi vardır. 5'-3' polimeraz aktivitesi, 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi. Prokaryotik orijinli bu enzimin hücredeki görevi Okazaki fargmentlerinin arasındaki RNA primerlerini yıkarak oluşan boşluğu 5'-3' yönünde doldurmaktır. Enzimin bu doğal formu **Kornberg enzimi** olarak adlandırılır. Enzimin doğal formu, bir proteaz olan subtilizin ile muamele edildiğinde iki parçaya ayrılır. Bu parçalardan biri 76 kDa büyüklüğünde olup 5'-3' polimeraz ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. **Klenow fragmenti** olarak adlandırılır ve rekombinant DNA işlemlerinde sıklıkla iki amaç için kullanılır. Bunlardan biri 5' yapışkan uca sahip fragmentlerin uçlarını polimeraz aktivitesiyle çift zincirli (küt) hale getirmektir. Bu olay **uç doldurma** olarak adlandırılır. Diğeri de yine 3' yapışkan uçlara sahip fragmentlerin uçlarını 3'-5' ekzonükleaz aktivitesiyle yıkarak küt uç oluşturmaktır ve bu olay da **düzleştirme** (polishing) olarak adlandırılır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: DNA polimeraz I enziminin polimeraz ve ekzonükleaz aktiviteleri.

Isı dayanıklı DNA polimerazlar hiper termofil organizmalardan elde edilir ve polimeraz zincir reaksiyonunda (PZR'de) kullanılır. PZR işlemlerinde ilk kullanılan ısı dayanıklı DNA polimeraz *Thermus aquaticus*'un DNA polimerazı (*Taq* DNA polimeraz) olup optimum reaksiyon sıcaklığı 75-80°C arasındadır.

Viral DNA polimerazlar konak DNA polimerazının yokluğunda viral DNA'nın replikasyonunda görev alırlar. T4 DNA polimeraz özellikle 3'-5' ekzonükleaz aktivitesi bakımından çok daha etkilidir (Klenow fragmentinden 200 kat) ve bu nedenle 3' yapışkan uçların düzleştirilmesinde yaygın olarak kullanılır. Ayrıca DNA dizileme işlemlerinde de kullanılmaktadır.

2. **RNA bağımlı DNA polimerazlar (Ters transkriptazlar):** Ters transkriptaz veya revers transkriptaz (RTaz) olarak da bilinen bu enzim bazı virüslerde (retrovirus gibi) RNA genomu DNA'ya dönüştüren enzimdir. RNA zinciri kalıp olarak kullanılarak komplementer bir DNA molekülü sentezlenir. Sentez mekanizması DNA polimerazlarındaki gibidir. Bu enzimler RNA'dan DNA sentezlemeyi gerektiren cDNA klonlama gibi işlemlerde kullanılır. Ayrıca RNA dizileme işlemlerinde de kullanılır. Bu enzimler 3'-5' ekzonükleaz aktiviteleri olmadığı için hata düzeltme fonksiyonunu yürütemezler ve yaklaşık her 500 bazda bir hata yapmaktadır. Bu enzim kullanılarak yapılacak gen klonlamalarda yüksek mutasyon oranları dikkate alınmalıdır.

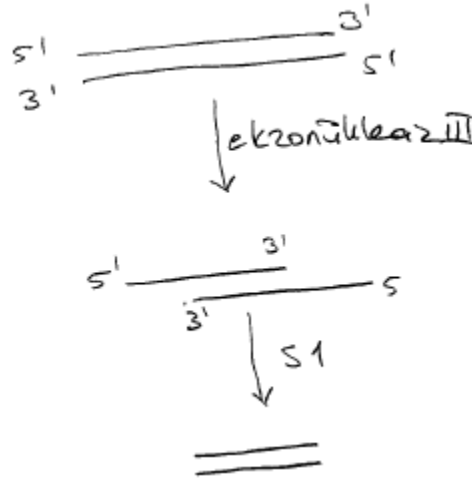
3. **DNA bağımlı RNA polimerazlar (RNA polimerazlar):** Bir DNA zincirinin RNA komplementerini sentezleyen enzimlerdir. Viral RNA polimerazlar konak hücre RNA polimerazını inhibe ederek hücre kaynaklarının viral RNA polimeraz tarafından kullanılmasını sağlar. T3, T7 ve SP6 gibi virüslere ait viral

RNA polimerazlar özel konak hücreler içinde hedef bir proteinin büyük ölçekli sentezlenmesi amacı ile kullanılır.

4. **Kalıp bağımsız polimerazlar:** Bazı enzimler bir kalıp olmaksızın bir DNA zincirinin 3' ucuna bir veya daha çok nükleotit bağlayabilir. Bunlardan bir tanesi sıgır timuslarından elde edilen **terminal transferaz**dır. Bu enzim mevcut bir DNA molekülünün 3' ucuna çok sayıda nükleotit eklemek için kullanılır. Bu enzim cDNA sentezi sırasında ve kör uçlu fragmentlerin uçlarının yapışkan hale getirilmesinde kullanılır. Bir diğer enzim *Taq* DNA polimeraz PZR ürünü olan DNA moleküllerinin 3' ucuna bir adet dA ekler. Bu işlem PZR klonlamada verimli bir ligasyonun oluşmasına katkı sağlar.

2.2.3 Ekzonükleazlar

Ekzonükleazlar DNA ve RNA moleküllerini uç kısımlardan yıkarak kısaltan enzimlerdir. Bu enzimlerin farklı tipleri vardır ve biri veya birden fazlası hedef DNA fragmentinin kısaltılmasında kullanılır. Bunlardan bazıları zincirleri kısaltmak için ayrı ayrı kullanılır. Ekzonükleaz III çift zincirli DNA üzerinde 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahiptir. DNA molekülünü her iki uçtan 3'-5' yönünde yıkar, her iki ucta karşı zincir (5'-3') tek zincirli halde kalır. Sonra bu zincirler sadece tek zinciri 5' ucundan yıkan tek zinciri yıkmak için spesifik olan S1 nükleaz ile muamele edilerek yıkılır ve sonuçta DNA kısaltılmış olur (Şekil 2.3). Diğer bazı ekzonükleazlar da DNA kısaltmak için kullanılmaktadır.



Şekil 2.3: Ekzonükleaz III ve ekzonükleaz S1 enzimlerinin DNA kısaltılmasında kullanımı.

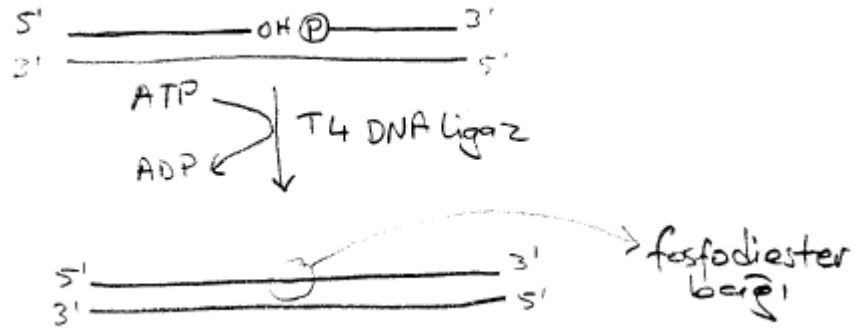
2.3 DNA moleküllerini birleştiren enzimler

Bir grup enzim iki DNA molekülünü birleştirirler bunlar arasında en yaygın kullanılanı DNA ligaz enzimidir. DNA ligaz DNA replikasyonu sırasında oluşan Okazaki fragmentlerini birbirine bağlar ve DNA'nın hasar gördüğü kırık bölgelerde zincirleri birbirine bağlar. Daha etkili bir ligasyon gerçekleştirdiği için T4 virüsünün DNA ligazı daha yaygın olarak kullanılır. Ancak buna ilave olarak topoizomerazlar, transpozazlar ve rekombinazlar da iki DNA molekülünü birleştirmek üzere kullanılabilen enzimlerdir.

2.3.1 DNA ligaz

T4 DNA ligaz T4 virüsü tarafından enfekte edilmiş *E. coli* hücreleri içinde virüse ait bir gen tarafından sentezlenir. Hem kör uç ve hem de yapışkan uçlu DNA moleküllerinin ligasyonunda (birbirine bağlanmasında) etkili bir şekilde kullanılır. Birleştirilecek moleküllerde 3' OH ve 5' fosfat grupları arasında fosfodiester bağı oluşturur (Şekil 2.4). Reaksiyon için ATP'ye ihtiyaç duyar. Bu enzim rutin ligasyon işlemlerinde çoğunlukla tercih edilen ligazdır. *E. coli*'nin DNA ligazı kör uç ligasyonlarını ya hiç gerçekleştiremez ya da nadiren gerçekleştirir. Bu nedenle kör uç ligasyonunun istenmediği

durumlarda *E. coli* DNA ligazı tercih edilebilir. Ligasyon mekanizması T4 DNA ligaz ile aynıdır. DNA ligaz klonlama sırasında vektör ile hedef DNA molekülünün bağlanmasında ve herhangi iki DNA molekülünün bağlanmasında kullanılır.



Şekil 2.4: T4 DNA ligaz enziminin iki DNA zincirini bağlama mekanizması.

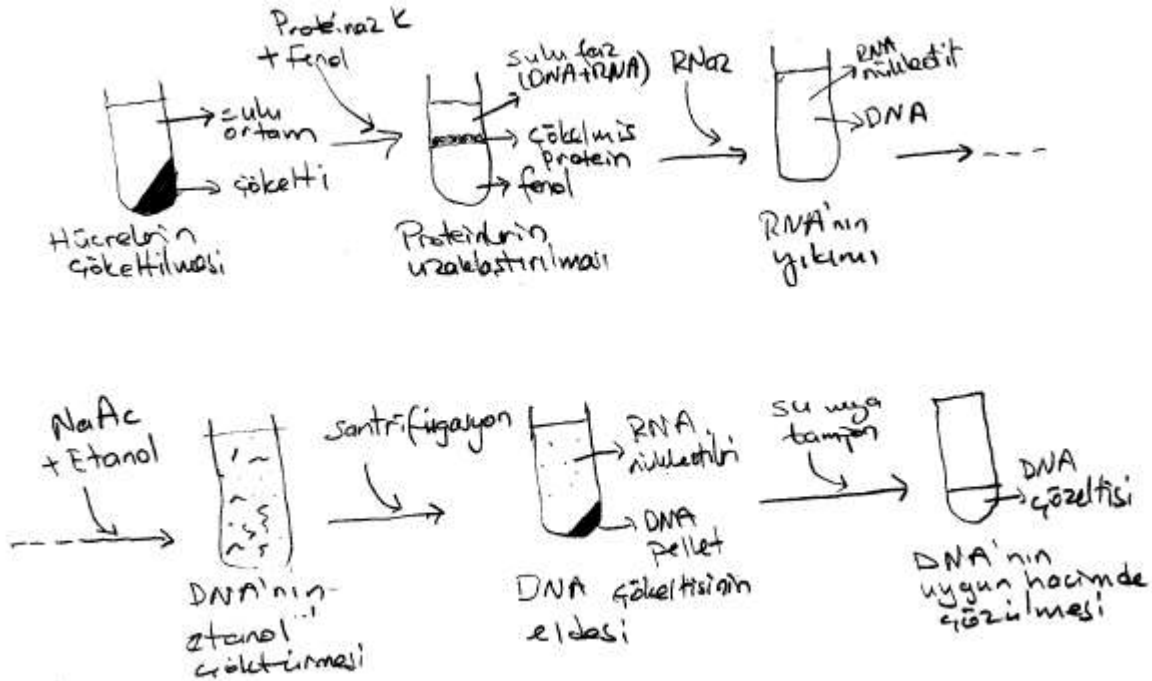
3 Gen Klonlamada Kullanılan Temel Teknikler

Gen klonlama ve manipölasyon işlemleri sırasında bir çok teknik uygulanmaktadır. Bu nedenledir ki moleküler biyolojinin bu alanına rekombinant DNA teknolojisi denmektedir. Bu tekniklerin bir kısmı ilgili konuların içinde açıklanacaktır. Bu bölümde en temel teknikler kısaca özetlenecektir. Bunlardan bazıları şunlardır: DNA izolasyonu, elektroforez ve DNA görüntüleme, enzimatik kesim gibi.

3.1 DNA izolasyonu

Gen klonlamada temel materyal olan DNA'nın öncelikle saf bir şekilde izole edilmesi gerekir. Ayrıca farklı tip DNA moleküllerinin izolasyonuna ihtiyaç vardır: genomik DNA, plazmit DNA ve viral DNA gibi. Her bir DNA tipine ve saflaştırılacak miktara göre farklı DNA izolasyon metodları mevcuttur. Burada genomik DNA, toplam DNA ve plazmit DNA izolasyonlarının temel basamakları açıklanacaktır.

Genomik DNA izole edebilmek için öncelikle bu DNA'yı taşıyan hücrelerden oluşmuş bir canlı kütlelerine ihtiyaç vardır. Bir bakteriden DNA izole edilecekse öncelikle bakteri uygun koşullarda üretilmeli ve santrifüjasyon veya filtrasyon yöntemleriyle hücreler gelişme ortamından ayrılarak hasat edilmelidir. Hasat edilmiş bu bakteri kütlesi DNA kaynağı olarak kullanılır. Makroorganizmalardan (hayvan ve bitkilerden) DNA izolasyonu yapılacaksa uygun dokulardan uygun miktarlarda temin edilmelidir. Bitkiler için bu doku yaprak, gövde sürgünü veya kök uçları gibi bitki kısımları olabilir. Hayvanlarda ise ideal olarak kan, dalak veya karaciğer dokuları tercih edilir ancak çekirdeği bulunan herhangi bir hücre tipi de DNA izolasyonu için kullanılabilir. Şekil 3.1'de bir bakteri kültüründen toplam DNA izolasyonunun ana basamakları özetlenmiştir.



Şekil 3.1: Bir bakteri kültüründen toplam DNA izolasyonunun ana basamakları.

DNA izolasyonunun ilk basamağı canlı dokuyu uygun bir tampon içerisinde parçalamaktır. Bitki ve hayvan hücreleri nispeten daha büyük ve daha zayıf yapılı olduklarından doğrudan bir tampon içinde kendiliğinden parçalanabilir veya sıvı azot içinde dondurduktan sonra ezerek hücreler kırılabilir. Ayrıca enzimatik işlemlerle de hücre duvarı ve zarı yıkılabilir. Bitki hücrelerinde biriktirilen bazı sekonder metabolitler hücre parçalandıktan sonra DNA'ya hasar verdiği için hücreler yıkılmadan önce

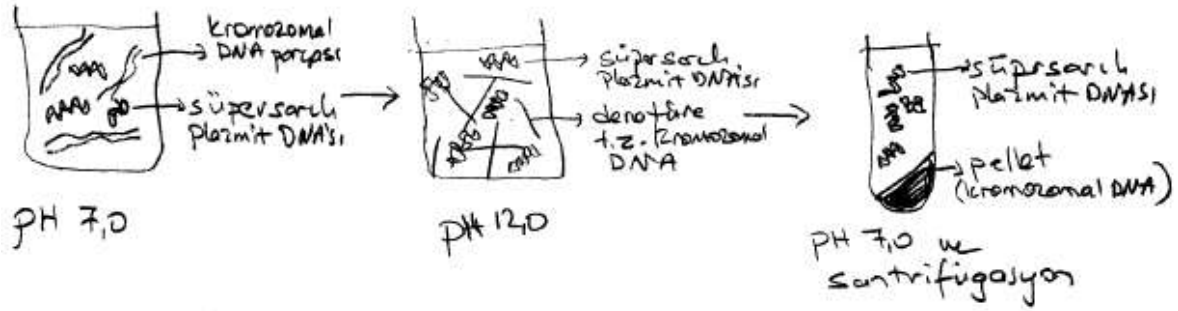
ilave önlemlerin alınması gerekebilir. Bakteri hücrelerinin çok küçük olması ve hücre duvarlarının da çok güçlü olması parçalanmalarını zorlaştırır. Bu nedenle bakteri hücrelerini yıkmak için enzimatik bir yöntem tercih edilir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan enzim **lizozim**dir, özel olarak hücre duvarının peptidoglikan tabakasını yıkar. Ayrıca küçük cam parçacıklarının (200 µm) mevcudiyetinde vortekslenerek de peptidoglikan tabakaları yıkılabilmektedir.

Bir şekilde hücre duvarı ve/veya zarı yıkıldıktan sonra hücre içeriği tampon içine karışık bir şekilde bulunur. Bu karışıma **hücre özütü** denir. Hücre özütü içinde büyük hücre duvarı parçaları proteinler, RNA ve DNA bulunur. DNA izolasyonunda temel hedef bu karışımdan DNA dışındaki diğer bileşenleri uzaklaştırmaktır.

1. Bunun için öncelikle 100 000 x g gibi bir hızda santrifügasyon ile büyük hücre parçalarının dibe çökmesi sağlanır. Karışımın sıvı kısmı (süpernatant) protein, RNA ve DNA içerecektir.
2. Süpernatant içindeki proteinleri uzaklaştırmak için proteinaz enzimi eklenir ve kompleks halindeki proteinlerin daha küçük polipeptitlere yıkılması sağlanır. Takiben ortama fenol eklenir. Fenol proteinlerin çökmesini sağlar. Fenol süpernatant içine eklenip karıştırıldıktan sonra santrifügasyonla fenol ve sulu fazların ayrılması sağlanır. Bu iki fazlı safhada proteinler alttaki fenol fazı ile üsteki sulu süpernatantın birleşme zonuna çöker. Üstteki sulu faz DNA ve RNA içerir.
3. RNA ve DNA içeren sulu faz dikkatlice alınarak yeni bir tüpe konur ve karışıma RNaz enzimi eklenir. Bu enzim RNA'ları nükleotit birimlerine yıkarken DNA bütün olarak kalır.
4. DNA içeren bu faza tek değerlikli iyonlar ve alkol eklendiğinde DNA çökerken RNA nükleotitleri sıvı içinde kalır. 15 000 x g gibi bir hızda santrifügasyon sonrasında DNA tüpün dibinde çökecektir. Sıvı kısım uzaklaştırıldıktan sonra DNA çökeltisi uygun hacimde tampon içinde çözülür.

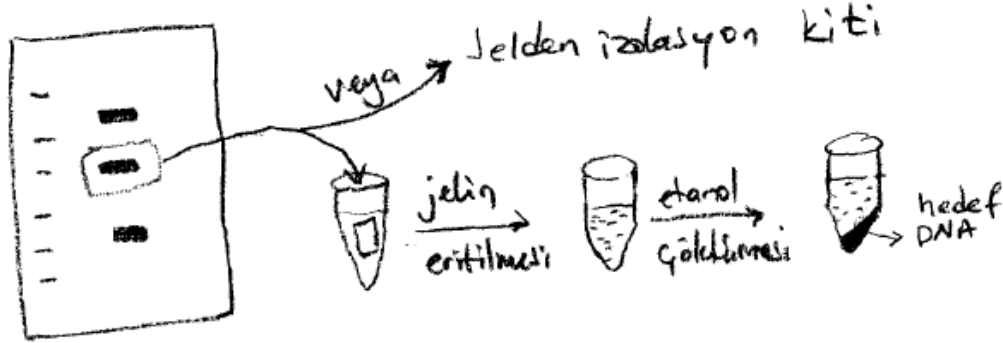
Değişik amaçlar için farklı metotlar uygulanarak DNA izolasyonu yapılabilir. Rekombinant DNA işlemlerinde genomik DNA, plazmit DNA'sı, viral DNA veya belli büyüklükte DNA fragmentlerinin izolasyonu gerekebilir. İzole edilecek DNA tipine göre özel bir strateji uygulanması gerekir. Sözgelimi bir bakteri kültüründen bir plazmit orijinli vektör DNA izolasyonu yapılacaksa DNA izolasyonunda büyüklüğü veya konformasyonu esas alan bir strateji uygulanması gerekir. Ya bakteriye ait kromozomal DNA'yı uzaklaştırıcı bir işlem yapılmalı ya da belli tampon şartlarında süper sarılı kalan ve kalmayan DNA'nın ayırt edilmesini sağlayan bir yöntem uygulanmalıdır. Büyüklük farkına dayalı bir izolasyon için gradyent santrifügasyon tekniği kullanılabilir. Bu yöntemde yoğunluk gradyenti olan bir santrifüj tüpünün üst kısmına hücre özütü eklenir. Yüksek hızda (100 000 x g) santrifügasyon sonrasında tüpün dibinden üst kısmına doğru moleküllerin bulunma sırası şöyledir: RNA, plazmit DNA'sı ve kromozomal DNA.

Konformasyona dayalı izolasyon için kullanılan tekniklerden biri de alkali lizis tekniğidir (Şekil 3.2). Bu tekniğin temeli doğrusal DNA'nın yüksek pH ortamında (pH 12) denatüre olması, süpersarılı DNA'nın ise denatüre olmaması esasına dayanır. Hücreler nötral pH'da parçalandıktan sonra özüt yüksek pH'ya çıkarılır. Bu şartlar altında nispeten büyük parçalar halindeki kromozomal DNA denatüre olur ancak plazmit DNA'sı hala süper sarılıdır. Bu aşamada pH hızla nöral değere indirilir, bu sırada denatüre haldeki DNA düzgün bir şekilde renatüre olmak için yeterli süre bulamaz ve rasgele çapraz eşleşmelerle bir kütle haline gelir, plazmit DNA'sı hala süper sarılı şekilde çözelti içindedir. Bu aşamada gerçekleştirilen santrifügasyon sırasında genomik DNA büyük hücre parçalarıyla beraber dibe çökerken plazmit DNA'sı çözelti içinde kalır. Bu süpernatant içinde sadece plazmit DNA'sı mevcuttur. Proteinler ve RNA uzaklaştırıldıktan sonra bu DNA çökeltiyle saf plazmit DNA'sı elde edilir.



Şekil 3.2: Bakteri hücrelerinden alkali lizis yöntemiyle plazmit DNA izolasyonu.

Bazı durumlarda restriksiyon endonükleazlarla veya diğer endonükleazlarla kesilmiş ya da sonikasyon gibi fiziksel yöntemlerle parçalanmış bir DNA fragmentlerinin karışımından belli büyüklükteki DNA fregmentlerinin saflaştırılmasına ihtiyaç duyulabilir. Bu durumda hazırlanmış DNA fragment karışımı agaroz jelde elektroforetik olarak yürütülerek birbirinden ayrılması sağlanır (bakınız Bölüm 3.2). Sonra bir transillüminatör üzerinde hedef fragmentin bulunduğu bölge jelden kesilerek bie ependorf tüpe alınır (Şekil 3.3). Jel kitlesi enzimatik veya diğer yöntemlerle çözülür. Böylece DNA bir tampon içinde serbest kalır. Bu durumda tampon içindeki DNA etanol çöktürmesi uygulanarak çöktürülür ve istenen hacimde çözülür. Ayrıca ticari olarak sağlanan jelden DNA izolasyon kitleri kullanarak hedef DNA fragmenti jel kütesinden izole edilebilir.



Şekil 3.3: Agaroz jelden belli büyüklükteki DNA fragmentlerinin saflaştırılması.

Ayrıca farklı tip DNA izolasyonu için farklı ticari kitler kullanarak da izolasyon yapmak mümkündür. Kromozomal DNA, toplam DNA, plazmit DNA'sı, bakteriyel kromozomal DNA, bitkisel kromozomal DNA, PCR fragment DNA'sı gibi farklı DNA'lar için özel izolasyon kitleri mevcuttur. Hangi yöntem uygulanırsa uygulansın DNA izolasyonunda temel basamaklar aynıdır: Hücrenin parçalanması, DNA dışındaki diğer kütle ve moleküllerin uzaklaştırılması ve DNA çözeltisinin yoğunlaştırılması.

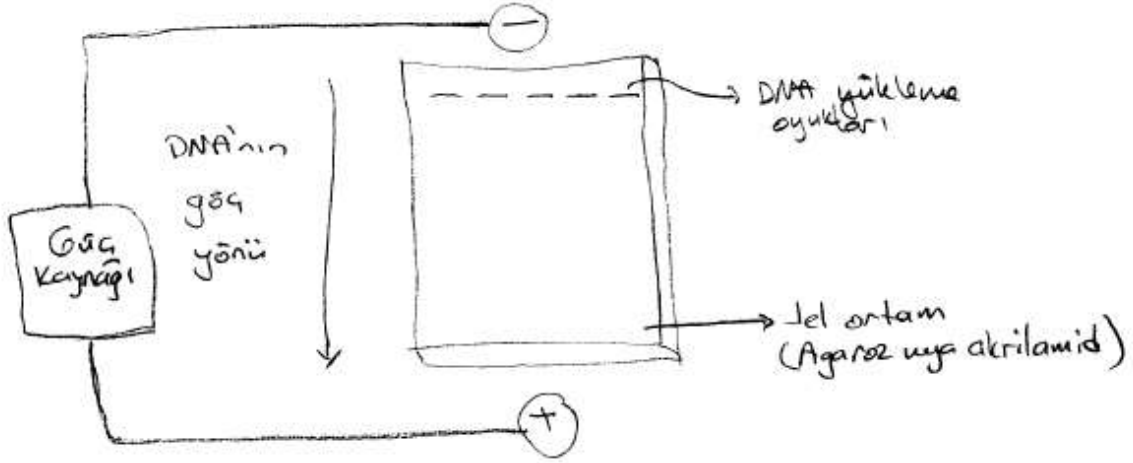
3.2 Jel elektroforez ve DNA görüntüleme

Elektroforez bir elektrik alanın etkisi altında yüklü moleküllerin göçüdür. Farklı büyüklükteki DNA fragmentlerinin ayrılması için çoğu durumda elektroforez tekniği kullanılır. Bir elektrik alanın negatif kutbuna yakın bir pozisyona yerleştirildiğinde DNA molekülleri, pozitif kutba doğru göç ederler. Belli bir süre sonunda elektroforez ortamında aynı veya benzer büyüklüğe sahip DNA molekülleri bir arada bulunur. Aynı veya benzer büyüklükteki her bir DNA bölgesi pratikte DNA bandı olarak da adlandırılır.

DNA elektroforezi için genellikle jel ortamlar kullanılır. Rekombinant DNA işlemlerinde jel ortam oluşturmak için genellikle agaroz ve özel durumlarda da akrilamid kullanılır. Agaroz nispeten

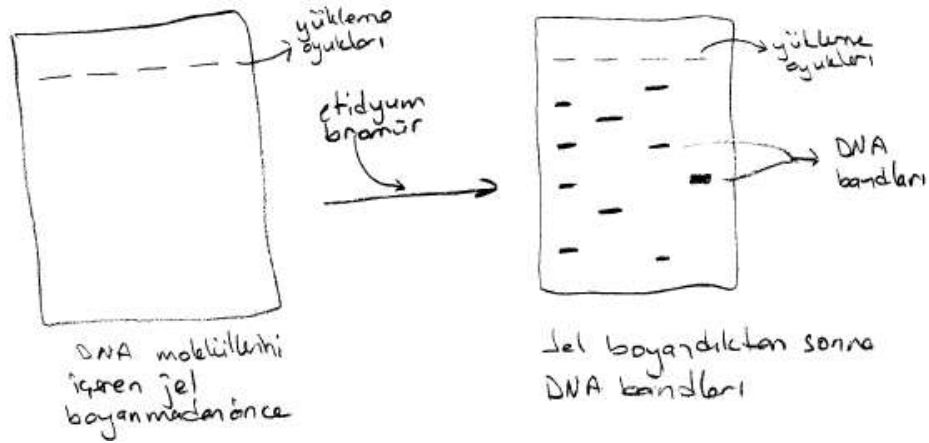
daha gevşek ortamlar oluşturur ve nispeten büyük DNA fragmentlerinin ayırımında kullanılır. Akrilamid jeller ise daha sıkı jel ortamlar oluşturur ve birbirinden tek bir nükleotit kadar farklı büyüklükte olan DNA fragmentlerini dahi ayırma gücüne sahiptir. Agaroz jeller büyüklük farkları fazla olan DNA moleküllerini ayırt etmek için yaygın kullanılan yöntemdir. Akrilamid jeller ise büyüklükleri birbirine çok yakın olan fragmentlerin ayrılmasında ve DNA dizileme işlemlerinde kullanılır.

Bir jel bir elektroforez tankı içine yerleştirilir ve elektrik iletkenliğini sağlayan bir tampon ile doldurulur. Jelin elektroforez tankının negatif kutbuna yakın ucundaki oyuklara DNA çözeltisi yüklenir. DNA molekülleri çözelti içinde negatif yüklü olduklarından bir elektroforez ortamında pozitif kutba doğru hareket ederler (Şekil 3.4). Eğer elektroforetik ortam bir jel kütlesi ile geçişi zorlaştırılmış dar porlardan oluşmakta ise DNA molekülleri ilerlerken porların duvarlarıyla sürtünerek yavaşlar. Molekül ne kadar büyükse sürtünme o kadar fazla ve molekülün hızı da o kadar yavaş olacaktır. Dolayısıyla farklı büyüklüklere sahip DNA molekülleri elektroforetik jel ortamına aynı noktadan yüklenirse küçük moleküller daha hızlı ilerlerken büyük moleküller daha yavaş ilerleyebilecektir. Belli bir elektroforez süresinin sonunda DNA fragmentleri büyüklüklerine göre jel içerisinde ayrı gruplar şeklinde ayrışacaktır (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Bir DNA jel elektroforez düzeneği.

Agaroz jelin yoğunluğu arttıkça oluşacak porların çapı da daralacaktır. Buna bağlı olarak moleküllerin hızı da yavaşlayacaktır. Rekombinant DNA laboratuvarlarında 250 bp ile 5 kb arasındaki büyüklüklere sahip DNA moleküllerini ayırt etmek için %0.7'lik agaroz jeller kullanılır. Daha küçük fragmentleri ayırt etmek için daha yoğun (%1, %1.5, %2, %3 ... gibi) agaroz jeller kullanılır. Jel yoğunluğu arttıkça DNA moleküllerinin hızı azalır ve DNA moleküllerini içeren her bir DNA bandının sınırları netleşir. Elektroforez ile ayrılmış fragmentler etidyum bromür gibi floresan bir madde ile jelin boyanması sonrasında bir transillüminatör üzerinde görüntülenebilir. Bu görüntülerin fotoğrafı çekilerek ilgili DNA moleküllerinin oluşturduğu bandlar gözlemlenebilir (Şekil 3.5).

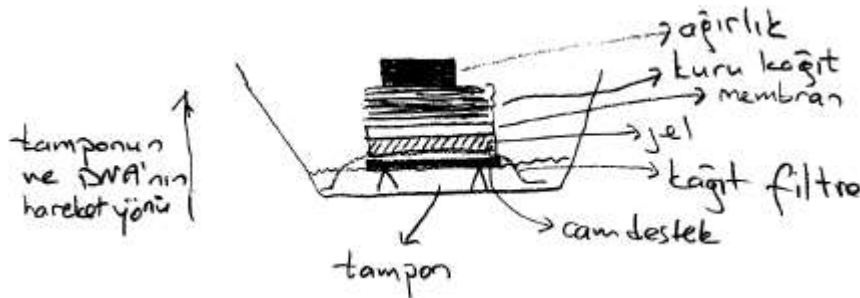


Şekil 3.5: DNA elektroforezden sonra bir boyanmamış ve bir de etidyum bromür gibi bir DNA boyası ile boyanmış jelin görüntüsü.

3.3 Jelden filtrelere DNA transferi (Southern blotlama)

Agaroz jellerde DNA molekülleri sadece kapiller çeperlerle fiziksel etkileşimin bir sonucu olarak sabit kalır. Bu zayıf bir tutunma olduğu için ilave işlemler yapmak gerektiğinde DNA jelden ayrılır. Eğer DNA bantları bulundukları noktada sabitlenmek isteniyorsa moleküller bulundukları yüzeye kovalent olarak bağlanmalıdır. Bu şekilde DNA'yı şeker-fosfat omurgalarından kovalent olarak bağlayarak sabitlemek için naylon veya nitroselüloz membranlar kullanılır. Bu membranların yüzeyi ile DNA'nın şeker fosfat omurgası arasında özel şartlar sağlanırsa kovalent bağlar oluşur. Bu şekilde membran üzerinde bulunduğu yere sabitlenen DNA molekülleri denaturasyon ve renaturasyon özelliklerini kaybetmezler. Bu şekilde sabitlenmiş bu DNA molekülleriyle homolog DNA'lar arasında hala hibritleşme mümkün olur. Böylece elektroforetik olarak ayrılmış olan bantlar ile problemler arasındaki olası hibritleşmeler test edilebilir. Bir jelden bir membran yüzeyine DNA transferi işlemlerine **Southern blotlama** denir. Bu yöntem ile DNA fragmentleri konumları değişmeden membran yüzeylere transfer edilir. Konumu değişmeden transfer edilen DNA ile membran arasında, membranın kısa süre (10-15 sn) u.v. ışık altında tutulmasıyla ya da 80°C'de 30 dk ısıtılmasıyla kovalent bağların oluşması sağlanır. Bu aşamadan sonra spesifik problemlerle membran yüzeyine bağlı DNA'nın hibritleşip hibritleşmediği belirlenebilir.

Bir Southern blotlama düzeneğinin en dibine bir dayanak üzerine bir kağıt filtre yerleştirilir ve üzerine elektroforez yapılmış jel yerleştirilir (Şekil 3.6). Southern blotlama kabının dip kısmındaki sulu tampon kağıt filtre içinden üst kısımlardaki kuru bölgeye doğru geçerken jelin içindeki DNA'yı da taşıır. DNA jelden çıkabilir ancak membran üzerindeki porlar yeterince geniş olmadığı için DNA membran yüzeyinde kalır. Yeterince süre transfer edildikten sonra membran düzeneğinden çıkarılarak DNA sabitlenir.



Şekil 3.6: Bir Southern blotlama düzeneği.

3.4 DNA çözeltilerine enzimatik işlemlerin uygulanması

Rekombinant DNA işlemleri sırasında DNA'nın parçalanması, birleştirilmesi ve modifikasyonu için birçok enzimatik işlem uygulanır. Bunlardan en yaygınları şunlardır: Restriksiyon endonükleaz kesimi, ligasyon, fosforilasyon, defosforilasyon, polimerleştirme gibi.

Rekombinant DNA işlemlerinde küçük miktarlarda enzim kullanılır. Enzimin üreticisine ve katalizlediği reaksiyona göre birim hacimdeki farklı miktardaki aktiviteler ünite şeklinde ölçülür. Belli miktardaki bir DNA reaksiyonunu katalizlemek için önerilen miktarda enzim ünitesini kullanmak gerekir. Sözgelimi 10 µg DNA'nın *EcoRI* restriksiyon endonükleaz ile kesebilmek için 5 ünite enzime ihtiyaç duyuluyor olabilir. Enzim ile beraber genellikle gerekli tampon ve ilave ajanlar sağlanmaktadır. Tipik bir 10 µl hacimli restriksiyon endonükleaz reaksiyon karışımı şöyle olabilir:

DNA (2 µg/µl).....	5 µl
<i>EcoRI</i> reaksiyon tamponu (10x)....	1 µl
Saf su.....	3 µl
<i>EcoRI</i> enzimi (5 ünite/µl).....	1 µl

Reaksiyon karışımına en son enzimin eklenmesi enzimin optimum şartlara maruz kalmasını sağlayacaktır. Ayrıca enzim için uygun sıcaklığın sağlanması gerekir (25°C, 37°C, 65°C gibi). Bu şartlarda reaksiyon tavsiye edilen sürece boyunca (30 dk, 1 saat gibi) devam ettirilir. Çoğu durumda reaksiyon süresi sonunda reaksiyon karışımına uygulanacak sonraki basamağa geçilebilir. Ancak bazı enzim reaksiyonlarının sürenin sonunda kimyasal veya fiziksel yöntemlerle sonlandırması gerekebilir.

4 Gen Klonlamada Kullanılan Vektörler

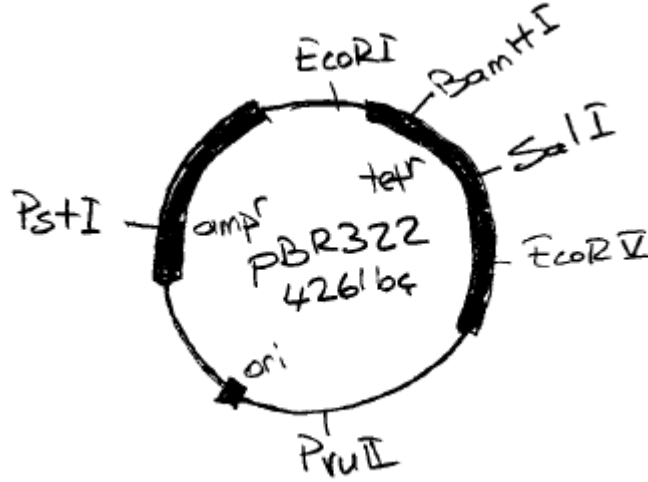
Vektör bir konak hücreye transfer edilmek üzere yabancı DNA'nın bağlandığı otonom olarak replike olabilen bir DNA molekülüdür. Vektörler klonlama, manipülasyon, integrasyon veya ekspresyon gibi amaçlar için geliştirilmişlerdir. Genellikle doğal plazmit veya virüslerin manipüle edilerek kullanışlı hale getirilmiş şekilleridir. Vektörlerin bazı temel özellikleri taşıması gerekir. Bunlardan başlıcaları şunlardır:

1. **Bir replikasyon orijinine sahip olmalıdır.** Bu sayede vektör ve taşıdığı hedef DNA molekülü konak hücre içinde replike edilerek oluşacak yeni hücrelere yeterli sayıda vektör molekülünün geçmesi sağlanır. Replikasyon orijinleri genellikle türe özgü olduğu için bir plazmit veya viral kökenli vektör transfer edileceği konak hücreye uygun bir replikasyon orijini dizisine sahip olmalıdır.
2. **Seçilebilir bir genetik belirteç (marker) taşımalıdır.** Vektör taşıyan ve taşımayan konak hücreleri ayırt edebilmek için takip edilebilir bir fenotip (belirteç) gereklidir. Bu fenotipleri (belirteçleri) kodlayan gen bölgeleri plazmit üzerinde bulunmalıdır. Tipik belirteçler arasında antibiyotik direnç genleri ve diğer bazı metabolizma genleri sayılabilir. Sözelimi ampisilin direnç geni (*amp^r* veya *bla*) ve beta galaktosidaz geni (*lacZ*) gibi.
3. **Kullanışlı restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri.** Vektör üzerinde uygun pozisyonlarda farklı tip restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizisinin olması gerekir. Bu tanıma dizilerinden vektör kesilir ve aynı enzimle kesilmiş hedef DNA molekülleri bu bölgeden vektöre bağlanır. Bu tanıma dizilerinin vektör üzerinde tek bir defa temsil edilmesi önemlidir, birden fazla defa temsil edilirse plazmit birden fazla parçaya bölünecek ve çoğu durumda kullanılmaz hale gelecektir. Ayrıca bu tanıma dizileri replikasyon orijini ve belirteç gen bölgeleri içinden keserlerse plazmit bu özelliklerini kaybedecektir.
4. **Kullanışlı bir büyüklüğe sahip olmalıdırlar.** Büyük DNA moleküllerinin *in vitro*'da kullanımı ve manipülasyonu oldukça zordur ve konak hücre içindeki stabilitesi zayıftır. Bu nedenle vektör molekülleri mümkün olduğunca küçük moleküller olmalıdır. Klonlamada konak hücre olarak *E. coli* hücreleri yaygın bir şekilde kullanılır. Bu hücreler içinde vektörler içine bağlanmış 10 kb'dan büyük DNA'ların stabilitesi zayıftır. Dolayısıyla klonlama vektörleri 10 kb'dan küçük tercihen 5 kb ve daha küçük DNA molekülleri olmalıdırlar.
5. **Yüksek kopya sayısına sahip olmalıdırlar.** Bir plazmit için kopya sayısı bir hücrede temsil edildiği sayının hücrenin kromozom sayısına oranıdır. Bakteri hücreleri haploit olduğundan teorik olarak her hücrede tek bir kromozom vardır. Bu durumda prokaryotik bir hücredeki plazmit sayısı doğrudan kopya sayısı olarak kabul edilebilir. Bir vektörün kopya sayısının fazla olması bir hücrede hedef DNA sayısının da o kadar fazla olacağı anlamına gelir. Yani tek kopya olarak konak hücreye transfer edilen bir hedef DNA vektörün kopya sayısı kadar çoğaltılmış olur.

Klasik klonlama vektörlerine iki grup plazmit orijinli vektör örnek verilebilir: pBR serisi vektörler ve pUC serisi vektörler. Vektörlerin isimlerinin başındaki bir küçük "p" harfi vektörün orijinin plazmit olduğunu gösterir, takip eden büyük harfler ve rakamlar ise o vektörü geliştirenler tarafından verilen isimdir. Bu harfler ya araştırmacıların isminden ya da araştırmacının yapıldığı kurumun isminden türetilmiştir. BR harfleri pBR322 vektörünü tasarlayan araştırmacıların soy isimlerinin ilk harfidir. UC is pUC serisi vektörlerin geliştirildiği Kaliforniya Üniversitesi'nin adının ilk harfleridir.

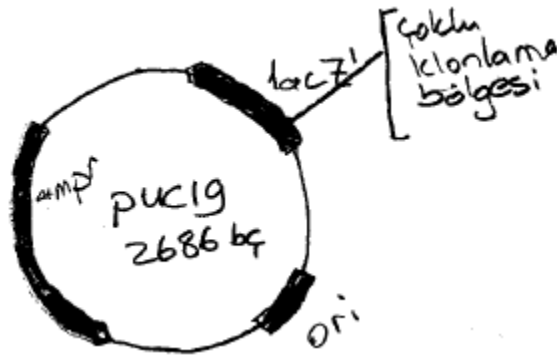
pBR322, 4261 bp büyüklüğünde bir plazmit vektörüdür (Şekil 4.1). Bir replikasyon orijini mevcuttur. Ampisilin ve tetrasiklin direnç genleri olmak üzere iki adet genetik belirtece sahiptir. Ayrıca plazmit üzerinde farklı pozisyonlarda konumlanmış restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri

vardır. Bu dizilerden üçü *EcoRV*, *BamHI* ve *SalI* tetrasiklin geni içinde, biri *PstI* ampisilin geni içinde ve ikisi *EcoRI* ve *HindIII* de iki belirteç arasında konumlanmışlardır. Bu tanıma dizileri uygun restriksiyon endonükleazla kesilerek aynı enzimlerle kesilmiş hedef DNA fragmentlerini bağlamak üzere kullanılır. Hedef genin (DNA'nın) hangi pozisyona bağlandığına bağlı olarak vektör tarafından sağlanacak fenotipler değişiklik gösterecektir. Bu pozisyonların seçileceği klonlama işlemlerinde önemli olup ilerleyen konularda açıklama yapılacaktır.

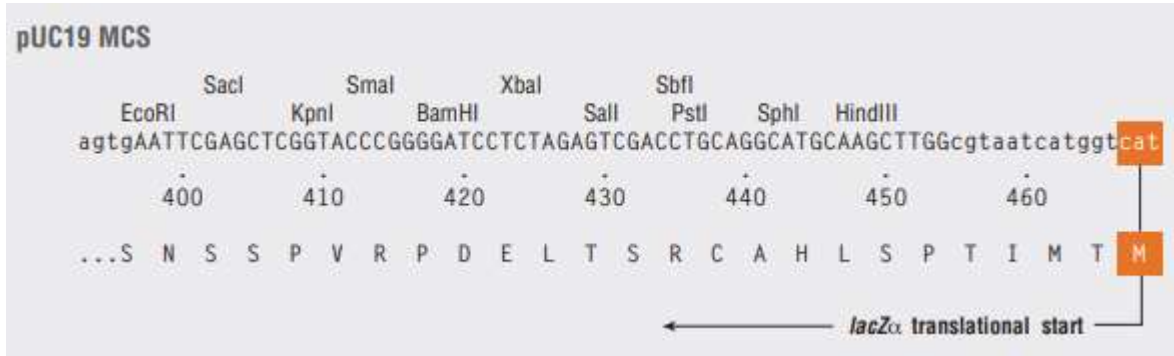


Şekil 4.1: *E. coli* klonlama vektörü pBR322'nin fiziksel haritası.

pUC19, 2686 bp büyüklüğünde bir plazmit vektörüdür (Şekil 4.2). Bir replikasyon orijinine sahiptir. İki genetik belirteç geni taşır. Bunlardan biri ampisilin direnç genidir. Diğer belirteç gen bir metabolizma genidir: β -galatosisidaz enziminin α domanini kodlayan gen gölgesidir (*lacZ'*). Bu genin (*lacZ'*) başlangıcına yakın bölgede genin ekspresyonuna etki etmeyen bir polilinker bölge vardır (Şekil 4.3). Bu bölge yaklaşık 50 bp büyüklüğünde bir DNA bölgesi olup 20 civarında farklı restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizisini taşır. Bu enzimlerden herhangi biri hedef DNA'yı bağlamak üzere kullanılabilir. Bu gölgeye bir DNA bağlandığında *lacZ'* geni mutasyona uğrar (*lacZ'*) ve fenotip değişir: yabani tip vektör laktozu parçalarken mutant yani hedef DNA'yı taşıyan rekombinant vektör laktozu parçalayamaz. Vektörün bu fenotipik değişkenliği de klonlama basamaklarında doğru vektörlerin seçiminde kolaylık sağlar.



Şekil 4.2: *E. coli* klonlama vektörü pUC19'un fiziksel haritası.



Şekil 4.3:pUC19 vektörünün çoklu klonlama bölgesi ve restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi pozisyonları.

Rutin klonlama vektörleri 10 kb'dan daha küçük DNA moleküllerinin klonlanması için kullanışlıdır. Daha büyük DNA bölgelerinin klonlanması için diğer vektör tipleri de geliştirilmiştir. Bunlar arasında bakteriyofaj vektörleri, cosmid ve fajmid gibi faj-plazmit hibrit vektörleri vardır ve bu vektörlere 40 kb civarında DNA'nın klonlanması mümkündür. Diğer bir yüksek kapasiteli hibrit vektör olan bakteri yapay kromozomu (BAC) vektörleriyle 100-300 kb DNA klonlanabilmektedir.

E.coli dışında diğer bakteriler için de vektörler vardır. Ancak bunların klonlama amacıyla kullanımı sınırlıdır. Yine funguslar, bitkiler ve hayvanlar için vektörler oluşturulmuşsa da bu vektörler gen klonlama amacıyla değil ya gen transferi için veya hedef genlerin ekspresyonu için geliştirilmiş vektörlerdir.

5 Rekombinant DNA Teknolojisinde Konak Sistemleri

Yabani tip veya rekombinant vektörlerin replikasyonu özel hücreler içinde gerçekleştirilir, bu sayede vektörler uzun süre korunabilir ve hücrenin replikasyon enzimleriyle sayıları artırılır. Vektörlerin ve rekombinant vektörlerin otonom olarak replike olmasını ve taşıdıkları genlerin ekspresyonunu sağlayan kullanışlı hücrelere **konak hücre** denir. Rekombinant DNA işlemlerinde bazı istisnalar dışında kullanılan en yaygın konak hücreler *E. coli* hücreleridir. Kolay ve hızlı üretilmesi, genetik yapısının iyi bilinmesi ve patojen olmamaları gibi genel özelliklerinin dışında konak hücreler diğer bazı özelliklere sahip olmalıdır.

1. **Etkili bir şekilde transforme edilebilmelidir.** Transformasyonun etkinliği iki özelliğe bağlıdır. Bu özelliklerden biri DNA'yı hücre içine etkili bir şekilde alabilme özelliğidir. Bu mekanizma tam olarak açıklanabilmiş değildir. Transformasyonun etkinliğini belirleyen ana özellik içsel bir DNA-yıkım sisteminin varlığı veya yokluğudur. Klonlamada kullanılan konakların çoğunun köken aldığı suş *E. coli* K suşudur ve *hsdRMS* lokusu tarafından kodlanan bir restriksiyon modifikasyon sistemi taşır. *hsdR* geni bir endonükleaz kodlar ve bu hücredeki metillenmemiş DNA'yı keser. Bu gen bakımından mutant hücreler ise metillenmemiş DNA'yı yıkmayacak ve transformasyon etkinliğini artıracaktır. Bu nedenle özel durumlar hariç konak olarak kullanılan *E. coli* hücrelerinin *hdsR* lokusu mutanttır.
2. **Plazmitleri kararlı bir şekilde muhafaza etmelidir.** Bir rekombinant plazmit hücrenin içine girdiğinde (içsel restriksiyon enzimlerinden kaçabildiyse) uygun bir replikasyon orijininne sahip olsa bile replikasyon ile çoğalması ve hücre içinde stabil kalması garanti değildir. Transforme edilmiş plazmitler arasındaki kısa rekombinasyonlar sonucunda moleküllerin büyüklüklerinin değişmesi ve bazı dizilerin ters dönmesi plazmit stabilitesini bozmaktadır. Bu problem genellikle hücre rekombinasyon mekanizması genlerinden *recA* geninin mutasyonu ile aşılabilmektedir. *recA* mutant konak sistemlerinde rekombinasyon minimize olmaktadır.
3. ***lacZ'* geninin kullanımına izin vermelidir.** Rekombinant vektör taşıyan ve yabani tip vektör taşıyan konak hücrelerin ayrılmasında kullanışlı olan *lacZ'* geni ile sağlanan mavi-beyaz seçim sistemine izin vermesi gerekir. Bunun için genellikle kromozomal *lacZ'* dizisinin silinmiş olması bu sistemin çalışmasını sağlayacaktır.

Rekombinant DNA işlemlerinde farklı amaçlar için geliştirilmiş farklı *E. coli* konak sistemleri sağlayan suşlar oluşturulmuştur. Bunlar arasında HB101, JM109, BL21 ve DH5 α sayılabilir. DH5 α suşunun genotipleri şöyledir:

$F^- \Phi 80/lacZ\Delta M15 \Delta(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_k^-, m_k^+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 \lambda^-$

DH5 α 'nın diğer suşlardan ayırt edici genotipleri ve oluşturdukları fenotipler şöyledir:

***lacZ\Delta M15*:** X-gal içeren katı besiyerlerinde kolonilerin mavi/beyaz görüntülemesine izin verir.

***recA1*:** transfer edilmiş DNA'nın stabilitesini sağlar ve istenmeyen rekombinasyonları engeller.

***endA1*:** miniprep metoduyla saflaştırılan plazmit DNA miktarını ve kalitesini iyileştirir.

5.1 Konak hücrelere DNA transferi

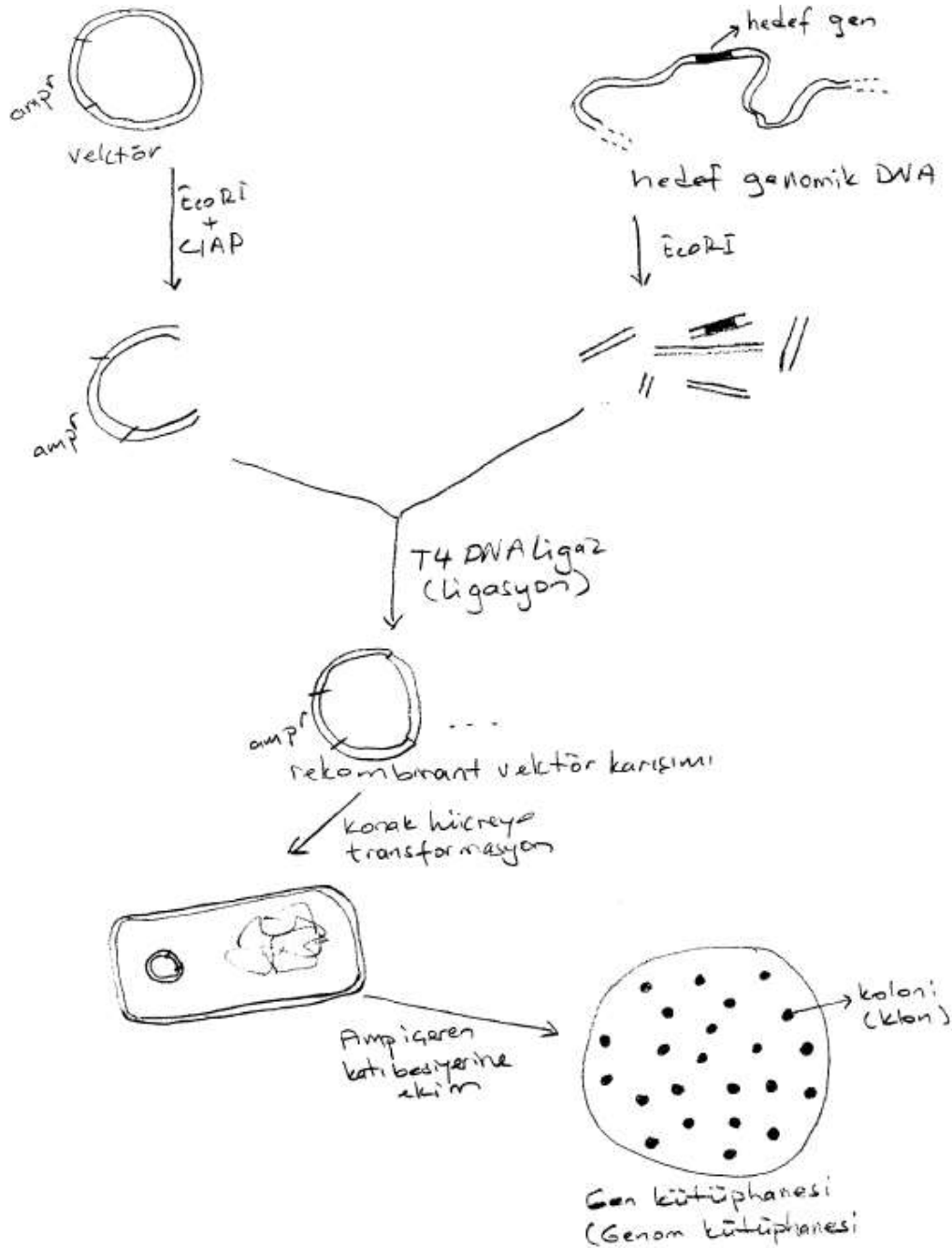
Klonlanmış bir genin konak hücreler içinde otonom replikasyon ile sayılarının artırılması gerekmektedir. Bu nedenle de bir konak hücreye DNA transfer edilebilmelidir. Rekombinant DNA işlemlerinde konak hücrelere DNA transferi farklı yöntemlerle yapılmaktadır. Bunlar arasında en yaygın çıplak DNA'nın hücreye transferi şeklinde gerçekleşen transformasyondur. Diğer yöntemler

arasında elektroporasyon, biyolitik yöntem ve konjugasyon sayılabilir. Bir hücreye DNA transferi sadece hücre zarının içine DNA'yı iletmekten ibaret olmayıp iletilen DNA'nın hücre içinde stabil kalabiliyor olmasını da kapsar.

Transformasyon bakteriler arasında bazı gruplarda doğal olarak da gerçekleşebilen bir süreçtir. DNA hücre içerisine alınır, ya otonom olarak ya da kromozoma integre olarak varlığını sürdürebilir hale gelir. *E. coli* hücreleri doğal olarak transforme olamayan hücrelerdir. Deneysel olarak bazı kimyasal ve fiziksel şartlara maruz bırakarak *E. coli* hücresi transforme olur hale getirilir. Konak sistemi olarak *E. coli* hücrelerinin transformasyonu için farklı yöntemler mevcuttur. Bunlardan en yaygını CaCl_2 varlığında hücrelerin üşütülmesi yöntemidir. Orta logaritmik faza kadar üretilmiş ($\text{OD}_{595} = 0,4-0,6$) kültürden elde edilen hücreler CaCl_2 iyonları varlığında 4°C 'de belli bir süre tutulduktan sonra transforme edilebilir hale gelirler. Belli işlemler uygulanarak transforme edilebilir hale getirilmiş *E. coli* konak hücrelerine **alıcı (kompetent) hücreler** adı verilir. Alıcı hücrelerle transfer edilecek DNA karıştırıldıktan sonra kısa bir sıcaklık soku uygulanarak (42°C) DNA'nın hücre içine geçişi sağlanır. Alıcı hücreler bir vektör ile veya rekombinant vektör ile ya da herhangi bir uygun DNA molekülüyle transforme edilebilir. Bir DNA molekülüyle transforme edilmiş konak hücrelere **transformant** denir.

6 Genomik DNA'nın Klonlanması

Gen klonlama, hedef bir DNA molekülünün bir vektöre bağlanarak izole edilmesi ve elde edilen rekombinant vektörün bir konak hücre içinde çoğaltılması işlemleridir (Şekil 6.1). Gen klonlamanın iki gerekçesi vardır. Bunlardan birisi klonlanmak istenen DNA daha büyük bir DNA molekülünün bir bölgesiyse veya diğer DNA molekülleriyle karışık bir durumdaysa hedef DNA fragmentini diğerlerinden ayırmak, izole etmektir. Diğeri de izole edilmiş hedef DNA molekülünün sayısını artırmaktır.



Şekil 6.1: Gen klonlamanın ana hatları: Gen kütüphanesinin oluşturulması.

Klonlanmak istenen genler genellikle daha büyük DNA moleküllerinin sözelimi bir kromozomun veya büyük bir kromozom parçasının bir kısmıdır. Bu durumda kromozomal DNA'yı klonlanabilecek kadar küçük parçalara ayırdıktan sonra klonlamak esastır. Genomik veya kromozomal DNA'yı restriksiyon endonükleaz veya diğer bir yöntemle küçük parçalara ayırdıktan sonra bu parçaların rasgele klonmasıyla elde edilen klonların tamamına **gen kütüphanesi** denir. Gen kütüphanesi eğer ligasyon ve konak hücreye transfer işlemleri optimum olarak gerçekleştiyse hedef genomun veya kromozomun taşıdığı genlerin tamamını içerir. Bir gen kütüphanesi içindeki hedef bir geni taşıyan klonun hangisi olduğuna karar vermek için ilave tekniklerin uygulanması gerekir. Sonuç olarak bir genomik DNA klonlaması iki aşamada gerçekleştirilir:

- i) Gen kütüphanesinin oluşturulması ve
- ii) Gen kütüphanesinden doğru klonun seçilmesi.

6.1 Gen kütüphanesinin oluşturulması

Eğer bir organizmaya ait bir gen klonlanmak isteniyorsa ve o gen bölgesini özel olarak genomdan ayırarak klonlamak için bir yöntem mevcut değilse (PZR çoğaltımı gibi), genomun tamamı klonlanabilecek küçük parçalara ayrılarak bütün parçaların rasgele klonlanması için bir strateji oluşturulur. Elde edilecek klonlar arasından hedef gen bölgesini taşıyan klonun seçilmesi de bu stratejiye eklenmelidir. Bir organizmaya ait genomun tamamını içeren klon topluluğuna **gen kütüphanesi** veya **genom kütüphanesi** denir. Eğer herhangi bir ayırım yapmaksızın genomun tamamı klonlandıysa bu bir tam gen kütüphanesidir. Bazen belli bir restriksiyon endonükleazla kesilen fragmentler incelenerek hedef geni içeren fragment büyüklüğü belirlenebilir. Eğer bu mümkün olursa hedef geni taşıyan büyüklük civarındaki büyüklüğe sahip fragmentler klonlanır ve diğer büyüklükteki fragmentler klonlanmaz. Bu şekilde elde edilen, genomun belli bir kısmını içeren gen kütüphanelerine de **kısmi gen kütüphanesi** denir. Tam gen kütüphanesi ile karşılaştırıldığında hedef bir genin sıklığı kısmi gen kütüphanesinde daha yüksektir. Dolayısıyla kısmi gen kütüphanesinde hedef klonu belirlemek daha kolay olacaktır. Bir gen kütüphanesini oluşturmak için yapılması gereken işler aşağıdaki gibidir:

1. Genomik DNA'nın klonlanabilir büyüklükte fragmentlere parçalanması: Klonlanabilir bir DNA fragmentinin büyüklüğü kullanılan vektörün DNA taşıma kapasitesi ile sınırlıdır. BAC ve kozmitler gibi yüksek kapasiteli vektörler mevcutsa bile, yaygın klonlama işlemlerinde kullanılan vektörlerin kapasitesi 10 kb'ın altında olup ideal büyüklük ise 5 kb'ın altıdır. Dolayısıyla klonlanmak istenen genomik DNA, tercihen yapışkan uç oluşturan ve vektör üzerinde de tanıma dizisi bulunan bir restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Sonra kesilen DNA moleküllerinin klonlanabilecek küçüklüğe indirildiği agaroz jel elektroforez yöntemiyle test edilir. Eğer bir enzim, genomu yeterince küçük parçalara ayıramadıysa diğer bir enzim denenir. Bu enzimlerin yapışkan uç oluşturan enzim olmaları klonlama başarısını artırır. Ancak uygun yapışkan uç oluşturan bir enzim belirlenemediyse kör uç oluşturan enzimler de kullanılabilir, bu durumda klonlama verimi düşecektir. Genomun kesildiği yapışkan uç oluşturan enzim, klonlamada kullanılması planlanan vektörü uygun bir pozisyondan kesiyor olması gerekir, aksi takdirde bu fragmentler vektöre bağlanamazlar. Kör uç oluşturan enzimlerde böyle bir zorunluluk yoktur, herhangi bir kör uç oluşturan enzim ile hedef DNA ve vektör kesilerek ligasyon sağlanabilir.

2. Vektörün restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi ve 5' uçlarının defosforilasyonu: Vektör klonlanmak istenen fragmentin kesildiği aynı restriksiyon endonükleaz ile kesilir. Bunun gerekçesi oluşturulan uçların komplementer olmasını sağlamaktır. Komplementer uçlar yardımıyla vektör ve

fragment uçları zayıf bir şekilde kısa süreliğine bir arada tutulur. Bu süre kısa da olsa ligasyon veriminin artırılmasında önemli bir rol oynar. Kör uçların ise reaksiyon ortamında bir araya gelmesi tamamen tesadüfe bağlıdır ve şüphesiz ki bu olay yapışkan uçlarla kıyaslandığında çok daha nadir olarak meydana gelecektir.

Yapışkan veya kör uçlu olsun vektör uçlarındaki 5' P grupları koparılır. Bunun önemli bir gerekçesi vardır: DNA ligaz iki DNA zincirini birinin 3' OH ve diğerinin de 5' fosfat uçlarını bir fosfodiester bağı oluşturarak birleştirir (eğer uçlar temasta ise). Bir karışımda vektör uçlarının genomik DNA fragment uçlarıyla eşleşmesi istenir ancak bu eşleşme aynı DNA fragmentinin iki ucu arasında da oluşabilir. Aynı DNA'nın uçlarının ligasyonuna **self ligasyon (kendikendine ligasyon)** denir. Bir ligasyon karışımında farklı fragmentler self ligasyonla halkasallaşabilir fakat restriksiyon endonükleaz ile kesilmiş bir vektörün self ligasyonu hiç istenen bir durum değildir. Çünkü temel amaç bir vektörle bir hedef DNA fragmentinin bağlanmasıdır. Bu durumda vektörün kendi üzerine ligasyonunu engellemek için 5' fosfat grupları fosfataz enzimleriyle (CIAP gibi) koparılır. Bu durumda bir vektör molekülünün uçları bir araya gelse bile ligasyon için gerekli olan 5' fosfat grubu sağlanamaz ve vektör self ligasyonu engellenir. Böylece vektörün halkasallaşabilmesi için hedef fragmentlerden birine bağlanması zorunluluğu oluşturulur.

3. Vektör ile genomik DNA fragmentlerinin ligasyonu: Vektör ile genomik DNA fragmentlerini birbirine bağlayarak rekombinant vektörler oluşturmak üzere vektör ve fragment karışımı karıştırılarak ortama T4 DNA ligaz gibi etkili ligasyon yapan bir enzim eklenir. Bu şartlar altında beklenti bir vektör molekülünün bir genomik DNA fragmenti ile bağlanmasıdır ve bu olay reaksiyon karışımında gerçekleşir. Ancak ligasyon rasgele meydana geldiği için diğer bazı ligasyon ürünleri de oluşacaktır. Bunlar uç uca bağlanmış genomik DNA fragmentleri ve halkasallaşmış genomik DNA fragmentleridir. Bu karışım içinde konak hücre içine transfer edildiklerinde replikasyonu yapılabilen tek yapı rekombinat (ve eğer varsa yabancı tip) vektörlerdir. Diğer DNA tiplerinin transformasyon sonrası stabil kalması mümkün değildir.

Ligasyon reaksiyon karışımı içinde diğer tip DNA molekülleri ile beraber rekombinant vektörler mevcuttur. Bu rekombinant vektörlerin optimum reaksiyon şartlarında farklı genom fragmentlerine bağlanmış olduğu beklenir. Dolayısıyla bu ligasyon karışımındaki farklı tip rekombinant vektörler bir organizmanın genlerinin tam bir takımını taşıyor olması temel beklentidir. Bazı durumlarda ligasyon verimliliği yeterli olmayabilir ve bu beklenti karşılanamayabilir. Dolayısıyla bir genomik DNA klonlama çalışmasında ligasyon verimliliğini en yüksek düzeyde tutmak temel hedeftir.

4. Rekombinant vektörlerin konak hücreye transferi: Ligasyon karışımı içinde bulunan ve genomun temsil edildiği rekombinant vektörlerin her birinin izole edilmesi ve sayılarının çoğaltılması (kopya sayısının artırılması) bir konak hücreye transfer ile mümkün olur. Yaygın kullanılan konak sistemleri belli *E. coli* suşlarına ait hücreleridir (JM109, BL21 veya DH5α gibi). Bu hücreler doğal olarak transforme olabilen hücreler değildir, yapay olarak DNA alır hale getirilirler. Alıcı hücreler (veya kompetent hücreler) denilen bu hücrelere, ligasyon karışımındaki rekombinant vektörler transformasyon veya elektroporasyon teknikleriyle transfer edilir. Alıcı hale getirilmiş dahi olsa bu hücreler hücre içinde DNA geçişine nadiren izin verirler. 1 µg DNA ile DH5α hücrelerinin transformasyon sıklığı yaklaşık 10^{-5} civarındadır, yani 100 000 hücreden 1'inde ($1/10^5$) transformasyon gerçekleşebilir.

Transformasyonu sadece bir DNA molekülünün hücre içine girişi olarak anlamamak önemlidir. Hücre içine giren DNA'nın otonom olarak veya kromozoma integre olarak varlığını devam ettirebiliyor olması gerekir. Klonlama işlemlerinde kullanılan konak sistemlerinde, rekombinasyon

mekanizması mutant olduğundan genome integrasyon gerçekleşmez, dolayısıyla DNA otonom olarak replike olmak zorundadır. Transfer edilmesi muhtemel DNA'lar arasında otonom olarak varlığını sürdürebilecek yegâne DNA molekülleri rekombinant vektörler ve eğer mevcutsa yabancı tip vektörlerdir. Diğer tip DNA molekülleri hücreye girseler bile stabil kalamazlar.

Bir alıcı hücre popülasyonunda bir rekombinant vektörü alan bir hücrenin ikinci bir rekombinant vektör alma olasılığı var mıdır? Bu olasılık sıfır değildir ancak çok düşüktür. Olasılığın çarpım kuralına göre iki bağımsız olayın (1. DNA'nın transformasyonu ve 2. DNA'nın transformasyonu) birlikte meydana gelme olasılıkları ayrı ayrı meydana gelme olasılıklarının çarpımına eşittir: 1. Olay (10^{-5}) x 2. Olay (10^{-5})= 10^{-10} , yani bir çift transferin meydana gelme olasılığı 1/10 000 000 000 kadar (1/10 milyar) olacaktır, yani çok düşüktür. Bu nedenle bir transformasyon sonrası transforme olan hücrelerin sadece tek bir rekombinant vektör aldığı var sayılır. Bir DNA molekülüyle transforme olmuş hücrelere **transformant** denir. Bu hücre içine tek kopya şeklinde girmiş olan plazmit, kopya sayısına ulaşana kadar hızla otonom olarak replike olacaktır. Yaygın kullanılan pUC serisi vektörlerin kopya sayısı 500-700 civarındadır.

Bu aşamada her bir transformant hücre tek tip bir rekombinant vektör taşır. Bu hücrenin soyundan gelen bütün hücreler aynı rekombinant vektörü taşırlar ve dolayısıyla birbirlerinin klonudurlar. Ancak bir transformantı diğerinden ayırt edebilmek için kültür seyreltilerek katı besiyerine ekilmeli ve izole koloniler şeklinde çoğaltılmalıdır.

5. Klonların seçici besiyerinde izolasyonu: DNA transferi yapılmış bir alıcı hücre popülasyonunda hücreler ya rekombinant (ve yabancı tip!) vektörü taşıyacak ya da taşımayacaktır. Rekombinant vektörü taşıyanlar yani transformant hücreler vektör üzerinde bulunan bir genden dolayı bir antibiyotiğe karşı dirençli olacaklar ancak transforme olmamış hücreler ise duyarlı olacaklardır. Bu popülasyon söz konusu antibiyotiği içeren ortama ekilirse bu ortamda sadece rekombinant vektörü taşıyan hücreler çoğalabilecektir. Yeterince seyrelterek ekim yapılırsa transformant hücreler katı besiyeri yüzeyine tek olarak düşecek ve koloni oluşturmak üzere çoğalmaya devam edecektir. Bu şekilde oluşan kolonileri oluşturan hücre başlangıçta tek bir transformant hücreden köken aldığı için genetik içerik olarak birbirinin aynısıdır yani klonudur. Bir transformasyon sonrası besiyeri yüzeyinde gelişen her koloni **klon** olarak kabul edilir. Klonların tamamı **gen** veya **genom kütüphanesi** olarak adlandırılır.

Bir gen kütüphanesi, elde edilen klonların tamamıdır. Ancak bu klonlar arasında rekombinant olmayan (yabancı tip) vektör taşıyanların olmadığından emin olmak gerekir. Vektörün restriksiyon endonükleazlarla tam kesilememesi ve/veya defosforilasyon sırasında 5' fosfatların tamamının koparılamaması gibi nedenlerle yabancı tip vektör mevcut olabilir. Daha ileri işlemlere geçmeden önce yabancı tip vektör taşıyan klonların bulunup bulunmadığı belirlenmelidir. Bunun için yabancı tip vektör ve rekombinant vektörün konak hücreye sağladığı fenotiplerin farklılığından faydalanılır. Bu fenotipik farklılığı oluşturmak için klonlama stratejisi geliştirilirken hangi vektör sisteminin seçileceğine doğru karar vermek gerekir. pBR322 vektörüne klonlama yapılırken sözelimi hedef DNA *tet^r* geni içine bağlanırsa rekombinant vektörü taşıyan klonlar Amp^r ve Tet^s fenotipine sahipken yabancı tip vektörü taşıyan klonlar Amp^r ve Tet^r fenotipini taşıyacaklardır. Gen kütüphanesini oluşturan koloniler replika ekim yöntemi ile tetrasklin duyarlılıkları bakımından ikinci bir teste tabi tutulmaları gerekecektir. Diğer yandan eğer vektör olarak pUC19 seçildiyse ve konak hücreler mavi-beyaz seçimine uygunsa yani *lacZ'* geni bakımından mutantsa, rekombinant vektörü taşıyan klonlar beyaz, yabancı tip vektörü taşıyanlar mavi olacaktır. Bu renk seçimi doğrudan ilk oluşturulan gen kütüphanesinde belirlenebilir: beyaz renkli klonlar rekombinant vektörü taşır yani gen kütüphanesini oluşturan klonlar beyaz renkli klonlardır.

6.2 Gen kütüphanesinden doğru klonun seçilmesi

Bir gen kütüphanesi oluşturulduktan sonra klonlar arasında hedef DNA molekülünü taşıyan klonun hangisi olduğu belirlenmelidir. Her bir klonu oluşturan hücreler içinde tek tip bir rekombinant vektör ve bu vektöre bağlı bir kromozomal DNA parçası vardır. Temel soru bir klonun taşıdığı rekombinant vektöre bağlı DNA parçası hedef DNA parçası mı? Bu soruya cevap bulmak için yani doğru klonu belirlemek için iki temel yaklaşıma dayalı teknikler geliştirilmiştir:

- i) Nükleik asit hibridizasyonuna dayalı teknikler
- ii) Klonlanan genin yönettiği fonksiyonun *in vivo*'da gerçekleştiğini göstermeye dayalı teknikler.

6.2.1 Nükleik asit hibridizasyonuna dayalı teknikler

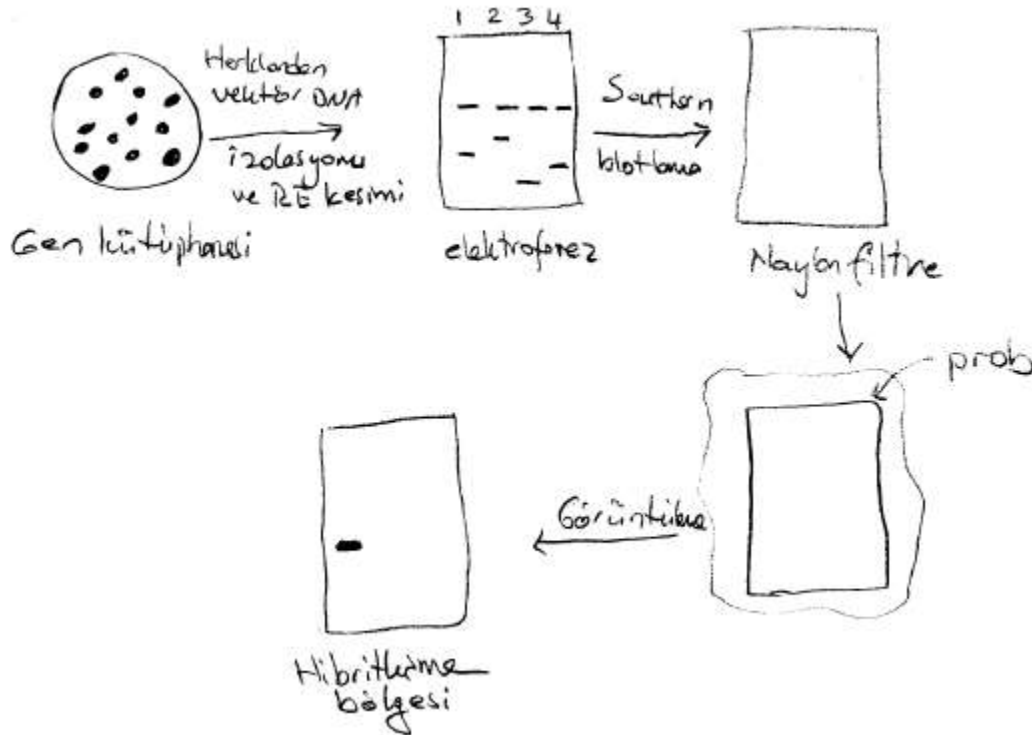
Bu tekniğin esası yüksek homolojiye sahip farklı nükleik asit zincirlerinin birbirleriyle hibritleşebilme özelliğine dayanır. Eğer iki DNA molekülü yeterince homolog ise bir denaturasyon-renaturasyon işleminden sonra farklı moleküllere ait DNA zincirleri çapraz olarak eşleşebilirler (hibritleşebilirler). Burada hibritleşmesi istenen DNA moleküllerinden biri klonlardan birinde bulunan hedef kromozomal DNA parçasıdır. Diğer de baz dizisi bilinen ve uygun tekniklerle takip edilebilir hale getirilmiş **prob** denilen nükleik asit molekülüdür. Eğer klonlamaya çalışılan bir DNA molekülü ile homolog bir prob mevcutsa gen kütüphanesindeki klonlarla probun hibritleşip hibritleşmediği belirlenerek doğru klon bulunabilir.

Prob olarak kullanılacak nükleik asitler, RNA molekülleri dayanıksız olduğu için genellikle DNA molekülüdür. Klonlanmak istenen gen daha önce klonlanmışsa bu klonlanmış gen uygun bir şekilde işaretlenerek prob olarak kullanılabilir. Ya da filogenetik olarak yakın akraba bir türden aynı gen klonlanmışsa bu gen de prob olarak kullanılabilir. Buda mümkün değilse klonlanmak istenen genin kodladığı proteinin amino asit dizisi biliniyorsa bu diziden faydalanarak sentetik bir oligonükleotit dizisi tasarlanır ve bu oligonükleotit prob olarak kullanılabilir. Bu durumda ilgili polipeptit bölgesini kodlayan DNA dizisinin tahminindeki zorluktan dolayı güçlü bir prob oluşturmak mümkün olmayabilir. Bir şekilde prob olarak kullanılacak bir DNA molekülü mevcutsa bu DNA molekülü radyoaktif bir atomla (^{32}P veya ^{35}S) veya floresans oluşturan bir bileşikle işaretlenerek prob haline getirilir. Artık radyoaktivite veya floresans takip edilerek probun bulunduğu konum belirlenebilir hale gelir.

Doğru klonu belirlemek üzere ya her klondan elde edilecek rekombinant plazmit DNA'sı kullanılarak Southern blotlama ve DNA hibridizasyonu yapılabilir, ya da doğrudan koloni hibridizasyonu uygulanabilir.

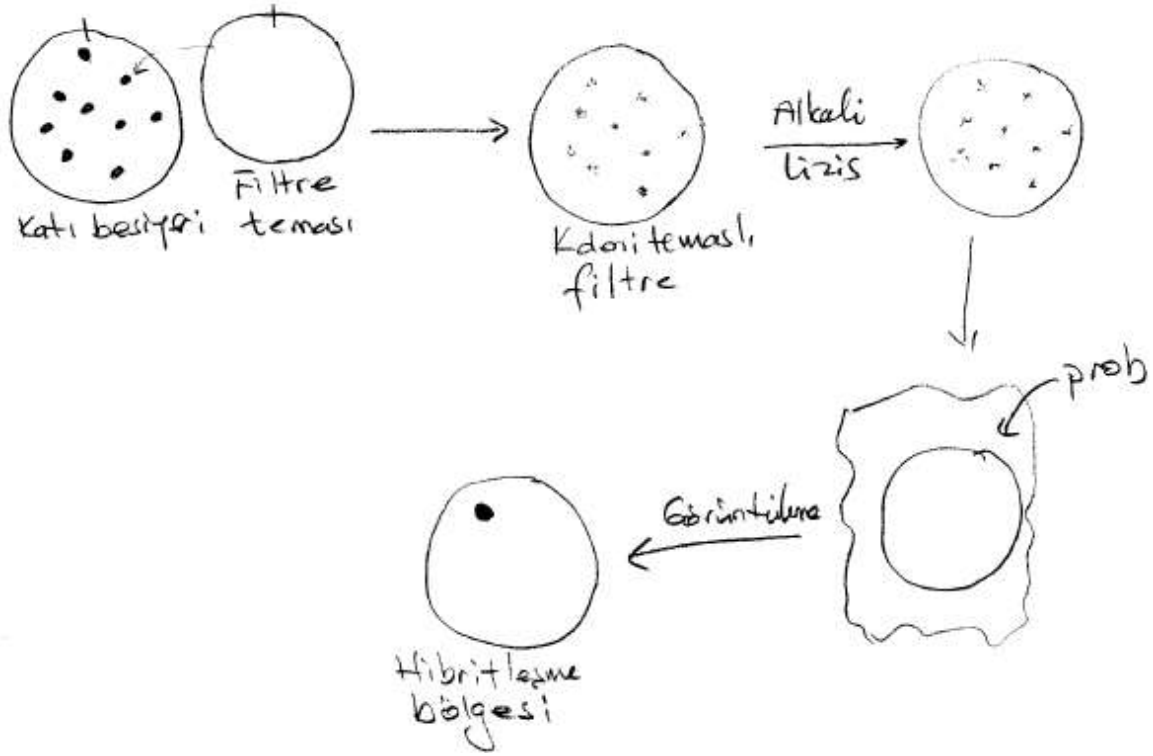
Southern blotlama ve DNA hibridizasyonu: Bu teknikte her bir klondan plazmit DNA izolasyonu yapılır ve rekombinant vektöre bağlı kromozomal DNA restriksiyon endonükleaz ile kesilir (Şekil 6.2). Sonra her bir klona ait fragmentlere (vektör + kromozomal DNA parçası), bir agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrılana kadar elektroforez uygulanır. Sonra jeldeki DNA molekülleri Southern blotlama ile naylon veya nitroselüloz filtrelelere (membranlara) transfer edilir. DNA molekülleri bulunduğu pozisyona sabitlendikten sonra bir sızdırmaz bir naylon torbaya alınır, uygun bir tampon ve prob eklenir. Sızdırmazlığı sağlanmış bu torba içinde bu karışım, filtreye kovalent bağlı DNA'nın ve serbest yüzer durumdaki probun denatüre olduğu sıcaklıkta tutulur. Sonra belli bir hızda T_m değerinin (erime sıcaklığı) biraz altına kadar sıcaklık düşürülerek DNA zincirlerinin eşleşmesi sağlanır (renaturasyon). Bu şartlarda eşleşme herhangi bir DNA zinciri arasında olabilir: filtreye bağlı zincirler arasında, serbest yüzen prob zincirleri arasında ve filtreye bağlı kromozomal DNA parçasının bir zinciri ile serbest yüzen probun bir zinciri arasında. Hibritleşmeden sonra serbest yüzer durumdaki probu da içeren tampon uzaklaştırılır. Renaturasyon sonrasında eğer filtre üzerinde prob varsa, filtre üzerinde

kovalent olarak bağılı durumda bulunan kromozomal DNA parçası ile hibritleştiği için vardır. Bu durumda filtre üzerinde radyoaktivitenin veya floresansın hangi pozisyonda olduğu belirlenir ve o pozisyona yüklene DNA hangi klonu aitse hedef geni taşıyan o klondur.



Şekil 6.2: Southern blotlama ve nükleik asit hibridizasyonu ile hedef klonun belirlenmesi.

Koloni hibridizasyonu: Koloni hibridizasyonunda petri yüzeyinde gelişmiş olan kolonilerin üzerine nitroselüloz veya naylon bir filtre dokundurularak her koloniden pozisyonları değişmeksizin bir grup hücrenin filtre yüzeyine tutunması sağlanır ve ana petri saklanır (4°C'de birkaç hafta kadar) (Şekil 6.3). Sonra filtreye uygun bir kap içinde sodyum hidroksit uygulanarak üzerindeki hücrelerin parçalanması sağlanır. Hücreden serbest kalan DNA molekülleri (rekombinant vektör de dahil) bulundukları pozisyondan filtreye kovalent olarak bağlanırlar. Kovalent bağlanma kendiliğinden olacağı gibi bunu 80°C'de ısıtarak veya UV uygulayarak da yapmak mümkündür. Sonra bu filtre sızdırmaz bir naylon torba içinde proba hibritleştirilir. Filtre üzerinde hibritleşmenin görüldüğü pozisyondaki klon hedef DNA'yı taşıyan klondur. Ana petrideki aynı pozisyondaki klon doğru klon olarak diğerlerinde ayrılır.

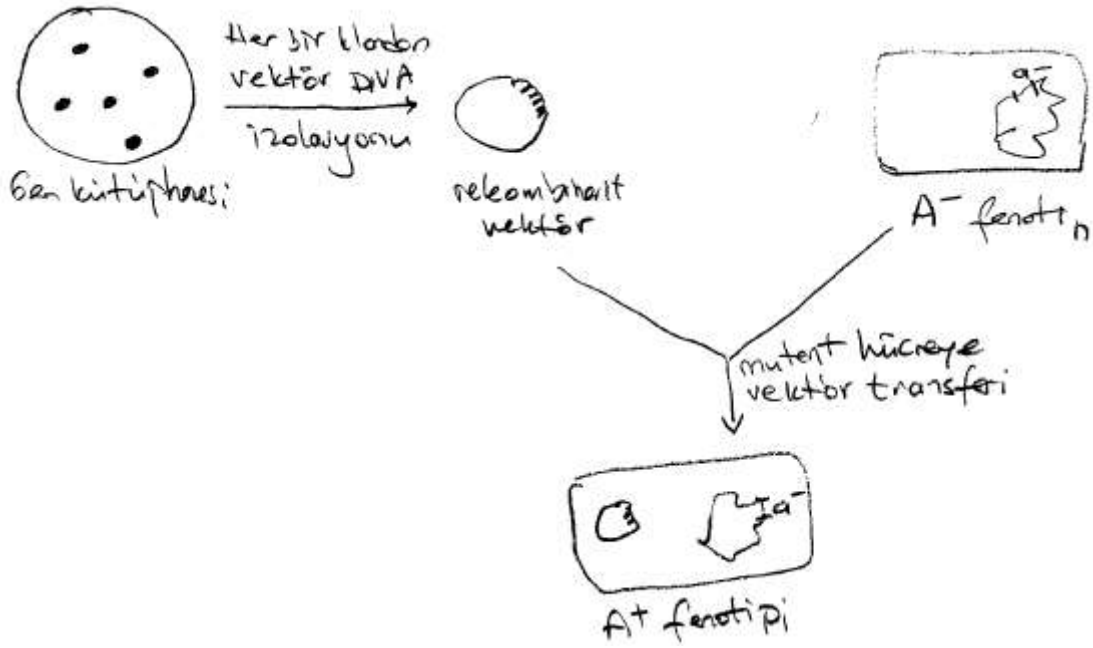


Şekil 6.3: Koloni hibridizasyonu ile hedef klonun belirlenmesi.

6.2.2 Hedef genin yönettiği fonksiyonun *in vivo*'da gerçekleştiğini göstermeye dayalı teknikler.

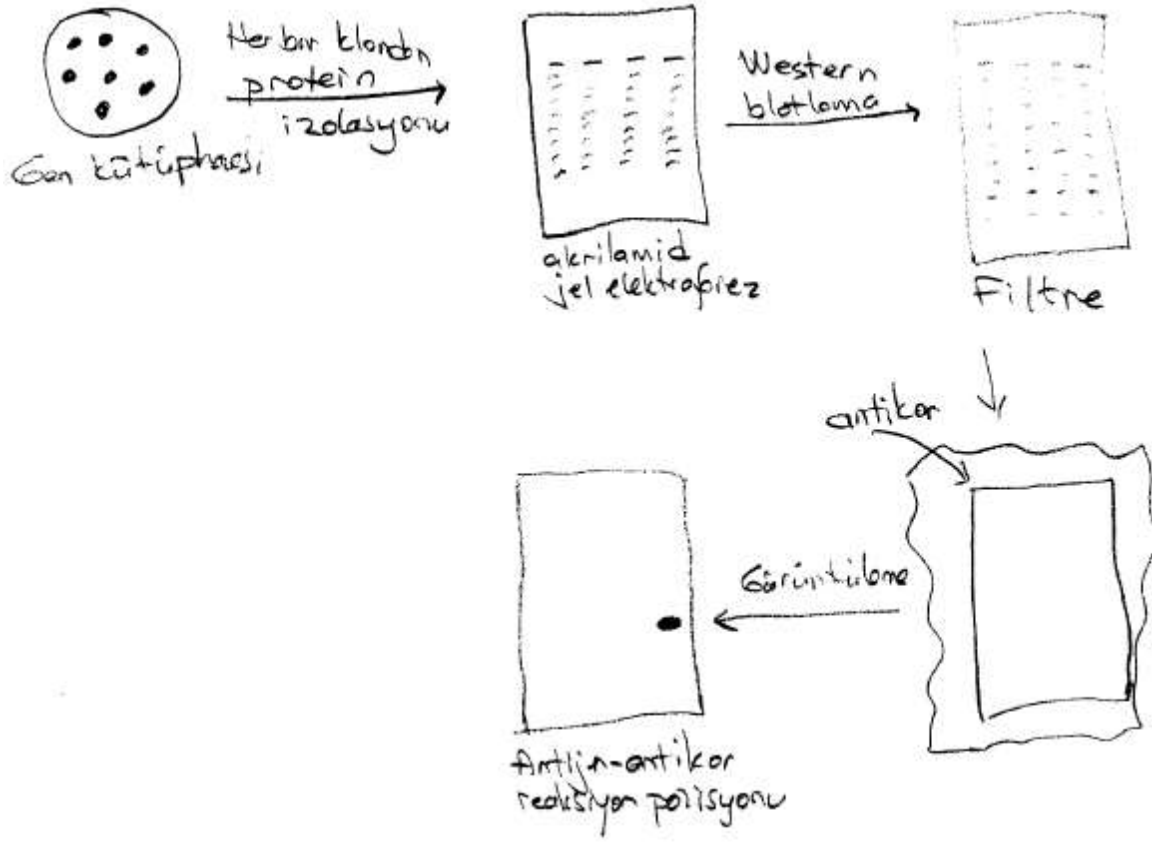
Bu yöntemlerin esası klonlanmış bir genin protein son ürününün konak hücre içinde üretilip üretilmediğini belirlemektir. Eğer bir klon klonlanmak istenen genin ekspresyonu sonucu oluşacak proteini konak hücreye sağlıyorsa hedef geni de taşıyor demektir. Çok farklı yaklaşımlara dayalı teknikler bu grup altında incelenebilir. Burada bu tekniklerden ikisini incelenecektir: Genetik komplementasyon ve immünoablottama.

Genetik komplementasyon: Eğer klonlanmak istenen gen bakımından (sözelimi *a* geni bakımından) mutant bir suş mevcutsa bu teknik uygulanabilir. Nükleik asit hibridizasyonu esasına dayalı tekniklere göre emek ve maliyet yoğun bir tekniktir ancak hibridizasyon için bir prob mevcut değilse kullanışlı bir yöntem sunar. Gen kütüphanesindeki her bir klondan vektör DNA'sı izole edilir (Şekil 6.4). Hedef gen bakımından mutant olan hücre kültüründen bir miktar alınarak bir klona ait DNA bu hücreye transforme edilir. Sonra hücrenin yabancı tipe dönüşüp dönüşmediğine bakılır. Eğer mutant fenotip yabancı tip fenotipe dönmüşse transfer edilen vektörün taşıdığı DNA parçası yabancı tip geni (hedef geni) taşıyor demektir. Bu rekombinant vektörün izole edildiği klon doğru klon olarak değerlendirilir. Bu teknik iş yoğun bir tekniktir. Her bir klondan plazmit DNA izolasyonu, plazmit DNA'sının mutant hücreye transformasyonu, yabancı tip fenotipin taranması gibi her biri özen ve zaman gerektiren işlemlerdir. Ayrıca doğru klonu bulabilmek için aynı işlemleri yüzlerce defa tekrarlamak da gerekebilir. Her şeye rağmen eğer kullanılabilir bir prob mevcut değilse genetik komplementasyon doğru klonun belirlenmesi için iyi bir alternatif sunar.



Şekil 6.4: Genetik komplementasyon ile doğru klonun belirlenmesi.

İmmünoablamlama: Klonlanmak istenen genin ürünü olan bir proteine karşı üretilmiş bir antikor mevcutsa konak hücre içinde bu proteinin varlığı belirlenebilir. Bunun için farklı yaklaşımlar ve teknikler uygulanabilir. Sözgelimi gen kütüphanesindeki her bir klondan elde edilen hücreler parçalanarak proteinleri elde edilir (Şekil 6.5). Bu proteinler bir poliakrilamid jelde elektroforez ile büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra jeldeki proteinler naylon filtrelerle transfer edilir. Bir jelden proteinlerin filtre yüzeyine transferine **Western blotlama** denir, tekniğin temel mantığı Southern blotlamadaki gibidir. Üzerine proteinler bağlanmış olan filtre bir sızdırmaz naylon torbaya konularak antikor da eklenir. Antikor uygun antijen (klonlanmak istenen genin ürünü olan protein) varsa bağlanacaktır. Daha sonra antikor-antijen kompleksleri kimyasal veya enzimatik yöntemlerle görünür hale getirilir. Hangi klondan elde edilen protein ile antijen antikor reaksiyonu gerçekleştiyse o klon hedef DNA'yı taşıyor demektir.



Şekil 6.5: İmmünoiblotlama ile doğru klonun belirlenmesi.

7 cDNA Klonlama

Genomik DNA klonlama prokaryotik organizmalarının kromozomlarını klonlamak için idealdir. Aynı strateji ökaryotik organizmalar için de uygulanabilir ancak iki temel sorunun üstesinden gelmek gerekmektedir. Bunlardan biri ökaryotik genomların prokaryotlarınkine göre binlerce kat veya daha büyük olmasıdır. Dolayısıyla ökaryotik genomun tamamının temsil edildiği bir genom kütüphanesi için prokaryotlarınkine oranla çok daha fazla sayıda klonun elde edilmesi gerekmektedir.

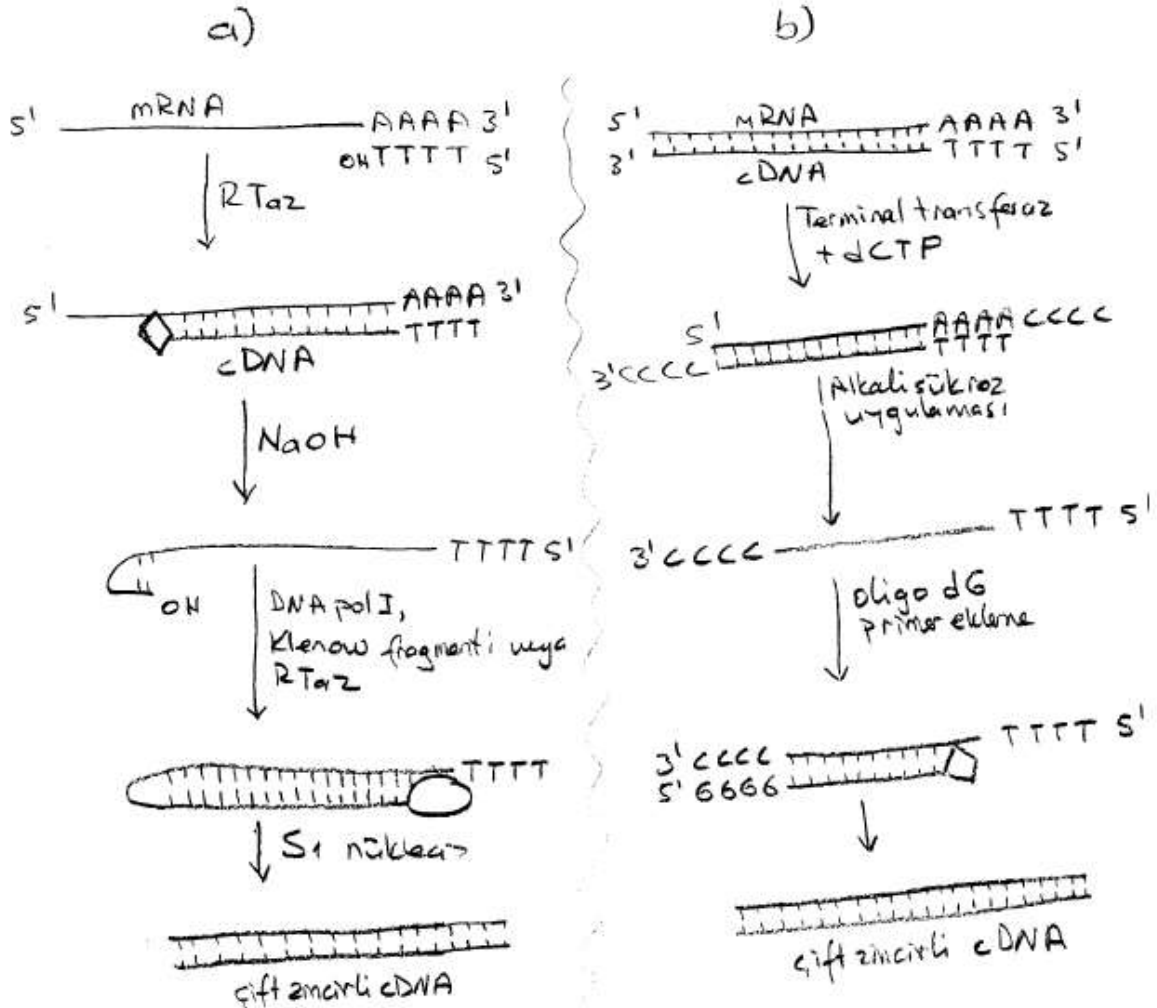
İkinci ve daha temel bir zorluk klonlanacak genin protein ürününün üretilmesi istendiğinde ortaya çıkar. Ökaryotik genomlarda genlerin proteinleri kodlayan kodon dizileri yani **eksonlar**, **intron** denilen protein kodlamada rolü olmayan dizilerle kesintiye uğratılmış durumdadır. Hücrelerde ekspresyon sırasında mRNA molekülünden intronlar çıkarılır ve sonra ribozomlara geçerek protein sentezinde kullanılır. Prokaryotik genlerde intronlar bulunmadığı için prokaryotik hücrelerde intron çıkarma fonksiyonunu yürütecek herhangi bir mekanizma yoktur. Dolayısıyla genomdan klonlanmış bir ökaryotik genin prokaryotik bir konak hücre içerisinde protein ürününün sentezini yapmak mümkün değildir. Eğer ökaryotik bir genin ürünü olan bir proteinin prokaryotik bir konak hücrede ekspresyonunun yapılması planlanıyorsa öncelikle bu ökaryotik genin intronsuz halinin klonlanması gerekir.

İntronsuz bir ökaryotik genin tek kaynağı olgun mRNA molekülleridir. Bir gen bölgesinden üretilen bir mRNA'nın ilk kopyasında ekson ve intronlar birlikte bulunur. Transkripsiyonla az çok eşzamanlı olarak bu öncü mRNA molekülleri RNA işleme denilen bir süreçle işlenir. RNA işleme sırasında öncü mRNA'dan intronlar çıkarılır ve diğer bazı 5' ve 3' modifikasyonları gerçekleştirilir. Bu işlemlerin sonunda oluşan mRNA'ya **olgun mRNA** denir. Olgun mRNA bir genin sadece proteinlerin amino asit dizisini belirleyen kodonları da içeren eksonlardan oluşmuş olup ribozomlarda protein sentezinde kullanılır. Dolayısıyla ökaryotik genlerin doğrudan protein sentezinden sorumlu kısmı olgun mRNA molekülünde mevcuttur. İşte ökaryotik bir genin prokaryotik konak hücrelerde ekspresyonunu yapmak üzere klonlamak istendiğinde o gene ait doğru dizi olgun mRNA molekülünde mevcuttur.

7.1 cDNA sentezi

RNA molekülleri dayanıksız moleküller olduklarından doğrudan klonlanamazlar, öncelikle DNA'ya dönüştürülürler ve sonra klonlanırlar. RNA'nın kalıp olarak kullanılmasıyla sentezlenen çift zincirli DNA molekülüne **cDNA** (komplementer DNA) denir. RNA'nın kalıp olarak kullanılarak DNA molekülü sentezi hücrelerde yaygın bir olay değildir. Retrovirüsler gibi bazı virüsler RNA genomlarını DNA aracı moleküllerine dönüştürürler. Bu işlem, kendi genomları tarafından kodlanan bir **RNA bağımlı DNA polimeraz** (ters transkripsaz, revers transkriptaz veya **RTaz**) enzimi tarafından yürütülür. Bu viral RTaz enzimi kullanılarak *in vitro*'da bir olgun mRNA molekülünü cDNA molekülüne dönüştürmek mümkündür. Olgun mRNA molekülünün 3' ucunda bir poli A kuyruğu denilen 150-250 nükleotit uzunluğunda sadece A nükleotitlerinden oluşmuş bir dizi vardır. Bu poli A kuyruğu ile komplementer olan bir poli T primeri tasarlanarak mRNA'nın komplementeri olan bir cDNA zinciri sentezlenir, böylece çift zincirli bir mRNA:cDNA hibrit molekülü elde edilir (Şekil 7.1). RNA:cDNA hibrit molekülün mRNA zinciri yıkılarak geriye kalan tek zincirli cDNA molekülünün komplementeri olan ikinci bir cDNA zincirinin sentezlenmesi gerekir Bunun için tek zincirli cDNA molekülünün 3' ucundan yeni zincirin sentezi için 3'OH grubu sağlayan bir primere ihtiyaç vardır. Bunun sağlanması için yaygın olan iki yöntem vardır.

Geleneksel olarak kullanılan yöntemde, tek zincirli cDNA molekülünün ucunda bir **saç tokası** yapısının oluşması beklenir. Bu yapı çoğu durumda oluşur ve 3'OH ucu böylece sağlanır (Şekil 7.1a). Bu 3'OH ucundan itibaren komplementer zincir uygun bir DNA polimeraz (DNA polimeraz I veya Klenow fragmenti) veya revers transkriptaz aktivitesiyle sentezlenir. Ancak bu cDNA zincirleri bir uçta saç tokası yapısıyla kovalent olarak bağlı bir yapıdadır. Saç tokası yapısındaki eşleşmemiş durumdaki tek zincirli cDNA bölgesi S1 endonükleaz ile kesilir ve zincirler serbest kalır, böylece kovalent bağlı cDNA zinciri çift zincirli cDNA'ya dönüşmüş olur. Saç tokası yapısı bir olgun mRNA'nın 5' tarafının komplementeridir. Bu saç tokası yapısı mRNA molekülünün bir parçası olduğu için S1 endonükleazla kesildiğinde klonlanmak istenen genin 5' ucundan bir miktar (daha küçük veya nispeten daha büyük) kayıp oluşur. Bu durumda saç tokası metoduyla elde edilen ve klonlanan cDNA'nın taşıdığı gen bölgesinde kayıplar olur. Böyle bir kayıp olmaksızın olgun mRNA'nın tam bir cDNA kopyasını elde etmek için ikinci zincirin sentezlenmesinde homopolimer ekleme yöntemi kullanılır.



Şekil 7.1: Bir olgun mRNA'dan cDNA sentezi. a) Tek zincirli cDNA'nın 3' ucunda oluşan kısa saç tokası yapısı yeni zincir sentezi için primer görevi görür, 3' OH grubu sağlar. b) Tek zincirli cDNA'nın 3' ucuna terminal transferaz aktivitesiyle poli C dizisi ekleme yöntemiyle komplementer zincirin sentezi. 3' poli C ile eşleşen bir poli G primeri ikinci zincir sentezinin başlaması için 3'OH grubu sağlar.

Homopolimer ekleme yönteminin esası poli T primerleri kullanılarak mRNA:cDNA hibriti elde edildikten sonra ikinci cDNA zincirini sentezlemek için mevcut hibrit molekülün 3' uçlarına homopolimer eklemektir (Şekil 7.1b). Bunun için terminal transferaz enzimi ve deoksiribonükleotit

trifosfatlardan sadece biri sözelimi dCTP reaksiyona eklenir. Bu durumda zincirlerin 3' uçları peş peşe C nükleotitlerinden oluşacaktır. Bu bölgeye komplementer olan bir poliG oligonükleotiti kullanılarak ikinci cDNA zinciri sentezlenir. Bu durumda olgun mRNA'nın ve dolayısıyla klonlanmak istenen genin 5' ucundan kayıp oluşması engellenir ve genin intronsuz tam bir çift zincirli cDNA kopyası elde edilir.

7.2 cDNA'nın klonlanması

cDNA klonlama işleminde en önemli nokta klonlanmak istenen gene ait mRNA'nın doğru hücrelerden izolasyonudur. Çok hücreli ökaryotlarda çoğu durumda belli bir genin ekspresyonu (dolayısıyla olgun mRNA'ya dönüştürülmesi) belli bir hücre tipinde ve belli şartlar altında gerçekleşir. Dolayısıyla klonlanmak istenen genin hangi hücre tipinde ve hangi fizyolojik şartlarda veya hangi embriyolojik gelişim safhasında ekspresyonunun yapıldığını bilmek gerekir. Sözelimi insan insülin geni pankreasın Langerhans adacıklarının β hücrelerinde ifade edilir (ekspresyonu yapılır). Dolayısıyla kan hücrelerinde bir insülin mRNA'sı izole etmek mümkün değildir. Doğru hücre tipi belirlendikten sonra bu hücrelerden toplam RNA izolasyonu yapılır, sonra toplam RNA'dan 3' poli A kuyruk yapısından faydalanılarak sadece olgun mRNA molekülleri ayrılır. Ancak unutulmaması gereken şey bir hücrede sadece tek bir genin mRNA kopyaları oluşturulmadığı, diğer çok sayıda gene ait mRNA moleküllerinin de oluşturulduğudur. Umulabilecek şey sözelimi insülin sentezleyen hücrelerde insülin mRNA'sı diğer genlere ait mRNA moleküllerinden oransal olarak daha fazla olmasıdır. Bu şartlar altında elde edilecek cDNA birden fazla gene ait bir karışım şeklinde olacaktır.

cDNA karışımını vektöre bağlamak üzere farklı yöntemler vardır. Bunlar arasında i) kör uç ligasyonu, ii) liker bağlama ile yapışkan uç ligasyonu, iii) adaptör bağlama ile yapışkan uç ligasyonu ve iv) homopolimer ekleyerek yapışkan uç ligasyonu sayılabilir.

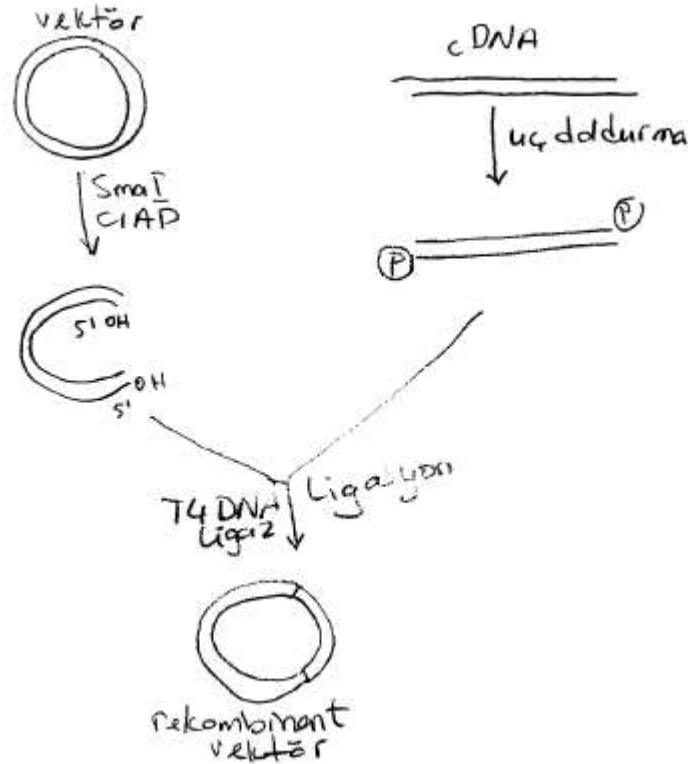
Kör uç ligasyonunda vektör kör uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaz ile kesilir ve 5' fosfat grupları koparılır (Şekil 7.2). Sonra cDNA'nın uçları eğer kör değilse tek zincirli uç bölgesi, S1 endonükleaz gibi bir endonükleaz ile kopararak veya DNA polimeraz aktivitesiyle doldurularak kör uçlu hale getirilir. Bu iki kör uçlu molekül (vektör+cDNA) ligasyonla birbirlerine bağlanırlar.

Kör uç ligasyonunun vektör ve hedef DNA'nın bağlanmasını yeterince etkili bir şekilde sağlayamaması bu yöntemin bir zayıflığıdır. Eğer başlangıç olgun mRNA karışımında hedef genin temsil oranı düşükse ya da bir hücrede belli bir zamanda ekspresyonu yapılan genlerin tamamının temsil edileceği bir cDNA kütüphanesi oluşturulacaksa bu ligasyon yöntemi yani kör uç ligasyonu yetersiz kalabilir. Bu durumda diğer ligasyon seçeneklerinin uygulanması planlanabilir.

Ligasyon reaksiyonlarında substrat miktarı artırılarak verimlilik artırılabilir. Ligasyon reaksiyonunda substrat miktarı doğrudan DNA miktarı değil sağlanan uç miktarıdır. Sözelimi 1 kb büyüklüğündeki bir DNA 2 uca sahipken 100 bç büyüklüğündeki 10 adet DNA molekülü toplamda 1 kb olmasına rağmen 20 uca sahiptir. Dolayısıyla aynı konsantrasyona sahip daha küçük DNA molekülleri daha fazla uç (ligasyon reaksiyonu için substrat) sağlar.

Linker bağlama yöntemiyle cDNA ligasyonunda **linker** denilen ve içinde yapışkan uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizisi taşıyan kısa bir oligonükleotit, vektör ve cDNA'nın uçlarına eklenir (Şekil 7.3a). Bu ekleme işlemi de bir kör uç ligasyonudur fakat linkerler küçük DNA molekülleri oldukları için nispeten düşük konsantrasyonlarda büyük sayıda uç sağlarlar ve büyük DNA moleküllerine göre daha etkili bir şekilde ligasyonla diğer DNA moleküllerinin (vektör ve hedef cDNA) uçlarına bağlanırlar. Linker bağlandıktan sonra hem vektör hem de cDNA, linker içinde tanıma dizisi bulunan restriksiyon endonükleaz ile kesilirse uçlar yapışkan hale gelmiş olacaktır. Bu aşamadan

sonra yapışkan uç ligasyonu ile vektör ile cDNA birleştirilerek rekombinant vektörler elde edilir. Bu yöntemle cDNA ligasyon verimliliği önemli ölçüde artırılır.

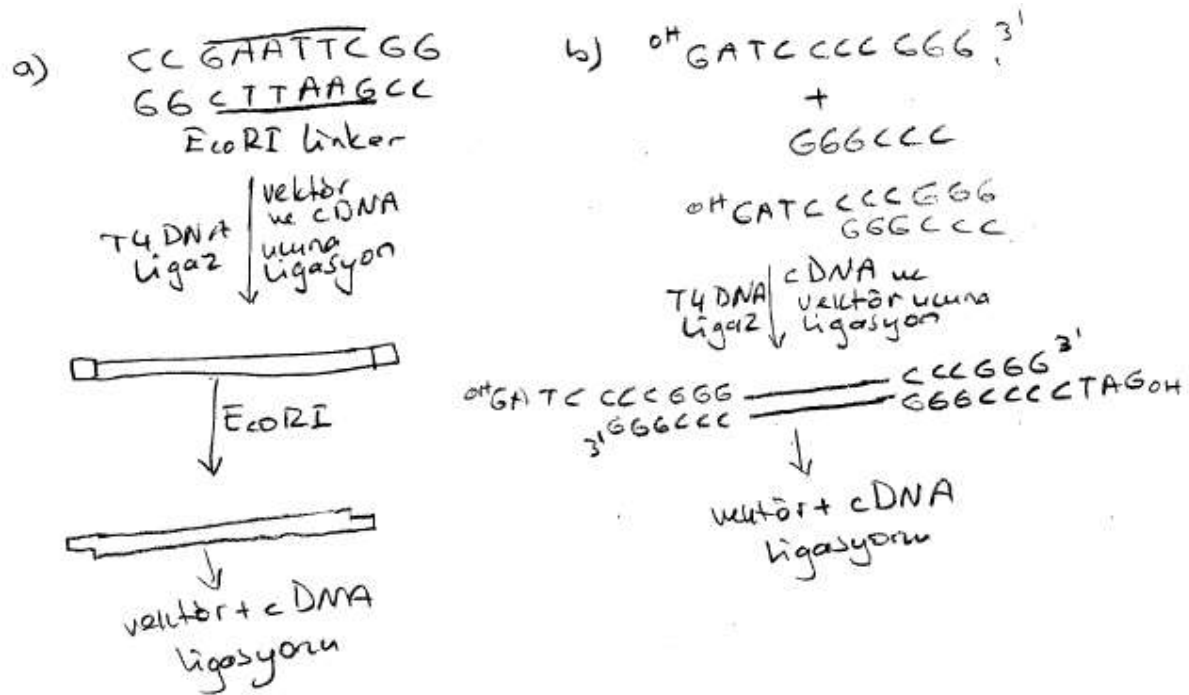


Şekil 7.2: Kör uç ligasyonu ile cDNA'nın vektöre bağlanması.

Adaptör bağlama yönteminde adaptör denilen kısa DNA molekülleri kör uçlu vektör ve cDNA moleküllerine bağlanır. Adaptör molekülü yapay olarak sentezlenmiş birbirine komplementer olan biri uzun ve biri kısa iki DNA zinciridir (Şekil 7.3b). Bu iki zincir eşleştiğinde molekülün bir ucu kör uç oluşturur, diğer uç ise tek zincirli kalır. İşte bu tek zincirli uç yapışkan uç oluşturan bir enzimin oluşturduğu bir tek zincir dizisine sahiptir. Şekil 7.3 b'de verilen adaptör *Bam*HI enziminin oluşturacağı bir yapışkan uç sağlar. Adaptörün yapışkan uç oluşturan zincirinin 5' fosfat grubu koparılacak aynı adaptörün yapışkan uçlarıyla kendi kendine ligasyonu engellenir. Sonuçta adaptörler kör uçlarından kör uçlu vektör veya cDNA moleküllerine ligasyonla bağlanırlar. Böylece vektör ve cDNA yapışkan uçlu hale getirilir ve yapışkan uç ligasyonu ile rekombinant vektörler oluşturulur.

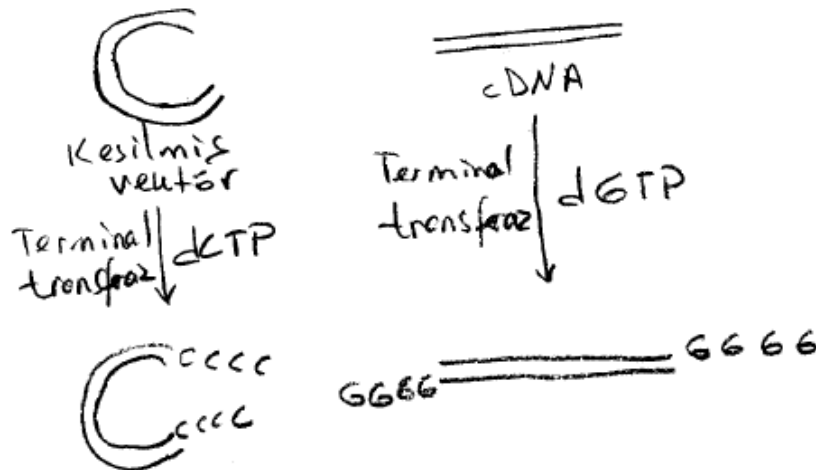
Aslında adaptör kullanımının da linker kullanımının da amacı aynıdır: kör uçları yapışkan hale getirmek. Linkerlerin, cDNA'ya veya vektöre bağlandıktan sonra belli bir restriksiyon endonükleaz ile kesilmesi gerekir. Eğer bu restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizisi cDNA içinde de mevcutsa molekülün sadece linker uçları değil kendisi de kesilerek parçalanacaktır. Bu problemi aşmak için metilasyon pozitif konak hücre kullanımı gibi diğer yöntemler de bulunsa bile linker yerine adaptör kullanmak etkili bir çözüm yolu sağlar.

Homopolimer ekleme yönteminde kör uçlu hale getirilmiş vektör ve cDNA'nın uçlarına komplementer homopolimerler eklenir (Şekil 7.4). Terminal transferaz aktivitesi ile vektör ve cDNA uçlarına deoksiribonükleotit trifosfatlardan sadece biri peş peşe eklenir. Sözelimi kör uçlu vektörün 3' uçlarına dCTP, cDNA'nın 3' uçlarına da dGTP eklendiğinde vektör ve cDNA uçları komplementer hale gelecektir. Komplementer homopolimer taşıyan vektör ve cDNA molekülleri ligasyonla birbirine bağlanarak rekombinant vektörler elde edilir.



Şekil 7.3: a) Linker bağlama yöntemiyle cDNA'nın vektöre ligasyonu. b) Adaptör bağlama yöntemiyle cDNA'nın vektöre ligasyonu.

Hangi yöntemle olursa olsun bir defa cDNA taşıyan rekombinant vektörler elde edildikten sonra klonlama basamakları daha önce açıklandığı gibi (Bölüm 6.1) devam ettirilir. Rekombinant vektörler uygun bir *E. coli* konak sistemine transfer edilir, transformant koloniler genetik belirteçler (antibiyotik direnci ve mavi-beyaz koloni seçimi gibi) kullanılarak seçilir ve cDNA kütüphanesi olarak muhafaza edilir. cDNA kütüphanesi içindeki doğru klon uygun bir yöntemle (Bölüm 6.2) belirlenir.



Şekil 7.4: Homopolimer ekleme yöntemiyle cDNA'nın vektöre ligasyonu.

Bu bölümde cDNA'nın plazmit türevi olan vektörlere klonlanması teknikleri anlatılmıştır. Çoğu durumda plazmit vektörleri cDNA klonlamak için başarılı bir şekilde kullanılabilir. Ancak bazı durumlarda bakterifaj vektörleri de etkili bir şekilde cDNA kütüphaneleri oluşturmak için kullanılabilir. Bu konuyla ilgili ayrıntılı bilgiye kaynaklar kısmında listelenmiş kaynaklardan ve diğer kaynaklardan ulaşılabilir.

8 PZR ve PZR Klonlama

8.1 Plimeraz zincir reaksiyonu (PZR)

PZR, polimeraz zincir reaksiyonu ifadesinin kısaltılmış ismidir, orijinal olarak PCR (polymerase chain reaction) olarak bilinir. Adından da anlaşılacağı gibi **PZR** peş peşe polimeraz reaksiyonlarıyla belli bir DNA molekülünün belli bir bölgesinin milyarlarca defa çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan bir tekniktir. DNA polimeraz reaksiyonu bir kalıp DNA zinciri üzerinde başlatılmış bir komplementer zincirin 5'-3' yönünde uzamasını sağlar. Dolayısıyla PZR için bir kalıp DNA ve her bir kalıp zincirin komplementerinin sentezlenebilmesi için kalıp DNA ile komplementer olan bir çift primere ihtiyaç vardır. Bir DNA bölgesininin PZR ile amplifikasyonunu yapabilmek için şu şartların karşılanması gerekir:

- i. Kalıp DNA
- ii. Hedef bölgenin her iki sınırında birbirine doğru yönelmiş bir çift DNA primer
- iii. PZR döngüleri sırasında maruz kalacakları yüksek denatürasyon sıcaklıklarına dayanıklı bir DNA polimeraz
- iv. dNTP'ler
- v. PZR döngüleri sırasındaki farklı sıcaklıkları sağlayacak bir ısı döngücü cihazı (thermal cycler).

Kalıp DNA çoğaltmak istenilen DNA bölgesini (bir gen bölgesi gibi) içeren daha büyük bir DNA molekülüdür. Kalıp DNA genellikle bir organizmaya ait bir kromozom veya kromozom parçası, plazmit DNA'sı veya viral DNA ya da cDNA molekülü olabilir.

PZR primerleri 17 bazdan daha uzun genellikle 20 baz civarında büyüklüğe sahip deoksi oligonükleotitlerdir. Bu primer çiftinden biri hedef (çoğaltılacak) DNA bölgesinin başlangıcı ile diğeri de hedef bölgenin bitiş bölgesiyle komplementer olmalıdır. Ayrıca komplementer oldukları bölgeyle eşleştiklerinde (bağlandıklarında) 3' OH uçları birbirine doğru yönelmelidir. Dolayısıyla hedef bir DNA bölgesinin sınır kısımlarının baz dizisi bilinmeksizin bir primer dizisi tasarımı yapılamaz. Sonuç olarak bir DNA bölgesini PZR ile çoğaltabilmek için o bölgenin en azından sınır kısımlarının baz dizisinin bilinmesi gerekir, aksi takdirde PZR çoğaltımı mümkün değildir.

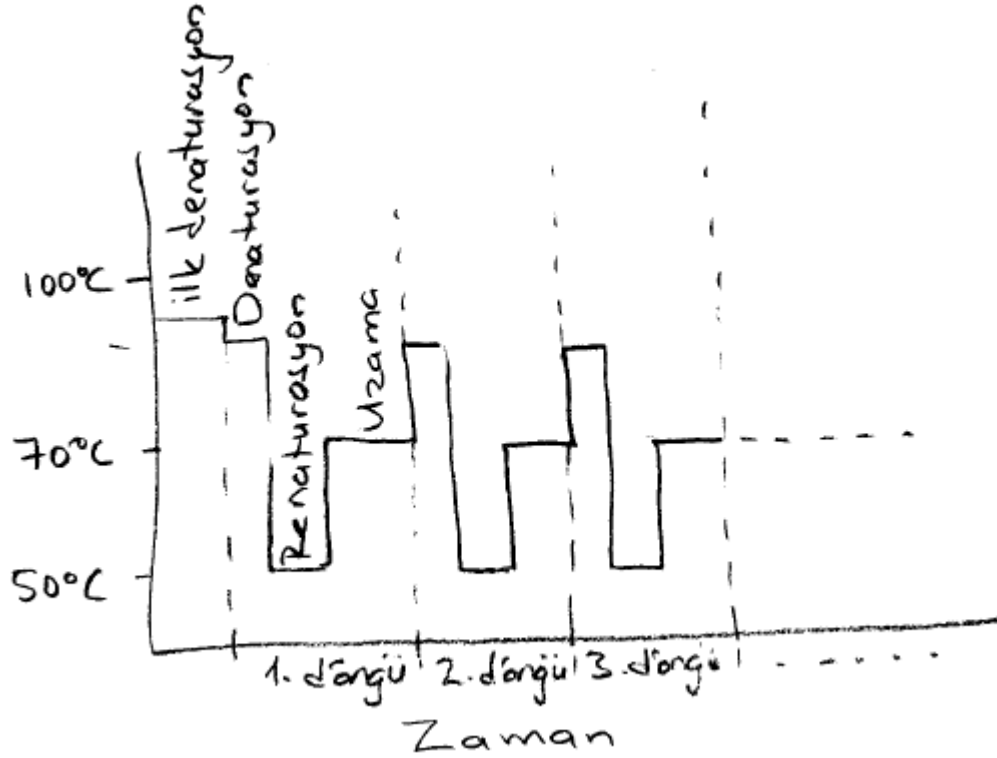
Isı dayanıklı DNA polimeraz PZR döngüsü sırasında maruz kalacağı denatürasyon sıcaklıklarına (94°C civarında) belli bir süre boyunca dayanıklı olmalıdır yani polimeraz aktivitesini kaybetmemesi gerekir. Aslında 1980'li yıllarda hipertermofilik bakteri *Thermus aquaticus*'un DNA polimerazı (*Taq* DNA polimeraz) saflaştırıldıktan sonra PZR tekniği geliştirilebilmiştir. Bu gün için farklı özelliklere sahip çok sayıda ısı dayanıklı DNA polimeraz PZR işlemlerinde kullanılmaktadır. Isı dayanıklı DNA polimerazlar 30 civarında döngü şeklinde gerçekleşen PZR işlemlerinde her döngüde yüksek denatürasyon sıcaklığına maruz kalmasına rağmen hala polimeraz aktivitesini korur.

dNTP'ler kalıp DNA molekülünün her bir zincirinin komplementerini primerlerin ucundan itibaren sentezlemek için kullanılan yapıtaşlarıdır: dATP, dCTP, dGTP ve dTTP.

Isı döngücü cihazı (thermal cycler) her bir PZR döngüsünün üç basamağının yürütülmesi için gerekli optimum sıcaklığı tam olarak ve hızlı bir şekilde sağlamak üzere tasarlanmış programlanabilir cihazlardır. PZR işleminin etkili bir şekilde yürütülmesi ve hızlı bir şekilde tamamlanması için gereklidir.

PZR işlemi, her biri 3 basamaktan oluşan 25-35 defa tekrarlanan döngüsel bir işlemdir. Bir test tüpüne kalıp DNA, primerler, dNTP'lar, tampon ve ısı dayanıklı DNA polimeraz enzimi eklendikten

sonra reaksiyon karışımı ısı döngücüsüne yerleştirilir. İlk döngü başlamadan önce genellikle bir **ilk denaturasyon** işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem kalıp DNA'nın yeterince denature olması (zincirler arasındaki hidrojen bağlarının kopması) için uygulanır, 94-95°C civarında bir-iki dakikalık bir süredir. Her döngü üç basamaktan meydana gelir: Denaturasyon, renaturasyon (annealing) ve uzama (extension) (Şekil 8.1)



Şekil 8.1: PZR işlemi sırasında döngüsel olarak tekrarlanan basamaklar.

Denaturasyon 94°C civarında 10-15 saniye ısıtılarak gerçekleştirilir. Bu işlem sonrasında tüp içerisinde bulunan bütün çift zincirli DNA molekülleri tek zincirli hale dönüşür, denatüre olur. Test tüpü içinde kalıp DNA moleküllerine ait tek zincirler ve tek zincirli primerler yüzer durumdadır.

Renaturasyon (annealing), tek zincirli komplementer DNA moleküllerinin eşleşmesine izin veren sıcaklığın sağlandığı basamaktır. Bu sıcaklık (erime sıcaklığı, T_m) her bir primer için spesifik olup 45-65°C arasında bir değerdir. Bu basamakta primerler tek zincirli DNA'ların komplementer bölgelerine bağlanırlar. Bu basamağın sonunda kalıp DNA molekülleri üzerinde birer adet primer bağlanmış durumdadır. Primerlerin 3' ucunda OH grupları vardır.

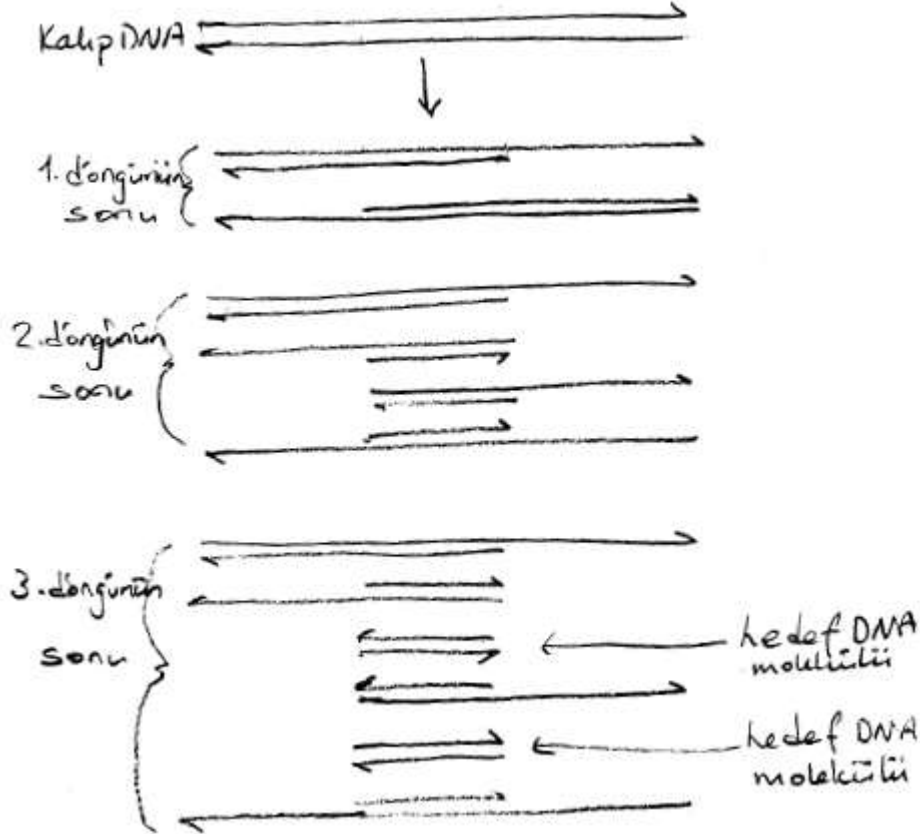
Uzama (extension) basamağında sıcaklık ısı dayanıklı DNA polimerazın optimum reaksiyon sıcaklığına yükseltilir ki bu farklı enzimler için 68-75°C arasında bir sıcaklıktır. Bu basamak sırasında ısı dayanıklı DNA polimeraz bağlı primerlerin 3' OH ucuna kalıp DNA'nın komplementeri olan nükleotitleri tek tek bağlayarak komplementer bir zincir sentezler. Uzama basamağının sonunda başlangıçtaki kalıp DNA sayısı iki katın çıkarılmış olur.

Her döngüde tüpteki DNA miktarı iki katına çıkar ve bir sonraki döngüde kalıp olarak kullanılır (Şekil 8.2). Dolayısıyla reaksiyon tüpündeki DNA miktarı her döngüde üssel olarak artar. Döngüler ilerledikçe iki primerin arasında kalan DNA bölgesi büyüklüğündeki DNA molekülleri baskın hale geçer ve 30 döngü sonrasında tüpün içindeki DNA moleküllerinin tamamına yakını iki primer arasından oluşan DNA molekülleridir. Bir PZR reaksiyon tüpündeki DNA tiplerinin sayılarını bir formülle hesaplamak mümkündür:

$$\text{Hedef DNA sayısı} = 2^n - 2n \text{ (n, döngü sayısı)}$$

Tek bir kalıp DNA molekülüyle başlayan bir PZR reaksiyonunda farklı döngülerdeki hedef DNA sayıları aşağıdaki gibidir:

- 1. Döngü $2^1 - 2 \cdot 1 = 2 - 2 = 0$
- 2. Döngü $2^2 - 2 \cdot 2 = 4 - 4 = 0$
- 3. Döngü $2^3 - 2 \cdot 2 = 8 - 6 = 2$
- 5. Döngü $2^5 - 2 \cdot 5 = 32 - 10 = 22$
- 10. Döngü $2^{10} - 2 \cdot 10 = 1024 - 20 = 1004$
- 30. Döngü $2^{30} - 2 \cdot 30 = 1073741824 - 60 = 1073741764$.



Şekil 8.2: Bir PZR işleminin ilk 3 döngüsünde sentezlenen DNA tipleri.

30 döngü sonunda sentezlenen yaklaşık 1 milyar molekülde sadece 60'ı istenmeyen molekül olup diğerleri iki primer arasından oluşan hedef DNA molekülüdür. Bu şekilde bir PZR işlemiyle çoğaltılmış DNA karışımına **amplikon** da denir. Bir amplikon içindeki istenmeyen DNA molekülleri hedef DNA molekülünden daha büyük olduğu için jel elektroforezle ayrılarak saflaştırılabilir. Ancak bir amplikon içerisindeki istenmeyen DNA moleküllerinin oranının çok düşük olması bu amplikonun saflaştırılmadan da kullanılabilmesine imkân sağlar.

8.2 PZR klonlama

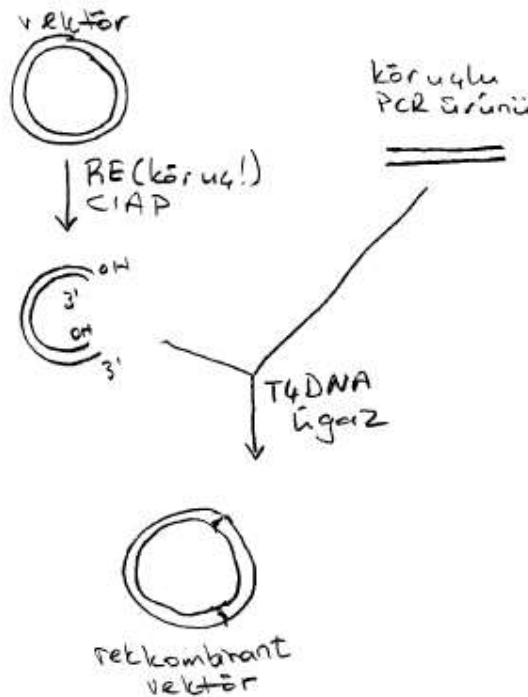
Klonlanmak istenen bir gen bölgesi veya diğer bir DNA molekülünün tamamının baz dizisi veya bu molekülün her iki ucundan birer primer uzunluğundaki bölgenin baz dizisi bilinebiliyorsa, PZR olağanüstü etkili bir yöntem sağlar. Bir çift primer kullanılarak sadece hedef DNA molekülü milyarlarca kopya olarak çoğaltılabilir. Elde edilen amplikondan elde edilecek bir klon kütüphanesinin hemen tamamına yakını hedef geni taşıyan klonlardan oluşacaktır. Eğer bir DNA molekülü hakkında

PZR amplifikasyonu uygulayacak kadar bilgiye sahipsek bu durumda PZR klonlama uygulanır. Bunun için öncelikle hedef DNA, PZR ile çoğaltılır. Bir amplikon içinde istenmeyen DNA molekül sayısı çok az olduğu için doğrudan klonlama işlemlerine geçmek mümkündür. Ancak amplikon bir jelde yürütülürse hedef DNA ayrı bir band olarak ayrışacaktır. Bu band, jel saflaştırma yöntemleriyle saflaştırılarak sadece hedef DNA molekülünden oluşmuş bir DNA stoku elde edilebilir. Sonra bu fragmentler bir vektöre ligasyonla bağlanır.

Bir amplikon elde ederek bir DNA bölgesinin klonlanması şeklinde bir stratejisi uygulanacaksa sentezlenecek DNA moleküllerin doğruluk oranları önemlidir. Eğer bir geni klonlandıktan sonra o genin kodladığı proteinin ekspresyonu hedefleniyorsa sentez sırasında doğruluk kontrolünün sıkı bir şekilde yapıldığı bir ısı dayanıklı DNA polimeraz kullanılmalıdır. Sözgelimi *Taq* DNA polimeraz gevşek bir şekilde doğruluk kontrolü yapan bir enzimdir (3'-5' ekzonükleaz aktivitesi yoktur), ortalama her 10000 bazda bir hata yapar. Bunun anlamı PZR ile çoğaltılan fragmentlerin bir kısmının nokta mutasyon taşıyacağıdır. PZR fragmentlerinde mutasyon oranlarını düşük tutmak için daha sıkı doğruluk kontrolü yapan bir ısı dayanıklı DNA polimeraz enzimi kullanmak önemlidir. Sözgelimi arkean *Pyrococcus furiosus*'dan izole edilen *Pfu* DNA polimeraz, *Taq* DNA polimeraza göre daha yüksek doğrulukta DNA sentezi gerçekleştirir ve böyle bir amaç için tercih edilmesi gerekir.

Elde edilen bir amplikona ait DNA moleküllerinin klonlanması için yaygın kullanılan iki yöntem kör uç PZR klonlama ve T/A PZR klonlamadır.

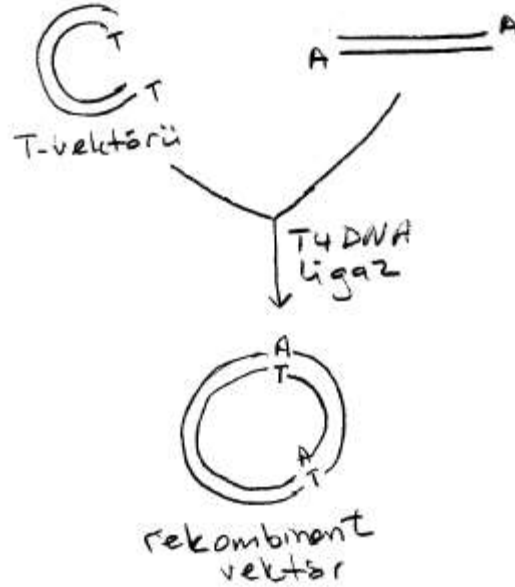
Kör uç PZR klonlama yöntemi, kör uçlu PZR ürünü DNA'yı kör uç oluşturacak şekilde kesilmiş bir vektöre bağlayarak klonlamayı amaçlayan bir yöntemdir. Kör uç oluşturulmuş bir vektöre ile kör uçlu PZR fragmentlerinin ligasyonunun nadir gerçekleşen bir olaydır (Şekil 8.3). Ancak fragmentlerin tamamı aynı DNA molekülleri olduğu için az sayıda klon elde edilse bile klonların tamamı hedef DNA molekülünü taşıyacaktır. Dolayısıyla eğer PZR ile çoğaltılmış olan DNA'nın uçları kör ise kör uç ligasyonu yeterince etkili bir yöntemdir.



Şekil 8.3: Bir amplikona ait kör uçlu bir DNA fragmentinin kör uçlu oluşturulan bir vektöre ligasyonu.

T/A PZR klonlama yöntemi, 3' uçlarına A nükleotit eklenmiş PZR fragmentlerinin klonlanmasında kullanılan bir yöntemdir. *Taq* DNA polimeraz gibi bazı enzimler uzama aşamasında

sentezledikleri DNA zincirinin 3' ucuna bir adet fazladan A nükleotiti ekler. Dolayısıyla DNA fragmentlerinin ucu tek bazlık bir yapışkanlık özelliğine sahiptir. Bu fragmentler, doğrusallaştırılarak 3' ucuna bir T nükleotit eklenmiş bir vektör ile T/A komplementerliğine sahip olacaktır (Şekil 8.4). Bu iki fragment karıştırıldığında uçlarda 1 bazlık da olsa bir yapışkanlık oluşur ve bu durum ligasyon verimliliğini kör uç ligasyonuna göre önemli oranda artırır. Böylece 3' A uzantısında sahip PZR fragmentleri T vektörlerine etkili bir şekilde klonlanabilir.



Şekil 8.4: T/A klonlama. Bir amplikona ait 3' A uzantısı olan bir DNA fragmentinin T-vektörüne ligasyonu.

Bazı durumlarda bir amplikon farklı DNA moleküllerinden meydana gelmiş olabilir. Sözgelimi bir çevresel DNA karışımından 16S rRNA geni gibi DNA bölgeleri universal primerlerle çoğaltıldığında çok sayıda farklı organizmaya ait DNA bölgeleri aynı amplikon içinde çoğaltılabilmektedir. Böyle bir fragment karışımından bütün organizmaların DNA moleküllerini temsil eden bir klon kütüphanesi elde edilmek isteniyorsa bu durumda fragmentler ligasyon öncesinde linker, adaptör veya homopolimer eklenerek yapışkan uçlu hale getirilmesi daha etkili bir yöntem olacaktır.

Her ne yöntemle olursa olsun hedef DNA moleküllerinin vektöre ligasyonu sonrasında genel klonlama basamakları (Bölüm 6.1) uygulanarak bir klon kütüphanesi elde edilir. Aynı DNA moleküllerini taşıyan amplikonlardan elde edilen klonlar teorik olarak sadece hedef DNA molekülünü taşır. Gerekli görüldüğü takdirde bir gen kütüphanesinden doğru klonun belirlenmesi için uygulanan yöntemler (Bölüm 6.2) uygulanarak klonların doğruluğu araştırılabilir.

9 Klonlanmış DNA Moleküllerinin Analizi

Klonlanmış bir DNA molekülünü konak hücreler içinde çoğaltmak ve izole etmek oldukça basit ve etkili bir işlemdir. Dolayısıyla klonlanmış bir DNA molekülünü birçok analiz yapmak için yeterli ve saf bir şekilde sağlamakta herhangi bir sınırlama mevcut değildir. Klonlanmış bir DNA molekülüne uygulanacak analizlerden biri restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin sayılarını ve kesme pozisyonlarını belirleme diğer bir ifadeyle restriksiyon fragment boy polimorfizmini (RFLP, restriction fragment length polymorphism) belirleme analizidir. Diğer yandan klonlanmış DNA fragmentinin daha küçük bir bölgesi tekrar klonlanabilir. Yine klonlanan genin veya DNA bölgesinin nükleotit dizisi (baz dizisi) DNA dizileme yöntemleriyle belirlenebilir. Dizisi belirlenmiş DNA moleküllerinin hangi genetik bilgileri taşıdığı, hangi düzenleyici bölgeleri bulundurduğu, hangi zincirin kodlayıcı diziyi taşıdığı gibi bilgiler biyoinformatik paket programlar yardımıyla belirlenebilir. Ayrıca klonlanan bu DNA molekülü üzerinde kontrollü mutasyonlar oluşturulabilir, bazı DNA dizileri eklenebilir veya çıkarılabilir. Sonuç olarak klonlanmış bir DNA molekülü üzerinde birçok analizler yapılabilir. Bu bölümde ve sonraki bölümlerde klonlanmış bir DNA molekülü üzerine yapılan analizlere örnekler verilecektir.

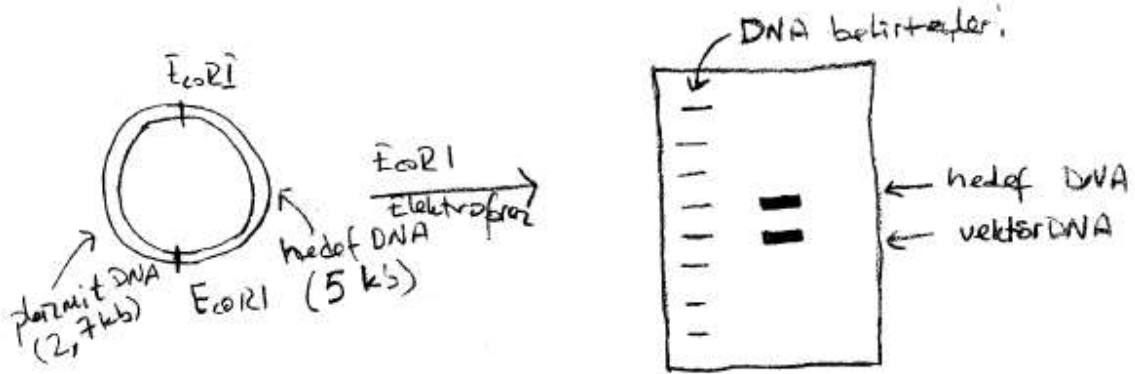
9.1 Restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin varlığı ve pozisyonlarının belirlenmesi

Baz dizisi bilinmeyen bir genomik DNA veya cDNA klonlandıysa, dizisi bilinmeyen bu DNA molekülünün hangi restriksiyon endonükleaz ile kesildiği ve kesme pozisyonlarının nerede olduğunu belirlemek ilk yapılacak analizlerden biridir. Bu bilgi nispeten büyük olan klonlanmış DNA molekülünün daha küçük bir parçasının yeniden klonlamasını yapmak için gerekli bilgiyi sağlayacaktır. Klonlanmış bir DNA molekülünün belli bir bölgesinin tekrar klonlanması işlemlerine **alt klonlama** denir. Sözelimi klonlanmış bir genom parçası 5 kb büyüklüğünde ve hedef gen bölgesi de 1 kb büyüklüğünde ise sadece hedef gen bölgesini içeren bir alt klon daha kullanışlı olabilir. Bu durumda uygun büyüklükteki bir fragment şeklinde hedef geni elde etmek için büyük DNA fragmenti belli restriksiyon endonükleazlarla kesilerek küçültülür. Doğru restriksiyon endonükleazların hangisi/hangileri olduğuna karar vermek için, kullanılabilir olan restriksiyon endonükleazların kesim pozisyonlarının bilinmesi gerekir. Restriksiyon endonükleazlara ait tanıma dizilerinin pozisyonlarının belirlenmesi işlemine **restriksiyon endonükleaz haritalama** denir.

Restriksiyon haritalama çalışmalarına geçmeden önce bir klonun vektör kısmı hedef DNA'dan ayrılmalıdır. Bu, restriksiyon endonükleaz haritalamada vektör DNA kısmının karışıklığa neden olmaması için önemlidir. Klonlama sırasında vektör ve hedef DNA tek bir yapışkan uç oluşturan enzimle kesildikten sonra ligasyonla birbirine bağlanmışsa aynı enzimle kesilerek vektör ve hedef DNA'nın ayrılması sağlanabilir. Şekil 9.1'de *EcoRI* enzimi ile kesilmiş bir vektöre aynı enzimle kesilmiş bir DNA fragmentinin ligasyonu ile elde edilen bir klon (rekombinant vektör) verilmektedir. Bu vektör *EcoRI* enzimi ile kesilirse, vektör ve hedef DNA parçalarına ayrılacaktır. Vektörün pUC19 olduğunu varsayarsak büyüklüğü yaklaşık 2.7 kb (2686 bp) olacaktır. Hedef DNA fragmentinin büyüklüğü de 5 kb olarak kabul edilmiştir. Sonra jel elektroforaz ortamında vektör ve hedef DNA bantları ayrı bir şekilde görülebilir (Şekil 9.1)

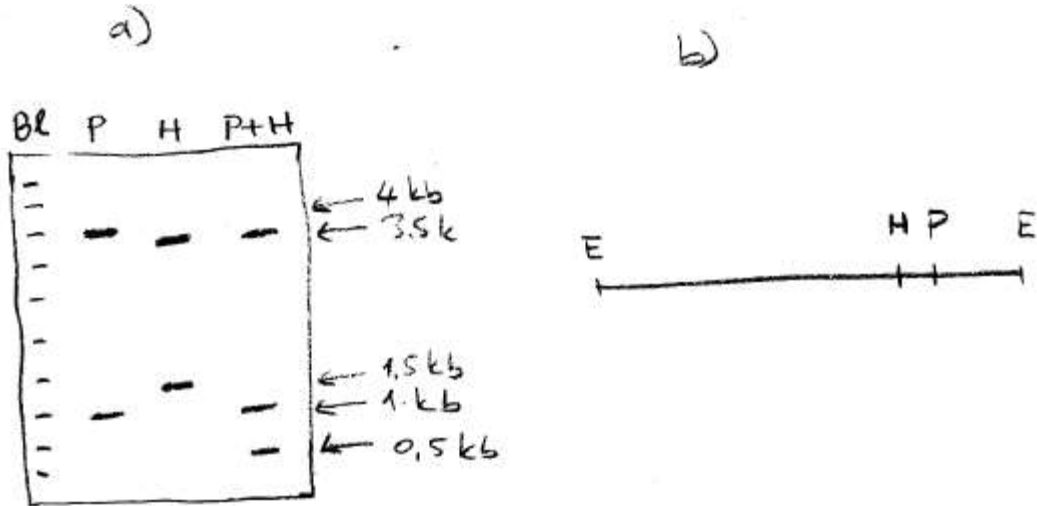
Ancak kör uç kullanılarak veya homopolimer eklenerek ligasyon yapılacaksa hedef DNA'nın vektörden ayrılabilmesi için ilave önlemlerin alınması gerekebilir. Bazı durumlarda bu önlemler yardımıyla vektör ve hedef DNA molekülleri ayrılabilir. Ayrıca hedef DNA, pUC19 gibi bir vektörün

çoklu klonlama bölgesinin ortasındaki bir tanıma dizisi içine bağlanırsa klonlama noktasının her iki tarafından kesen diğer enzimler kullanılarak bu işlem başarılabılır.



Şekil 9.1: Klonlanmış 5 kb büyüklüğündeki bir hedef DNA'nın vektörden ayrılması. Klonlamanın vektör ve hedef DNA'nın *EcoRI* enzimi ile kesilerek yapıldığı ve *EcoRI* enziminin vektörü ve hedef DNA'yı iç kısımlardan kesmediği varsayılmıştır.

Restriksiyon haritalama için hedef DNA molekülü belirlenmiş endonükleazlarla önce ayrı ayrı kesilir. Sonra ilgili restriksiyon endonükleazlarla ikiye veya üçerli olarak kesilir. Oluşacak fragment büyüklükleri jel elektroforezle belirlenir (Şekil 9.2a). Oluşan fragment büyüklükleriyle enzim kimlikleri karşılaştırılarak kesim pozisyonları belirlenir (Şekil 9.2b).



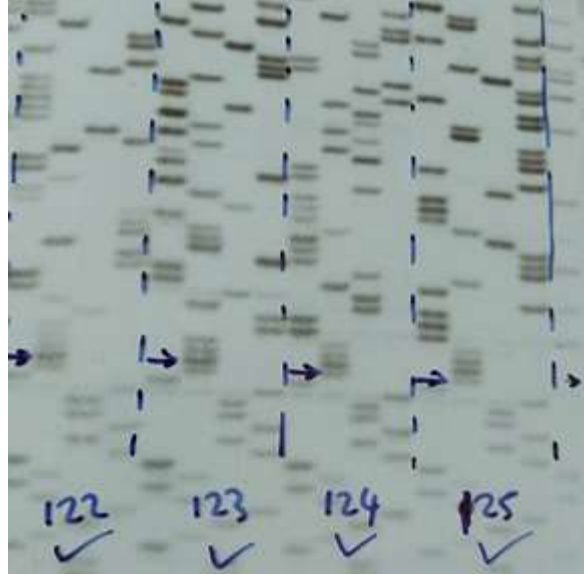
Şekil 9.2: a) 5 kb büyüklüğündeki klonlanmış bir DNA molekülünün farklı enzim kombinasyonlarıyla kesilmesinden sonra oluşan DNA fragmentlerinin jel elektroforez görünümü. Hedef DNA'nın *EcoRI* ile kesilerek vektörden ayrıldığı varsayılmıştır. H, *HindIII*; P, *PstI* ve E, *EcoRI* restriksiyon endonükleazları ifade etmektedir. Bl, DNA büyüklük belirteçleridir. Jelin sağ tarafında fragment büyüklükleri gösterilmiştir. b) Jel elektroforez fragment büyüklüklerinden faydalanılarak oluşturulmuş hedef DNA'ya ait restriksiyon endonükleaz haritası.

Klonlanmış bir DNA'nın taşıdığı belli bir gene ait dizinin hangi alt fragmentte olduğu biliniyorsa bu alt fragment o genin taranması için prob olarak kullanılabilir. Bu gen bir başka organizmadan klonlanmak istediğinde oluşturulan genom kütüphanesinde hangi klonunun bu geni taşıdığını belirlemek üzere bu alt fragmentlerden uygun olanı (prob) nükleik asit hibridizasyonu amacıyla kullanılabilir. Sözgelimi hedef gen, iki *HindIII* fragmentinden küçük olanının içindeyse bu fragment filogenetik olarak yakın akraba genlerin belirlenmesi için prob olarak kullanılabilir.

9.2 Klonlanmış DNA molekülünün nükleotit dizisinin belirlenmesi

Bir DNA molekülü üzerinde genetik bilginin konumunun belirlenebilmesi için öncelikle o DNA molekülünün nükleotit dizisinin (baz dizisinin) bilinmesi gerekir. Eğer baz dizisi bilinmeyen bir DNA molekülü klonlanmışsa bu DNA molekülünün baz dizisinin belirlenmesi öncelikle yapılması gereken bir iştir. Baz dizisi analiz edilerek gen bölgelerinin konumları, sınırları ve kodon dizileri belirlenir. Kodon dizisi belirlendikten sonra bu genin kodlayacağı polipeptitin amino asit dizisi belirlenir. Bu primer amino asit dizisinden faydalanılarak protein molekülünün katlanma özellikleri ve sonuçta fonksiyonel konformasyonu tahmin edilebilir. Bu analizlerin her birinin yapılabilmesi için biyoinformatik yöntemler kullanılır. Farklı paket programlar kullanılarak çok çeşitli analizler yapmak mümkündür. Bunlardan bazıları bu bölüm içerisinde özetlenecektir.

1970'lerden bu yana DNA dizileme teknolojisi olağanüstü bir gelişme göstermiştir. Maxam ve Gilbert tarafından (1977) geliştirilen yöntemde DNA yapısına katılan bazların modifikasyonu ve sonrasında bu bazların özel kimyasallarla kesilerek farklı büyüklükte fragmentlerin elde edilmesi esasına dayalı bir yöntem uygulanmıştır. Ancak Sanger ve arkadaşları tarafından geliştirilen (1977) metot daha yaygınlaşmış ve dizileme teknolojisinin gelişmesini sağlamıştır. Dideoksi zincir sonlandırma (Sanger dizileme) olarak isimlendirilen bu metot, bir kalıp DNA zincirinin komplementlerinin sentezlenmesi reaksiyonlarına dideoksi NTP'lar (ddNTP) katılarak sentezi sonlandırılmış farklı büyüklükte fragmentlerin elde edilmesi esasına dayanır. Her bir reaksiyon tüpüne eklenecek dNTP'lardan biri radyoaktif olarak işaretlenir ve böylece yeni sentezlenmiş zincirlerin bir jeldeki yeri radyoaktif olarak belirlenebilir hale getirilir. Her 4 dNTP için dört farklı reaksiyon tüpü hazırlanır ve her bir tüpe 4 dNTP'tan biri için dideoksi olan (3' OH) grubu olmayan nükleotitler eklenir. Bir tüpe hangi ddNTP eklendiyse o tüpte o nükleotitin bulunduğu bölgelerin her birinde sonlanmış çok sayıda kısa fragment oluşur. 4 farklı tüpteki bu reaksiyon karışımları içindeki farklı büyüklükteki DNA zincirleri poliakrilamid jel elektroforez ile birbirinden ayrılır ve her birinin sıralaması radyograflar üzerinde görüntülenerek nükleotit sırası belirlenir (Şekil 9.3).



Şekil 9.3: Dideoksi zincir sonlandırma (Sanger) yöntemi ile elde edilmiş DNA dizileme reaksiyon karışımlarının içindeki farklı büyüklükteki fragmentlerin poliakrilamid jeli üzerindeki konumunu gösteren radyograf. Her bir dizileme için 4 reaksiyon karışımı yüklenmiştir. Her dördüncü yol grubu bir birinden kesik çizgilerle ayrılmıştır. Her dördüncü sırada ddNTP sıralaması C-G-A-T şeklindedir. Jelin tabanından yukarı doğru nükleotit (baz) sırası 5'-3' yönünde okunur. Sözgelimi 123 numaralı dizi işaretli noktadan itibaren 5' GGGTTGACCTGGG...3' şeklinde okunur.

Sonraki yıllarda Sanger yöntemi geliştirilerek daha etkili hale getirilmiştir. Sözelimi radyoaktif işaretleme yerine kimyasal işaretleme kullanılmıştır. Her bir ddNTP'a farklı tip floresan oluşturan gruplar eklenerek bir dizileme reaksiyonunun tek bir tüp içinde gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ayrıca kapiller sistemlerde reaksiyon karışımı yürütülmüş sistemden çıkan moleküllerin ucundaki ddNTP'nin spesifik floresan ışımaya tipi, lazer sistemleriyle belirlenip kaydedilen otomatik okuma sistemleri geliştirilmiştir. İnsan genom projesi bu otomasyon sistemleriyle daha hızlı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Başlangıçta bu yöntemle 200-300 baz uzunluğunda diziler elde edilebiliyorken sonraki gelişmelerden sonra 700-800 baz kadar uzunlukta diziler elde edilebilmektedir.

2000'li yılların başından itibaren yeni nesil dizileme (NGS, next generation sequencing) yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin esas dizilenmek istenen DNA molekülünü küçük parçalara ayırmak, bir mikro-yonga üzerinde her bir fragmentin kopyalarını oluşturmak, bu kopyalardan nispeten kısa (ortalama 150 baz) diziler elde etmek ve son olarak da bu dizileri paket programlar kullanarak çıkartmak esasına dayanır. Bu NGS yöntemlerinin yaygın olanlarından birinin işleyişi şöyle özetlenebilir:

- i) İlk olarak bir fragment kütüphanesi oluşturulur. Bunun için hedef DNA (sözelimi bir kromozom) enzimatik olarak veya sonikasyon gibi fiziksel bir yöntemle küçük parçalara ayrılır ve fragmentlerin her iki ucuna (5' ve 3') adaptör denilen kısa diziler eklenir.
- ii) Sonra bu fragmentler adaptörlerin komplemeteri olan kısa dizilerin sabitlendiği bir mikro-yongaya transfer edilir. Bir mikro-yonga üzerine milyonlarca fragment böylece komplemeterlik esasına göre tutturulur. Bu zincirlerin komplemeteri, çip üzerinde sabitlenmiş olan komplemeter adaptörün sağladığı 3' OH uçlarından itibaren katı faz PCR denilen bir yöntemle sentezlenir. Tekrarlayan döngülerden sonra çipin belli bir bölgesinde belli bir fragmentin her iki zincirinin kopyaları oluşturulur. Bu basamak klonal amplifikasyon olarak adlandırılır.
- iii) Daha sonra adaptörlerle komplemeter olan evrensel primerler fragmentlerin uçlarına hibritleşerek hidrojen bağlarıyla bağlanır. Bağlanan primerin 3' OH grubundan itibaren yeni zincir sentezi başlatılır. Yeni sentezlenecek zincire katılacak dNTP'ların her birinin 3'OH ucuna özel bir floresan bileşik bağlanır. Her nükleotit bağlandığında 3' ucu floresan bileşik tarafından bloke edildiğinden zincir uzaması durur bu bölgede hangi nükleotit bağlanmışsa onun taşıdığı floresan moleküle ait sinyal algılanır ve kaydedilir. Sonraki basamakta bağlı floresan madde yapıdan enzimatik olarak koparılır ve sıradaki komplemeter nükleotit bağlanır, bağlanan yeni nükleotide ait floresan bileşiğin verdiği sinyal kaydedilir ve bu olay döngüsel olarak (ortalama 150 defa) tekrarlanır. Bu basamaktaki dizileme şekline sentez yoluyla dizileme de denmektedir.

Mikro-yonganın bütün farklı bölgelerinden gelen çok farklı sinyaller aynı anda birbirinden bağımsız olarak kaydedilir. Dolayısıyla aynı anda çok sayıda fragmente ait diziler eş zamanlı olarak belirlenebilir. Bu kaba diziler daha sonra özel yazılımlarla analiz edilmek üzere korunur.

Burada Sanger dideoksi zincir sonlandırma yöntemi ve yeni nesil dizileme (NGS) yöntemlerinin temelleri özetlenmiştir. Bütün DNA dizileme yöntemlerinin ayrıntıları bu ders notlarının sonunda verilen kaynaklardan ve verilmeyen diğer kaynaklardan araştırılabilir.

9.3 DNA dizilerinin biyoinformatik analizi

Dizisi belirlenmiş bir DNA molekülü, restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin sayıları ve pozisyonları, şifrelenmiş genetik bilgi, düzenleyici diziler ve filogenetik ilişkileri gibi özellikler bakımından moleküler biyoloji paket programları kullanılarak analiz edilebilir. Verinin büyüklüğüne

göre basit veya daha kapasiteli paket programlara ihtiyaç duyulabilir. Bu paket programlardan bir kısmı lisansı alınarak kullanılabilir. Ancak daha basit ve genel analizlerin yapılabilirdiği serbest kullanıma açık yazılımlar da vardır. Bunlardan birisi olan pDRAW32 (<https://www.acaclone.com/>) birçok analizin yürütülebildiği bir paket programdır. Yine Amerika Birleşik Devletleri Ulusal Biyoteknoloji Bilgi Merkezi (NCBI, National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) biyomedikal ve genomik bilgiye ulaşım sağlayan serbest bir ağ kaynağıdır. NCBI veri tabanları üzerinde birçok genetik bilgiye ulaşmak ve analizler yapmak mümkündür.

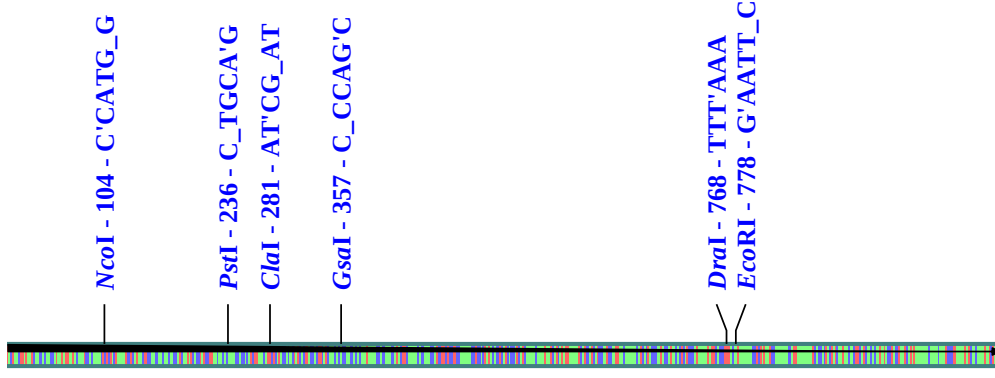
Baz dizileri, belli bir veri tabanında analiz edilmek istendiğinde bazen özel bir başlık satırı biçimine ihtiyaç duyar. Yaygın kullanılan dizi biçimlerinden biri FASTA biçimidir. Bu biçimde dizinin analiz yazılımı tarafından tanınabilmesi için özel bir başlık satırına ihtiyaç vardır. Şekil 9.4'te FASTA formatına uygun bir başlık satırı içeren *Escherichia coli recA* geninin bir kısmına ait dizi verilmiştir. Başlık satırının ">" karakteriyle başladığına dikkat ediniz.

```
>NC_000913.3:2822708-2823769 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655,
complete genome
TTAAAAATCTTCGTTAGTTTCTGCTACGCCTTCGCTATCATCTACAGAGAAATCCGGCGTTGAGTTCGGG
TTGCTCAGCAGCAACTCACGTACTTTCTTCTCGATCTCTTTTCGCGGTTTCCGGGTTATCTTTTCAGCCAGG
CAGTCGCATTTCGCTTTACCCTGACCGATCTTCTCACCTTTGTAGCTGTACCACGCGCCTGCTTTCTCGAT
CAGCTTCTCTTTTACGCCCAGGTCAACAGTTCGCCGTAGAAGTTGATACCTTCGCCGTAGAGGATCTGG
AATTCAGCCTGTTTAAACGGCGCAGCGATTTTGTCTTTCACCACTTTTCACGCGGGTTTCGCTACCCACCA
CGTTTTTCGCCCTCTTTACCGCGCCGATACGACGGATGTGAGACGAACAGAGGCGTAGAATTCAGCGC
GTTACCACCGGTAGTGGTTTCCGGGTTACCGAACATCACACCAATTTTCATACGGATCTGGTTGATGAAG
ATCAGCAGCGTGTTGGACTGCTTCAGGTTACCGGCCAGCTTACGCATCGCCTGGCTCATCATACGTGCCG
CAAGGCCCATGTGAGAGTCGCCGATTTTCGCCTTCGATTTCCGCTTTTCGGCGTCAGTGCCGCCACGGAGTC
AACGACGATAACGTCTACTGCGCCAGAACGCGCCAGGGCGTCACAGATTTCCAGTGCTGCTCGCCGGTG
TCCGGCTGGGAGCACAGCAGGTTGTGATATCGACGCCCAGTTTACGTGCGTAGATTGGGTCCAGCGCGT
GTTTCAGCATCGATAAACGCACAGGTTTACCTTCACGCTGCGCTGCGGCGATCACCTGCAGCGTCAGCGT
GGTTTTACCGGAAGATTCCGGTCCGTAGATTTTCGACGATACGGCCCATCGGCAGACCACCTGCCCAAGC
GCGATATCCAGTGAAAGCGAACCGGTAGAGATGGTTTCCACATCCATGGAACGGTCTTCACCCAGGCGCA
TGATGGAGCCTTTACCAAATTGTTTCTCAATCTGGCCCAGTGCTGCCGCCAACGCTTTCTGTTTGTTC
GTCGATAGCCAT
```

Şekil 9.4: *E. coli recA* geninin FASTA biçiminde düzenlenmiş baz dizisi. Başlık satırında: >, FASTA biçimini; NC_000913.3, genom projesinde *recA* genine verilmiş ismi; 2822708-2823769, genin genom üzerindeki pozisyonunu; sonraki kısım (*Escherichia coli* str. K-12 substr. MG1655) genin kaynağı olan organizmayı ve son kısım dizinin sağlandığı kaynağı (complete genome) ifade etmektedir.

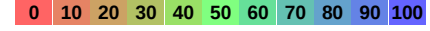
Belli bir gen veya belli bir DNA fragmentine ait dizi belirlendikten sonra bir paket program kullanarak bazı analizler yürütülebilir. Bunlardan bazıları şunlardır:

- Restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri ve konumları (Şekil 9.5),
- Okuma satırlarının ve doğru açık okuma satırının belirlenmesi (Şekil 9.6),
- Sanal jel elektroforez (Şekil 9.7),
- DNA benzerliğinin belirlenmesi (Şekil 9.8),
- Polipeptit benzerliğinin belirlenmesi (Şekil 9.9) ve
- Filogenetik ilişkinin belirlenmesi (Şekil 9.10) gibi.



E. coli recA 1062 bp

GC% in 2 bp blocks



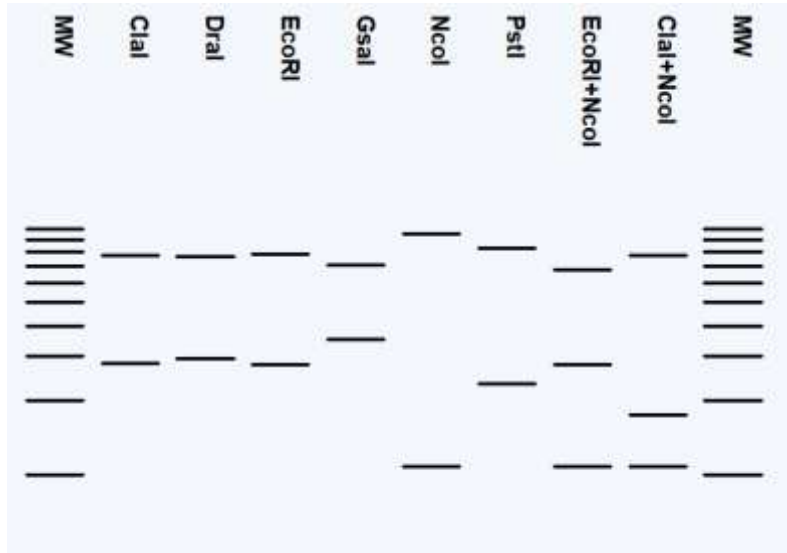
Şekil 9.5: *E. coli recA* gen bölgesinin restriksiyon endonükleaz tanıma dizisinin konumunu gösteren moleküler harita. Sadece tek noktadan kesen seçilmiş enzimlere ait tanıma dizileri verilmiştir. Gene ait açık okuma çerçevesi (satırı) soldan sağa doğru uzayan çizgi olarak gösterilmiştir. Şekil üzerindeki renkli dikey bandlar ilgili bölgenin GC oranlarını işaret etmektedir. pDRAW32 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

1	ATGGCTATCG	ACGAAAACAA	ACAGAAAGCG	TTGGCGGCAG	CACTGGGCCA																		
	TACCGATAGC	TGCTTTTGT	TGTCTTTCGC	AACCGCCGTC	GTGACCCGGT																		
	M	A	I	D	E	N	K	Q	K	A	L	A	A	A	L	G	Q	Frame 1					
	W	L	S		T	K	T	N		R	K	R		W	R	Q	H	W	A	R	Frame 2		
		G	Y	R		R	K	Q		T	E	S	V		G	G	S		T	G	P	Frame 3	

		H	S	D		V	F	V		F	L	F	R		Q	R	C		C	Q	A	Frame 4	
		?	P	*	R		R	F	C		V	S	L		T	P	P	L		V	P	G	Frame 5
		?	A	I		S	S	F	L		C	F	A		N	A	A		A	S	P	W	Frame 6
51	GATTGAGAAA	CAATTTGGTA	AAGGCTCCAT	CATGCGCCTG	GGTGAAGACC																		
	CTAACTCTTT	GTAAACCAT	TTCCGAGGTA	GTACGCGGAC	CCACTTCTGG																		
	I	E	K	Q	F	G	K	G	S	I	M	R	L	G	E	D	R	Frame 1					
	L	R	N		N	L	V	K	A	P	S		C	A	W		V	K	T	Frame 2			
	D	*	E	T		I	W	*	R	L	H		H	A	P	G		*	R	P	Frame 3		

	L	N	L	F		L	K	T		F	A	G		D	H	A	Q		T	F	V	Frame 4	
	S	Q	S		V	I	Q	Y		L	S	W		*	A	G		P	H	L	G	Frame 5	
	I	S	F		C	N	P		L	P	E	M		M	R	R		P	S	S		Frame 6	

Şekil 9.6: *E. coli recA* geninin ilk 100 bç'lik bölgesindeki okuma çerçeveleri (satırları). Her iki zincir üzerindeki olası 3 okuma çerçevesi de gösterilmiştir. Çerçeve 1 RecA polipeptidinin oluşması için gerekli genetik bilgiyi taşımaktadır ve vurgulanmıştır. pDRAW32 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.



Şekil 9.7: *E. coli recA* geninin sanal jel elektroforez görünümü. MW 100 bç molekül ağırlık belirteçidir, her bir bandın büyüklüğü 100 bç'den 1000 bç'ye doğrudur. Tek ve çift RE enzim kesimleri üstte belirtilmiştir. pDRAW32 paket programı kullanılarak oluşturulmuştur.

```

E. coli recA, 1062 bp. (LINEAR)
*****
Orf#    =      1
Frame  =      1
Start  =      1
End    =    1060
Length =    1059 bp
MW     =    37973 dalton
A280   =    19520 /M/cm reduced, 19709 /M/cm oxidised
MAIDENQKALAAALGQIEKQFGKGSIMRLGEDRSMDEVETISTGSLSLDI  50
ALGAGGLPMGRIVEIYGPESSGKTTTLTLQVIAAAQREGKTCAFIDAEHAL 100
DPIYARKLGVDIIDNLLCSQPDTEQALEICDALARSGAVDVIVVDSVAAL 150
TPKAEIEGEIGDSHMGLAARMMSQAMRKLGNLQKQNTLLIFINQIRMKI  200
GVMFGNPETTTGGNALKFYASVRLDIRRIGAVKEGENVVGSETRVKVVKKN 250
KIAAPFKQAEFQILYGEINFGELVDLGVKEKLEKAGAWYSYKGEKIG  300
QGGANATAWLKDNPEAKEIEKKVRELLLSNPNSTPDFSVDDSEGVAETN  350
EDF*
*****

```

Şekil 9.8: *E. coli recA* geninin ürünü olan polipeptitin amino asit dizisi. pDRAW32 paket programı kullanılarak belirlenmiştir.

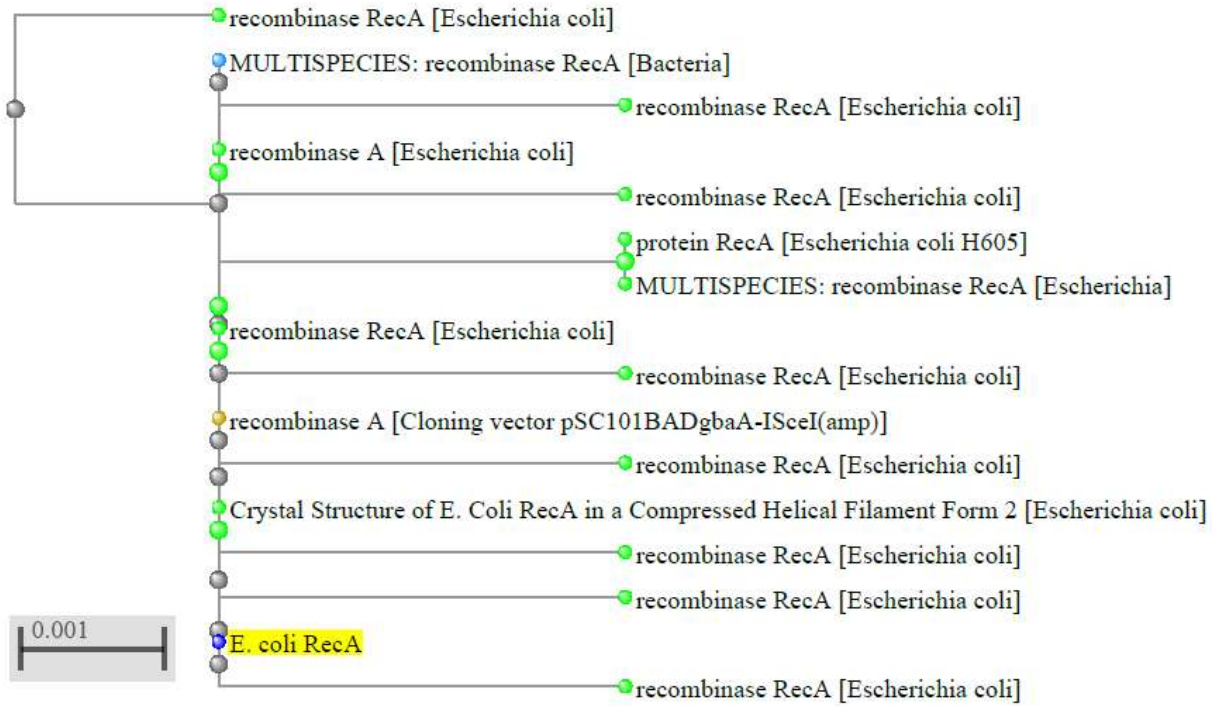
Rekombinant DNA Teknolojisi

☒ select all	100 sequences selected		GenBank	Graphics	Distance tree of results	MSA Viewer			
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Escherichia coli strain P2-T31 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4935193	CP006710.1
☒	Escherichia coli strain EC98 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4856296	CP006400.1
☒	Escherichia coli strain p67 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651959	CP006897.1
☒	Escherichia coli strain B3710-D chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651959	CP006898.1
☒	Escherichia coli strain p62 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651959	CP006896.1
☒	Escherichia coli strain p74 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651960	CP006895.1
☒	Escherichia coli strain p625 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651959	CP006898.1
☒	Escherichia coli strain p84 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651958	CP006893.1
☒	Escherichia coli strain p67 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4651960	CP006896.1
☒	Escherichia coli strain O157:H7 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4672986	CP006429.1
☒	Escherichia coli strain EC-VC1308-398 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4837477	CP006434.1
☒	Escherichia coli strain AH21 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4726888	CP006171.1
☒	Escherichia coli strain EC600-se30 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4600187	CP007926.1
☒	Escherichia coli strain B72113 chromosome, complete genome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4624857	CP007957.2
☒	Escherichia coli strain Colwell149 chromosome	Escherichia coli	1962	1962	100%	0.0	100.00%	4733683	CP007988.1

Şekil 9.9: *E. coli recA* geniyle en yakın benzerliğe sahip genlerin listesi. NCBI Blastn aracı kullanılarak oluşturulmuştur. Benzerliği en yüksek olan 15 gen listelenmiştir.

select all 100 sequences selected		GenPept	Graphics	Distance tree of results	Multiple alignment	MSA Viewer			
	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	DNA strand exchange and recombination protein with endonuclease activity [Escherichia coli AFEC_Q1]	Escherichia coli	718	718	99%	0.0	100.00%	358	AD302129.1
☒	protein RecA [Escherichia coli H925]	Escherichia coli	718	718	99%	0.0	99.72%	358	Q5L46426.1
☒	recombinase A [Cloning vector pBC19.1/BDG465-15catanor]	Cloning vector p	717	717	99%	0.0	100.00%	364	CAL33728.1
☒	recombinase A [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	100.00%	357	VFT67925.1
☒	recombinase RecA [Bacteria]	Bacteria	717	717	99%	0.0	100.00%	353	VFP_000963143.1
☒	Crystal Structure of E. Coli RecA in a Compressed Helical Filament Form 2 [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	100.00%	356	3J93_A
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	99.72%	353	EEV5579328.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	99.72%	353	VFP_000963722.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	99.72%	353	EEV5579328.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	99.72%	353	VFP_000963153.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	717	717	99%	0.0	99.72%	353	VFP_000963216.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	716	716	99%	0.0	99.72%	353	VFP_117491536.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	716	716	99%	0.0	99.72%	353	VFP_044005706.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	716	716	99%	0.0	100.00%	372	Q0284087.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	716	716	99%	0.0	99.72%	353	VFP_136208925.1
☒	recombinase RecA [Escherichia coli]	Escherichia coli	716	716	99%	0.0	99.72%	353	EEV5579328.1

Şekil 9.10: *E. coli RecA* polipeptitiyle en yakın benzerliğe sahip polipeptitlerin listesi. NCBI Blastp aracı kullanılarak oluşturulmuştur. Benzerliği en yüksek olan 15 polipeptit listelenmiştir.



Şekil 10.11: RecA polipeptitinin en yüksek homolojiye sahip 15 polipeptit ile ilişkisini gösteren filogenetik ağaç. NCBI Blastp aracı kullanılarak Fast Minimum Evolution yöntemiyle oluşturulmuştur.

Bazı durumlarda klonlanmış bir geni taşıyan rekombinant vektörün taşıdığı korunmuş DNA dizilerinin ve konumlarının belirlenmesi gerekebilir. Sözelimi promotor, operatör, ribozom bağlanma dizisi, transkripsiyon başlama dizisi, transkripsiyon terminasyon dizisi ve transkripsiyon dur sinyali dizisi gibi.

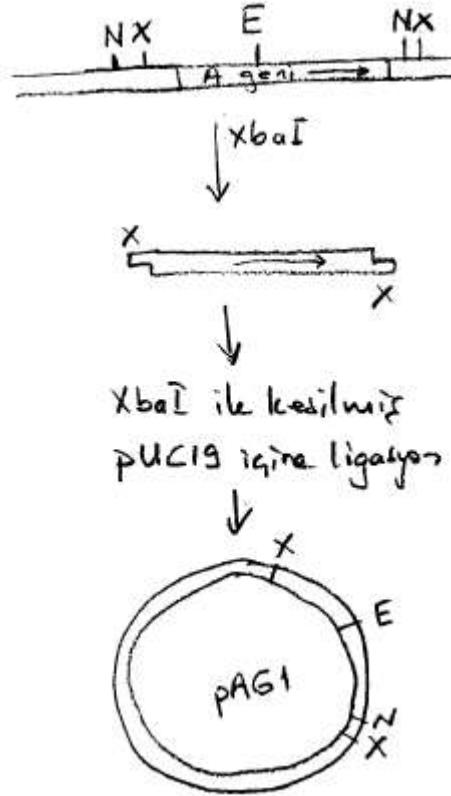
9.4 Alt klonlama ve manipülasyon

Belli bir gen bölgesi veya diğer bir hedef DNA fragmenti, klonlanmış bir DNA fragmentinin daha küçük bir bölgesi olabilir. Bu durumda sadece hedef gen bölgesini daha küçük bir fragment olarak yeniden klonlanması uygun olabilir. Klonlanmış bir DNA molekülünden daha küçük bir DNA molekülünü izole ederek çoğaltmak işlemine **alt klonlama** denir. Alt klonlama daha küçük bir hedef DNA bölgesi sağlaması bakımından oldukça kullanışlıdır. Sözelimi 3 kb büyüklüğündeki bir DNA molekülünün 1 kb büyüklüğündeki bir bölgesinde yer alan bir *a* geni hedef bölge olabilir. Restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi pozisyonları belirlendikten sonra bu hedef gen bölgesi daha küçük bir fragment olarak alt klonlanabilir (Şekil 10.12).

Şekil 10.12’de görüldüğü gibi genin her iki tarafından kesen enzimler kullanılarak hedef bölge diğer bölgelerden ayrılabilir. Sonra bu fragment aynı enzimle kesilmiş bir vektöre bağlanabilir. Bu örnekte *XbaI* enzimiyle kesilmiş ve elektroforetik olarak ayrılmış *a* genini içeren 1 kb büyüklüğündeki hedef fragment izole edildikten sonra yine *XbaI* ile kesilerek 5’ uçları defosforile edilmiş bir klonlama vektörüne ligasyonla bağlanır. Böyle bir alt klonlama işlemi için pUC serisi vektörler kullanılabileceği gibi uygun restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi bulunan diğer klonlama vektörleri de kullanılabilir. Yine fragment üzerinde bulunan *Nsbl* dizisi veya *Nsbl*+*XbaI* dizileri de alt klonlama için kullanılabilir. Her bir durumda aynı enzimlerle kesilmiş bir vektöre ligasyon yapılabilir. Kör uç ligasyonu yapılacaksa vektörü ve hedef fragmenti aynı enzimle kesmeye ihtiyaç duyulmaz. Sözelimi *a* gen bölgesi *Nsbl* enzimiyle kesildiğinde bu fragment *SmaI* enzimiyle kesilmiş bir vektöre bağlanabilir (*Nsbl* ve *SmaI* enzimlerinin her ikisi de kör uç oluştururlar). İki farklı kör uç oluşturan enzimle kesilen iki DNA

molekölü ligasyonla bağlandığında bu iki enzimden hiçbirisi rekombinant molekülü bağlanma bölgesinden kesmez, ligasyondan sonra her iki tanıma dizisi de bozulur.

Sonuçta elde edilen alt klon konak hücrelere transfer edilerek seçici besiyerinde koloniler şeklinde elde edilir. Teorik olarak elde edilen alt klonların tamamı hedeflenen rekombinant vektörü taşır.



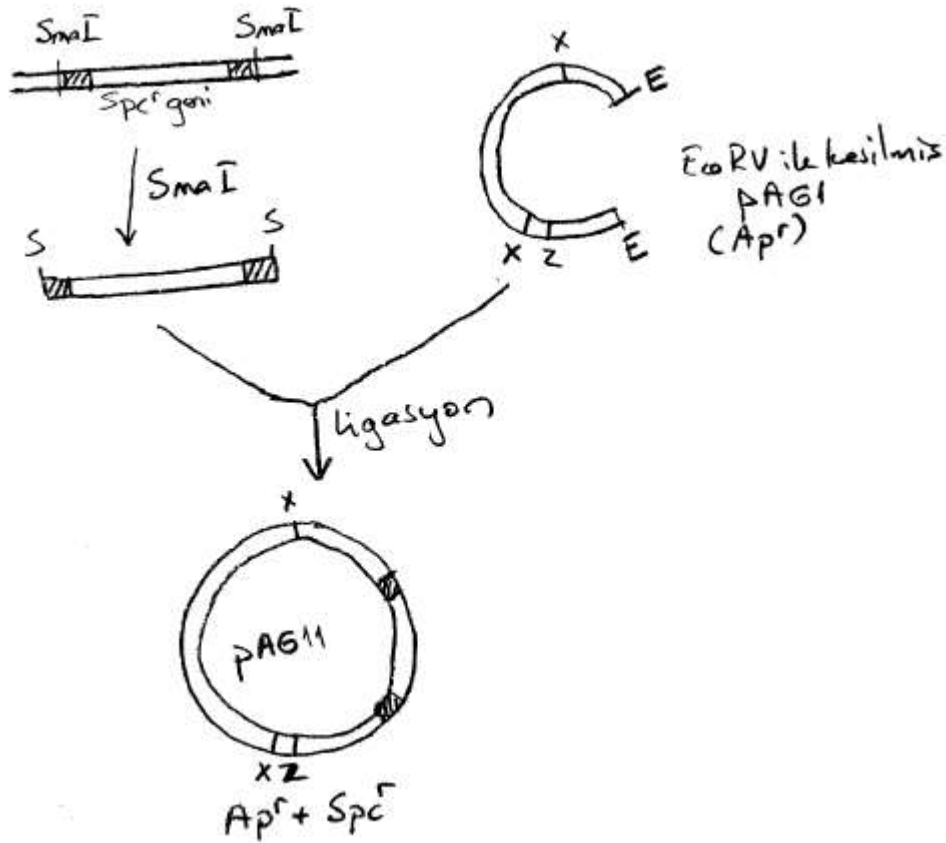
Şekil 10.12: Klonlanmış bir DNA fragmentinin daha küçük bir bölgesinin vektöre ligasyonu. Hedef *a* gen bölgesini kesen enzimler: N, *Nsbl*; X, *XbaI*; E, *EcoRV*. *Nsbl* ve *EcoRV* kör uç oluşturan enzimlerdir. *XbaI* yapışkan uç oluşturan ve pUC19 vektörünü çoklu klonlama bölgesinden kesen bir enzimdir. Elde edilen rekombinant vektör pAG1 olarak adlandırılmıştır.

Klonlanmış bir gen bölgesi üzerinde bazı genetik değişiklikler uygulanabilir (manipülasyonlar yapılabilir). Hedef fragmentin belli bir bölgesine ilave DNA bölgeleri eklenebilir veya belirlenen bir bölgeden belli bir DNA bölgesi çıkarılabilir. Eklenen DNA dizileri bir gene ait kontrol dizileri, ribozom bağlanma dizileri, transkripsiyon durdurma dizileri veya translasyon durdurma dizileri olabilir. Hatta belli bir genin aşağısına veya yukarısına veya iç kısmına başka bir geni içeren bir DNA molekülünün tamamı eklenebilir. Eklenen bu gen belli bir metabolik basamağı yürüten bir proteini kodluyor olabileceği gibi belli bir antibiyotiğe direnç sağlayan bir proteini de kodlayabilir.

Yaygın DNA ekleme gerekçelerinden bir tanesi bir hedef geni mutasyona uğratmaktır. Hedef genin belli bir bölgesi silinerek veya genin içine başka bir DNA molekülü eklenerek mutasyon gerçekleştirilebilir. Mutant geni taşıyan hücrelerin pozitif seçimi için mutasyona uğratılacak genin içine eklenecek DNA molekülünün bazı genetik sinyaller içeren moleküller olması tercih edilir. Bu amaçla kullanılan DNA moleküllerinden biri omega kaseti olarak isimlendirilen 2 kb büyüklüğündeki bir DNA molekülüdür.

Omega kaseti bir interpozon dizisi olup DNA fragmentinin orta kısmında spektinomisin direnç geni (*spc^r*) taşır (Şekil 10.13). Fragmentin her iki ucunda tekrarlayan transkripsiyon ve translasyon

sonlandırma dizileri vardır. Yine fragmentin her bir ucundan birer defa kesen restriksiyon endonükleazlara ait tanıma dizileri yer alır. Bu restriksiyon endonükleazlar kullanılarak bu fragment başka bir DNA bölgesine bağlanabilir. Omega fragmenti bir defa bağlandığında o bölgeden mRNA sentezini durdurur ve ayrıca fragmentin ortasında yer alan *spc^r* geninden dolayı spektinomisin direnci sağlar. Kör uç oluşturan *SmaI* ile kesilen omega fragmenti hedef genin kör uç oluşturan bir enzimle kesilen bölgesine ligasyonla bağlanabilir. Alt klonlama ile elde edilmiş olan pAG1 incelenirse (Şekil 10.12) *a* geninin ortasına yakın bir noktadan kör uç oluşturan *EcoRV* tanıma dizisinin mevcut olduğu görülür. Bu alt klon *EcoRV* ile kesilip 5' uçları defosforile edildikten sonra *SmaI* ile kesilmiş omega fragmentiyle bağlanabilir (Şekil 10.13). Bu yolla elde edilen pAG11 rekombinant vektöründe *a* geni mutasyona uğramış durumda olacaktır. Ayrıca bu ekleme işlemi yeni rekombinant vektöre ampisilin direncinin yanında spektinomisin direncini de kazandıracaktır. Sonuçta rekombinant vektör konak hücreye transfer edilerek ampisilin ve spektinomisin varlığında pozitif olarak seçilebilir.



Şekil 10.13: Omega interpozonunun yerleştirilmesiyle bir *a* geninin mutasyonu. *SmaI* ile kesilmiş omega interpozonu *EcoRV* ile kesilmiş pAG11 vektörüne ligasyonla bağlanmıştır. Omega interpozonunun (sol taraf) üzerindeki taranmış bölgeler transkripsiyon ve translasyon durdurma sinyal dizilerini temsil etmektedir. Elde edilen pAG11 vektörü spektinomisin (omega interpozonundan) ve ampisilin (pUC19 vektöründen) dirençlidir. S, *SmaI* ve E, *EcoRI* tanıma dizisini temsil etmektedir.

10 Klonlanmış Genlerin Ekspresyonu

Gen klonlanmanın temel amaçlarından biri klonlanan genin belli bir konak sisteminde ekspresyonu olabilir. Ekspresyon çalışmasının sonunda elde edilmek istenen son ürün RNA veya protein olabilir. Ancak daha yaygın olarak ekspresyon son ürünü olarak bir genin kodladığı polipeptitin elde edilmesi hedeflenir. Klonlanan genin hangi konak sisteminde ekspresyonunun yapılacağı öncelikle önemlidir. Gen klonlama ve manipülasyon çalışmalarında yaygın konak sistemleri prokaryotik hücrelerdir ki bunlar arasında *Escherichia coli* hücreleri en yaygın kullanılan konak sistemleridir. Buna rağmen amaca uygun olarak fungus, bitki ve hayvan hücreleri de konak sistemi olarak kullanılabilir. Klonlanmış bir genin ekspresyonunun nasıl yapılacağı stratejisini geliştirirken hangi tip konak hücrenin kullanılacağı öncelikle belirlenmelidir. Her hücre tipine göre farklı olan vektör sistemleri için özel bir klonlama stratejisine ihtiyaç vardır.

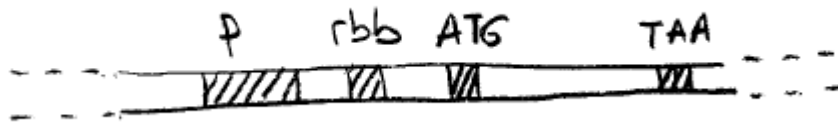
10.1 Ekspresyon vektörleri

Klonlanmış bir gen eğer transkripsiyon ve translasyon için gerekli olan promotor, ribozom bağlanma dizisi ve translasyon başlama kodon dizisi uyumluysa herhangi bir vektöre bağılıyken konak hücre içinde ekspresyonu kendiliğinden gerçekleşebilir. Ancak bu durumda ekspresyon düzeyi çok düşük olacaktır. Eğer hedef gene ait ekspresyon için gerekli diziler konak hücrelerin enzimleriyle uyumlu değilse böyle bir genin ekspresyonu bu konak sisteminde mümkün olmayacaktır. Bir genin kodladığı RNA veya proteinin yüksek ölçeklerde ekspresyonu özel olarak tasarlanmış vektörler kullanılarak gerçekleştirilir.

Hedef genin etkili bir şekilde ekspresyonunun yapılabilmesi için öncelikle uygun bir vektöre ligasyonu gereklidir. Belli bir genin etkili bir şekilde ekspresyonunu yapmak üzere geliştirilmiş vektörlere **ekspresyon vektörleri** denir. Ekspresyon vektörleri daha fazla protein sentezlenmesini sağlamak üzere tasarlanmışlardır. Bir ekspresyon vektörü replikasyon orijini, antibiyotik direnç geni ve restriksiyon endonükleaz tanıma dizileri gibi temel özelliklere sahiptirler. Bu vektörler ayrıca yabancı bir genin bir konak hücrede (*E. coli* gibi) ekspresyonu için özel dizilere sahip olmalıdır:

- i) Promotor dizisi,
- ii) Ribozom bağlanma dizisi ve
- iii) Translasyon başlama kodonu dizisi.

Ribozom bağlanma dizisinin aşağısına (3' tarafına) doğru bir pozisyona bağlanırsa, hedef DNA'nın ekspresyonu yapılır (Şekil 10.1). Böyle bir vektöre klonlanacak bir DNA hangi dizilere sahip olduğuna bağlı olarak promotorun hemen aşağısına, rbb'nin hemen aşağısına veya açık okuma çerçevesini kaydırmadan ATG bölgesinin aşağısına bağlamak mümkündür. Ekspresyon vektörüne bağlandıktan sonra uygun bir konak hücre içinde hedef genin büyük miktarlarda ekspresyonu yapılacaktır.



Şekil 10.1: Bir ekspresyon vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgesinin şematik görünümü. P, promotor; rbb, ribozom bağlanma bölgesi; ATG, translasyon başlama sinyali ve TAA, translasyon durdurma sinyali.

Klonlama vektörlerinin aksine ekspresyon vektörleri konak hücrede daha az sayıda kopya olarak bulunur fakat çok daha yüksek oranlarda transkripsiyona izin verir. Ekspresyon vektörlerini yüksek oranda ekspresyonu gerçekleştirebilmek için ilave bazı özelliklere de sahip olmalıdır. Bunlar aşağıda özetlenmektedir:

1. Güçlü bir promotora sahip olmalıdır. Hedef genin mRNA'ya transkripsiyonunun yapılabilmesi için RNA polimerazın genin yukarısındaki doğru bölgeye bağlanmasını sağlar. Genin yukarısında RNA polimerazın bağlandığı bu bölge promotor olarak adlandırılır. Genel olarak promotorlar güçlü ve zayıf promotorlar olarak gruplandırılabilir. Zayıf promotorlar birim zamanda daha az mRNA sentezine izin verirken güçlü promotorlardan çok daha fazla sayıda mRNA sentezlenir. Ekspresyon vektörlerinde yaygın kullanılan promotorlara *lacZ* promotörü, Lambda P_L promotörü ve T7 promotörü örnek verilebilir.
2. Promotor düzenlenebilir olmalıdır. Yüksek miktarda mRNA sentezi ve bunun sonucu olarak yüksek oranda protein sentezi konak hücrenin metabolik kaynaklarının çoğunu harcar. Bu durumda konak hücrelerin uzun süre hayatta kalması zorlaşır. Bu nedenle konak hücre kültürü belli bir düzeyde gelişene kadar ekspresyon vektörü üzerinden düşük bir düzeyde transkripsiyon yapması gerekir. Kültür yeterince geliştikten sonra ise genin transkripsiyonunun hızlandırılması gerekir. Bu nedenle ekspresyon vektörüne bağlanacak olan hedef genin transkripsiyonunun kontrol edilebiliyor olması istenir. Bunun için promotörün hemen aşağısında ve hedef gen dizisinin hemen yukarısında bir operatör bölge mevcut olmalıdır. Belli efektör moleküllerin yokluğunda operatör bölgesine bir baskılayıcı protein bağlanır ve düşük düzeyde bir transkripsiyon gerçekleşir. Ortama efektör molekül eklendiğinde ise baskılayıcı protein operatörden ayrılarak yüksek miktarda transkripsiyon gerçekleşir. Dolayısıyla ortama bir efektör molekül ekleyerek düşük düzeyde olan transkripsiyon oranı istenen zamanda artırılabilir. Çoğu ekspresyon sisteminde *lac* operatör dizisi promotörün aşağısına eklenir. Ortamda efektör molekül (IPTG) yokken bir baskılayıcı protein operatöre bağlanır ve ancak minimal düzeyde bir transkripsiyon gerçekleşebilir. IPTG eklendiğinde ise baskılayıcı protein operatörden ayrılır ve yüksek düzeyde ekspresyon gerçekleşir.

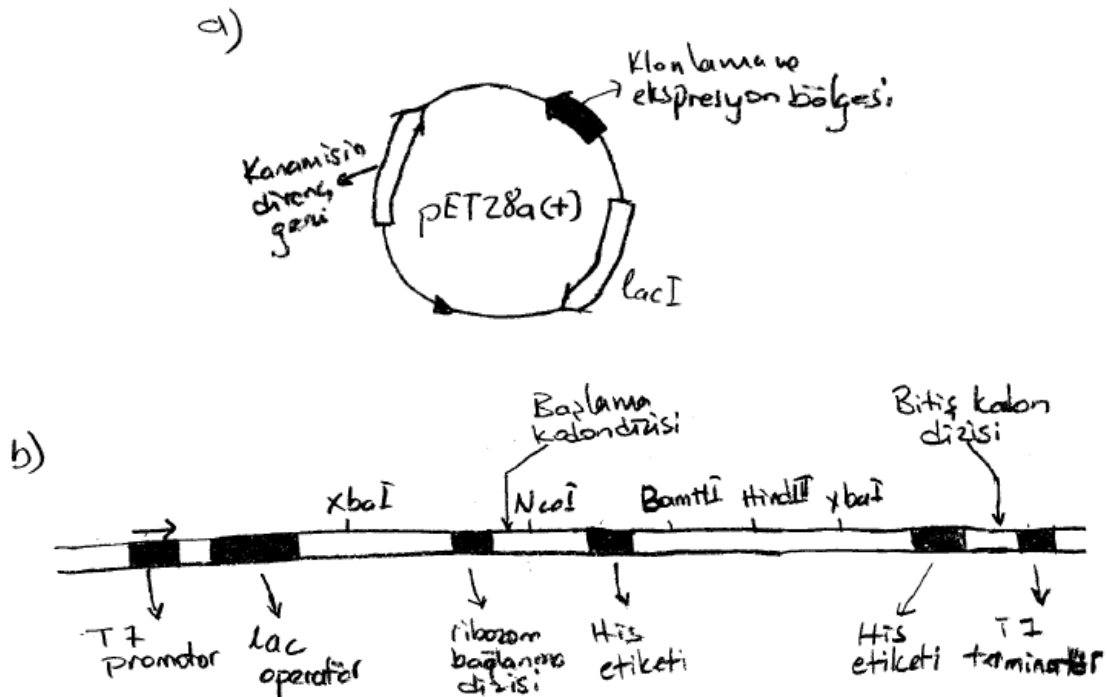
T7 promotörü virüs genomunda yer alan bir gen tarafından kodlanan T7 RNA polimeraz enzimi tarafından tanınabilir. Dolayısıyla T7 promotörü taşıyan bir ekspresyon vektörü kullanılarak bir genin ekspresyonu yapılacaksa konak hücreye viral T7 RNA polimeraz geninin eklenmesi gerekir. Konağa eklenmeden önce bu genin yukarısına *lac* operatör bölgesi eklenir. Böylece ortama IPTC eklendiğinde ancak T7 RNA polimeraz sentezlenebilir ve dolayısıyla hedef genin ekspresyonu gerçekleşebilir. IPTG eklenmediği durumda hedef genin ekspresyonu gerçekleşmez.

3. Hedef proteine saflaştırılabilir bir etiket eklenebilmelidir. Ekspresyon sonrasında hedef proteinin diğer hücre proteinlerinden ayrılarak saflaştırılabilmesi gerekir. Eğer hedef proteinin kendisi için geliştirilmiş özel bir saflaştırma yöntemi mevcut değilse, hedef proteine etiket de denilen saflaştırılabilir bir ek oligopeptit eklenir. İlave kısa bir amino asit grubu eklenmiş bu proteinlere **füzyon proteinleri** denir. Eklenecek oligopeptit için bir saflaştırma metodu mevcut olduğundan bu oligopeptit ile birleşik durumdaki hedef protein de saflaştırılabilir hale getirilir. Ekspresyon vektörlerinde yaygın kullanılan etiketler arasında 6xHis etiketi, glutation-S-transferaz (GST) etiketi, beta galaktosidaz etiketi ve tiyoredoksin etiketi sayılabilir.

10.2 Hedef genin ekspresyon vektörüne klonlanması

Bir ekspresyon vektörüne hedef geni klonlarken genin doğru bir pozisyona yerleştirilmesi gerekir. Her şeyden önce yüksek düzeyde transkripsiyon için vektörün taşıdığı güçlü promotörün aşağısına doğru okuma çerçevesi korunacak şekilde yerleştirilmelidir (Şekil 10.2a). Ayrıca ekspresyonu yapılacak genin kendi başlama kodonu ve bitiş klonunun mevcut olup olmadığı, yine genin bir ribozom bağlanma dizisi olup olmadığı ve üretilmek istenen proteine bir etiket eklenip eklenmeyeceği, hangi pozisyona klonlama yapılacağına karar vermede kritik öneme sahiptir. Sözgelimi pET28a(+) ekspresyon vektörünün bir hedef genin ekspresyonu için kullanılacağını varsayalım. Hedef proteinin amino ucuna bir 6xHis etiketi bağlanacaksa bu DNA molekülü ribozom bağlanma dizisi içermeksizin doğru okuma satırı içine *NcoI* bölgesine bağlanmalıdır (Şekil 10.2b). Eğer karboksi ucunda ikinci bir 6xHis etiketi istenmiyorsa gen kendi translasyon durdurma sinyaline sahip olmalıdır.

Klonlama yapılabilmesi için ekspresyon vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgesi içine farklı restriksiyon endonükleazlara ait tanıma dizileri yerleştirilmiştir (Şekil 10.2b). Bu diziler klonlama amaçlı olarak kullanılabilir. Ancak hedef DNA bağlandığında bu bölgede okunan doğru çerçevenin kaymıyor olması gerekir. Eğer mevcut fragment doğru okuma çerçevesini koruyamıyorsa klonlamaya geçmeden önce hedef DNA manipüle edilerek doğru çerçeveyi koruyacak hale getirilmelidir. Bunun için farklı stratejiler uygulanabilir. Bunlardan en yaygını PZR yöntemi uygulayarak genin 5' ucuna bağlanacak PZR primerini uygun bir şekilde tasarlamaktır. Bu şekilde tasarlanmış primerler kullanılarak elde edilecek fragment doğru çerçeve içinde kalacak şekilde klonlanabilir.



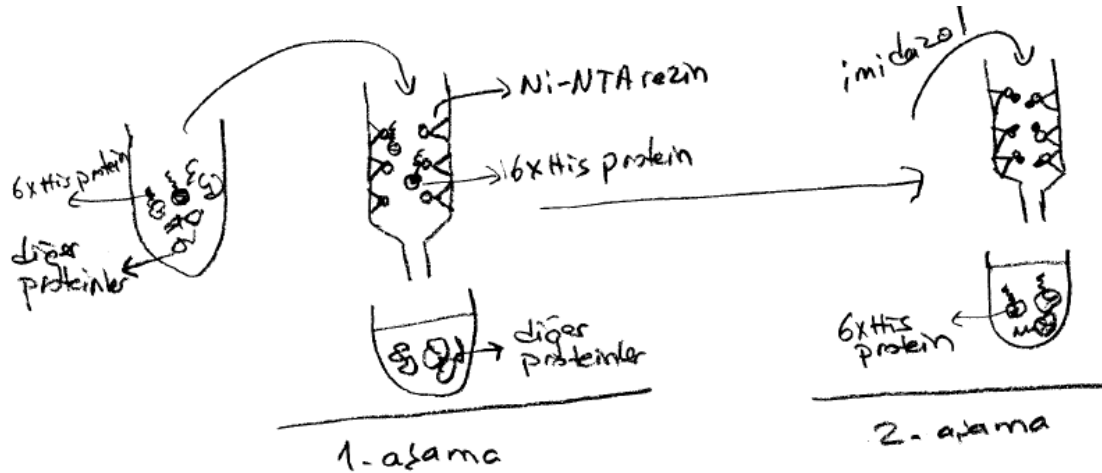
Şekil 10.1: Ekspresyon vektörü pET28a(+)'nın şematik gösterimi. a) pET28a(+) vektörünün genel özellikleri. *lacI* geni operatör bölgeye bağlanacak baskılayıcı proteini kodlar. b) pET28a(+) vektörünün klonlama ve ekspresyon bölgesinin şematik gösterimi. Özellikle bölgelerin bir kısmı seçilerek verilmiştir. Bu vektörün ekspresyon yapacağı konak hücrede T7 RNA polimeraz geninin mevcut olması gerekir.

10.3 Ekspresyonu yapılmış proteinin saflaştırılması

Yüksek ölçekte ekspresyon yapılan hücrelerde hedef proteinin miktarı daha fazladır. Ancak yine de diğer hücre proteinleriyle karışık şekilde bulunmaktadır. Bu nedenle hedef proteinin saflaştırılması

gerekir. Bunun için en tercih edilen yöntemlerden biri afinite kromatografisidir. Bu tekniğin esası bir molekülün yüksek affiniteye sahip diğer bir moleküle bağlanmaktır. Bir proteinin yüksek affinitesi olan moleküllerden biri o proteine karşı üretilmiş antikorlardır. Eğer ekspresyonu yapılan proteine karşı sentezlenmiş bir antikor varsa bu antikor bir kromatografi kolonu içine sabitlenerek hedef proteinin bağlanması için kullanılabilir. Buna örnek olarak beta-galaktosidaz, tioredoksin ve GTS verilebilir. Ancak bu yolla sadece sözü edilen bu proteinler saflaştırılabilir. Bu proteinlerin antijenik amino asit dizileri eğer bir hedef proteinin amino veya karboksi ucuna bağlanırsa iki protein molekülüne ait amino asit dizileri birleştirilmiş olur ve ekspresyon bir füzyon proteini şeklinde gerçekleşir. Dolayısıyla mevcut antikorun tanıdığı bir polipeptit hedef polipeptit ile birleştirebilirse bu antikor bu füzyon proteininin saflaştırılması için afinite kromatografide kullanılabilir. Böylece hedef protein bir füzyon proteini şeklinde saflaştırılabilir. Bu saflaştırma sonrasında hedef proteine bağlanan etiket eğer proteinin aktivitesini etkiliyorsa uzaklaştırılması gerekebilir. Farklı etiketler için farklı uzaklaştırma yöntemleri mevcuttur. Bir füzyon proteininden etiketin nasıl uzaklaştırılacağı ekspresyon vektörüne klonlama yapılmadan önce planlanmalıdır.

Füzyon proteinleri oluşturmak için kullanılan etiketlerden birisi de 6xHis etiketidir. 6xHis etiketi genellikle 6 defa peş peşe tekrarlayan histidin amino asitlerinden meydana gelir. Sonuçta hedef proteinin amino veya karboksi ucuna 6 adet histidin eklenmiş olur. Bu 6xHis etiketi çoğu durumda proteinin fonksiyonunu olumsuz etkilemez ve ikinci bir saflaştırmaya ihtiyaç duyulmaz. 6xHis dizisi spesifik olarak nikel iyonlarına bağlanırlar. Dolayısıyla bir kromatografi kolonuna Ni^{2+} iyonları Ni-NTA (nikel-nitrilotriasetik asit) rezini şeklinde sabitlenirse kolon içinden geçen 6xHis etiketi taşıyan proteinler rezine bağlı kalır ve diğerleri kolondan çıkar (Şekil 10.3). Daha sonra tampon şartlarını değiştirerek (sözgelimi imidazol ekleyerek) Ni-NTA ile 6xHis arasındaki bağlantı zayıflatılır, füzyon proteininin kolondan ayrılması ve saf olarak elde edilmesi mümkün olur.



Şekil 10.2: Ni-NTA rezin içeren bir kolon kullanılarak 6xHis etiketi taşıyan füzyon proteinlerinin saflaştırılması. Ni-NTA, nikel-nitrilotriasetik asit. Kolon matrisinde sabitlenmiş nikel tutunan 6xHis etiketli proteinlerin imidazol eklenerek nikelden ayrılması sağlanır.

Bu bölümde yabancı bir proteinin *E. coli* konak hücrelerinde ekspresyonu ile ilgili teknikler özet olarak sunulmuştur. Gerçekte olayların daha ayrıntılı olduğu ve burada sözü edilmemiş birçok diğer ayrıntının göz önünde bulundurulması gerektiği unutulmamalıdır. Sözgelimi ekspresyonu yapılacak proteinin konak hücreye hasar vermesi, konak hücre içinde doğru fonksiyonel forma dönüştürülememesi, hücresel yapılara dönüşümsüz olarak bağlanması gibi.

11 Yönlendirilmiş Mutasyon

DNA moleküllerinin nükleotit dizisinde meydana gelen kalıcı değişikliklere **mutasyon** denir. Bir mutasyonu taşıyan organizma, hücre veya gen de **mutant** olarak adlandırılır. DNA yapısı gerek iç ve gerekse dış çevresel etkilerden dolayı sürekli olarak değişir. Bu değişim oranı doğal şartlar altında çok düşüktür. Sözelimi mutasyon oranı bakterilerde 10^{-4} ila 10^{-7} gen/nesil ve insanda 10^{-4} ila 4×10^{-6} gen/nesil kadardır. Genetik araştırmalarda nispeten kısa bir zaman aralığında yeterli sayıda mutant elde etmek gerekir. Bu nedenle mutasyon oranını artırmak üzere farklı yöntemler uygulanır. Geleneksel yöntemlerin esası uygulanan mutajen miktarını ve uygulama süresini artırmaktır. Bu durumda mutasyon oranı artar. Ancak mutasyonlar genom üzerinde rasgele meydana gelir, mutasyonu hedef bir gen bölgesine yönlendirmek mümkün olmaz. Bu durumda elde edilen çok sayıda mutant arasında hedef gen bakımından mutant olan bireylerin seçilmesi, ayıklanması gerekmektedir.

Öbür yandan rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesinden sonra mutasyonlar belli bir hedef DNA bölgesine yönlendirilebilir hale gelmiştir. Böylece istenen tip bir mutasyonu genomun istenen bir bölgesine uygulamak mümkündür. Kromozom gibi büyük bir DNA molekülü yerine klonlanmış daha küçük bir hedef DNA molekülünün istenen noktalarına mutasyonlar uygulanır. Mutasyon oluşturmaın iki temel nedeninden biri genlerin hangi hücresel fonksiyonu yönettiğini anlamaktır. Diğer ise proteinlerin amino asit dizilerini değiştirerek yapısal ve fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesidir. Yönlendirilmiş mutasyon oluşturmak için çok sayıda farklı teknik geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam edilmektedir. Bu bölümde klonlanmış bir DNA molekülünün belli bir bölgesine mutasyon uygulamak için kullanılan yöntemlerden bazıları seçilerek özetlenecektir.

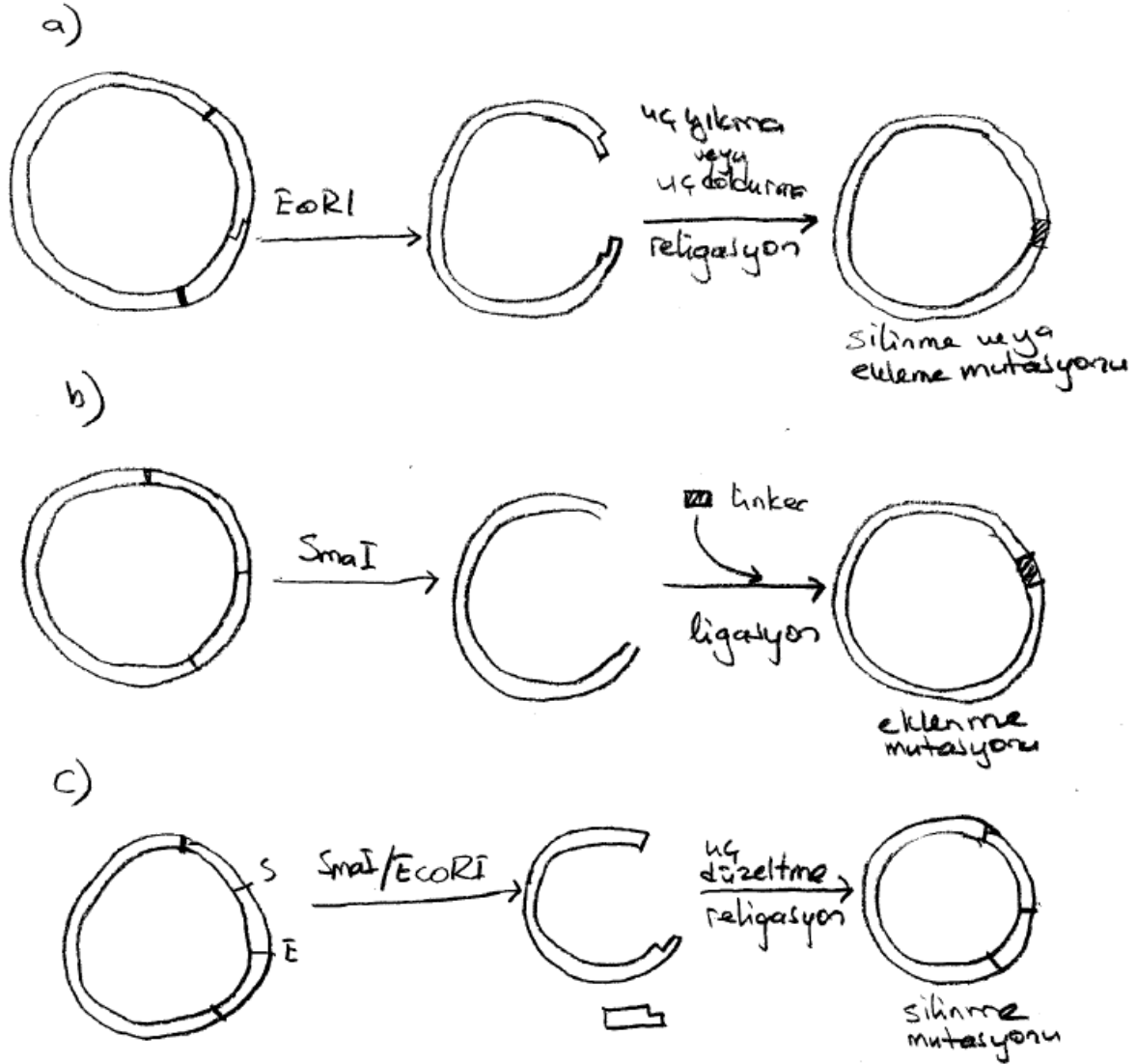
11.1 Restriksiyon endonükleazlara bağlı mutasyon

Klonlanmış bir DNA molekülünün restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin pozisyonları belirlendikten sonra bu diziler mutasyon uygulama noktaları olarak kullanılabilir. Böyle bir durumda mutasyonu hedef bölgeye yönlendirme gücü tamamen restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin pozisyonu ile sınırlıdır. Klonlanmış DNA molekülünün nükleotit dizisi belirlendikten sonra biyoinformatik analizlerle restriksiyon endonükleaz tanıma dizi pozisyonları belirlenir ve uygun bir stratejiyle hedef bölge mutasyona uğratılır.

En basit yöntemlerden biri hedef gen bölgesi ve düzenleyici dizi içindeki yapışkan uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaza ait tanıma dizisini kullanmaktır (Şekil 11.1a). Bu enzimle hedef DNA kesildikten sonra tek zincirli uçlar ya doldurularak ya da yıkılarak mutasyon oluşturulur. Sonra uçlar kör uç ligasyonu ile tekrar bağlanır. Doldurma veya yıkılma sonucunda bu dizide tek zincirli bölgenin büyüklüğü kadar DNA eklenir veya çıkarılır. Dolayısıyla bir ekleme veya silinme (delesyon) mutasyonu oluşturulabilir. Yine eğer hedef bölgede kör uç oluşturan bir restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi varsa bu dizi de mutasyonu o bölgeye yönlendirmek için kullanılabilir (Şekil 11.1b). Klonlanmış gen bu kör uç oluşturan enzimle kesilir. Uçlar kör (küt) olduğu için tekrar ligasyonla bağlanırsa herhangi bir mutasyon oluşmayacaktır. Bu durumda ya kör uçlar uygun ekzonükleazlarla birkaç baz kısaltıldıktan sonra bağlanır ya da kör uçlara linker gibi kısa bir DNA molekülü bağlanarak mutasyon gerçekleştirilir.

Hedef DNA bölgesinde çift kesen bir restriksiyon endonükleaz enzimi veya tek kesen iki farklı restriksiyon endonükleaz enzimi kullanılarak belli bir DNA parçası yapıdan uzaklaştırılarak silinme (delesyon) mutasyonları oluşturulabilir (Şekil 11.1c). Klonlanmış gen ilgili restriksiyon endonükleaz

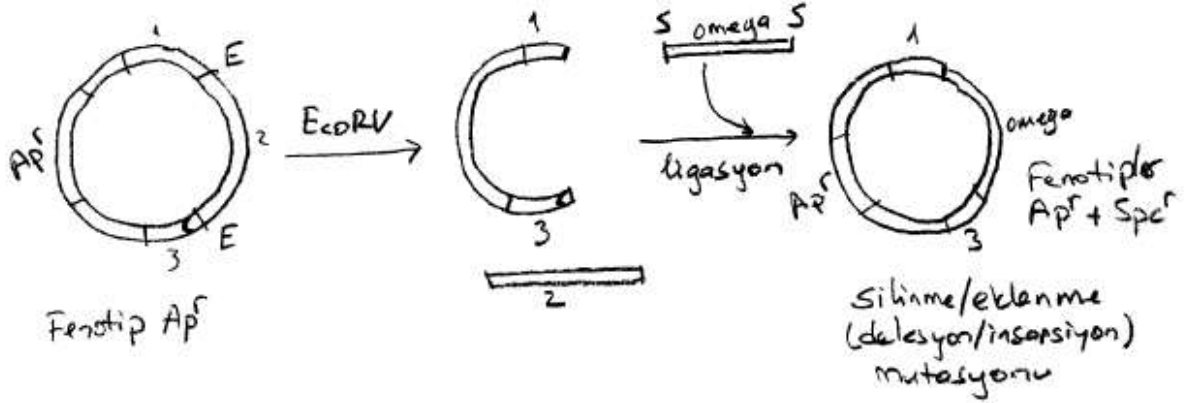
(nükleazlar) ile kesilir, istenmeyen fragment uzaklaştırıldıktan sonra uçlar tekrar bağlanır, silinme mutasyonu oluşturulur. Böyle bir uygulamada eğer iki farklı yapışkan uç oluşturan enzim veya bir yapışkan bir de kör uç oluşturan enzimler kullanıldıysa yeniden ligasyon öncesinde yapışkan olan uçların körleştirilerek uyumlu hale getirilmesi gereklidir.



Şekil 11.1: Restriksiyon endonükleazlar kullanılarak yönlendirilmiş mutasyon oluşturma yöntemleri. a) Yapışkan bir ucun doldurularak ya da silinerek ekleme veya silinme mutasyonu oluşumu. Bir klonlanmış gen içinde *EcoRI* tanıma dizisinin mevcut olduğu varsayılmıştır. b) Kör uçla kesilmiş bir DNA bölgesine kısa bir DNA molekülü (linker) bağlanarak ekleme mutasyonu oluşumu. Genin içinde bir *SmaI* tanıma dizisinin mevcut olduğu varsayılmıştır. c) Klonlanmış bir genin bir bölgesinin iki restriksiyon endonükleazla kesilerek uzaklaştırılmasıyla bir delesyon mutasyonunun oluşumu. Genin iç kısmında *SmaI* ve *EcoRI* tanıma dizilerinin mevcut olduğu varsayılmıştır. İki tanıma dizisi arasındaki DNA parçası kaybedilmiştir.

Silinme veya insersiyon mutasyonlarında mutasyon noktalarına belli büyüklükte DNA fragmentleri de eklenebilir (Şekil 11.2). Eklenecek bu DNA fragmenleri linkerler gibi kısa DNA molekülüleri olabileceği gibi omega interpozonu gibi daha büyük DNA molekülüleri de olabilir. Herhangi bir DNA molekülü eklemeyen mutasyonlar oluşturulduğunda mutantı taşıyan hücrelerin fenotipik seçimi zor olacaktır. Eğer mutasyon noktasına bir DNA molekülü eklenirse ve bu DNA molekülü içinde

bir genetik belirteç (antibiyotik direnç geni gibi) varsa bu mutasyonu taşıyan hücreler bu genetik belirteçler kullanılarak pozitif olarak seçilebilir. Sözelimi eğer bir delesyon mutasyon bölgesine omega fragmenti bağlanırsa mutantlar spektinomisin direncine sahip olacak ve spektinomisin içeren besiyerlerinde üreyebileceklerdir. Silinme-eklenme mutasyonları oluşturulurken silinen bölgenin aşağı ve yukarısında klonlanan DNA'ya ait belli büyüklükte bölgelerin kalması istenen bir durumdur. Bu bölgeler mutasyonu taşıyan DNA molekülünün, orijinal hücreye transferinden sonra doğru kromozom konumuna integrasyonu için gereklidir. Mutasyon noktasına omega interpozonu yanında Tn5 gibi diğer transpozon dizileri de eklenebilir.



Şekil 11.2: Klonlanmış bir DNA üzerindeki bir gen bölgesinin restriksiyon endonükleaz yönlendirilmiş silinme/eklenme (delesyon/insersiyon) mutasyonunun şematik gösterimi. 1 bölgesi genin 5' tarafındaki kromozom bölgesini, 2 bölgesi gen bölgesini ve 3 bölgesi genin 3' tarafındaki kromozom bölgesini sembolize etmektedir. E, EcoRV tanıma dizisini; S, SmaI tanıma dizisini ifade eder. Koparılan gen bölgesi (2) yerine spektinomisin direnç genini taşıyan omega fragmenti bağlanmıştır.

11.2 Oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon

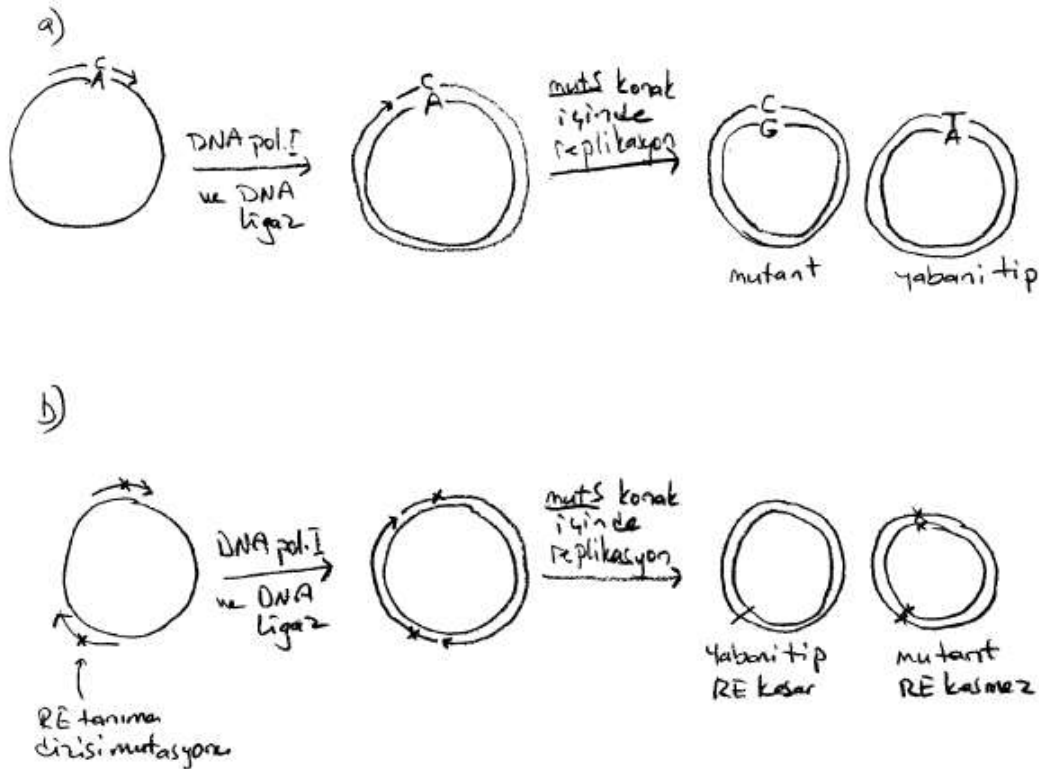
Restriksiyon endonükleaz bağımlı mutasyon yöntemlerinin uygulama alanları nispeten daha sınırlıdır. Mutasyon hedefi her zaman restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi bölgesinin içinde olmayabilir. Yine daha kısa bir DNA bölgesini, bir veya birkaç bç büyüklüğünde bir bölgeyi kapsayabilir. Sözelimi belli bir bölgede tek bir baz çiftinin silinmesi, eklenmesi veya değiştirilmesi şeklinde olabilir. Bu durumlarda restriksiyon endonükleaz uygulamasıyla hedeflenen mutasyonu elde etmek mümkün olmaz. Böyle durumlarda oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon yöntemi son derece etkilidir. Belli bir pozisyonunda mutasyon taşıyan bir oligonükleotit kullanılarak mutasyon oluşturma işlemine **oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon** denir.

Mevcut bir DNA zincirinin komplementerini sentezlerken yeni zincire istenilen bir pozisyona mutasyon veya mutasyonlar eklemek oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonun temelidir. Mutasyon eklenecek DNA molekülü tek zincirli hale getirilir. Bu işlem ya M13 gibi tek zincirli bir faj vektörüne klonlanarak ya da çift zincirli bir vektöre klonlandıktan sonra fiziksel veya kimyasal olarak denatüre ederek gerçekleştirilebilir. Çok farklı oligonükleotit yönlendirilmiş mutagenез yöntemi geliştirilmiştir. Bunları genel olarak PZR kullanılmayan yöntemler ve PZR kullanılan yöntemler olarak ayırabiliriz. Bu yöntemler arasında seçilen ikisi incelenecektir.

11.2.1 PZR kullanılmadan gerçekleştirilen oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon

Bu yöntemde mutajenik bir primer kullanılarak DNA polimerizasyon reaksiyonu ile mutant bir komplementer zincir sentezi gerçekleştirilir. Tek zincirli DNA molekülü kalıp olarak kullanılır. Mutasyon noktasını içeren bir bölgeye komplementer bir oligonükleotit tasarlanarak sentezlenir. Bu

oligonükleotitin orta kısmına yakın bölgeye mutasyon yerleştirilir. Mutasyon bir baz ekleyerek, bir baz çıkararak veya bir baz değiştirilerek gerçekleştirilir. Bu oligonükleotitlerin büyüklüğü yaklaşık 20 baz kadardır. Dolayısıyla mutant bazın her iki tarafında 10 bazlık bir dizi mevcuttur. Yaklaşık orta kısmında bir mutant baz içeren oligonükleotitlere **mutajenik primerler** denir. Mutajenik primer ile tek zincirli kalıp DNA karıştırılır ve bu primerin 3' OH ucundan itibaren yeni komplementer zincir sentezi başlar (Şekil 11.3a). Bu amaçla genellikle DNA polimeraz I enzimi kullanılır. Bu enzim kalıp DNA boyunca komplementer zinciri sentezler, bu sentez halkasal bir vektör kullanılmışsa mutajen primerin 5' ucuna kadar devam eder. Bu noktaya ulaştığında sentezin sona ermesi gerekir. Aksi takdirde mutajenik primerin içindeki mutant baz silinerek yabancı tip baz yeni zincire eklenir. Bu nedenle oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon için kullanılan DNA polimeraz I enziminin 5'-3' ekzonükleaz aktivitesi yok edilmiş olması gerekir.



Şekil 11.3: PZR kullanılmaksızın gerçekleştirilen bir oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonun şematik gösterimi. a) Mutajen primer kullanılarak mutasyonun oluşturulması. b) İkinci bir mutajen primer ile mutant zincirlerden bir restriksiyon endonükleaz tanıma dizisinin bozulması.

DNA polimeraz I tarafından mutant komplementer zincir sentezlendikten sonra yeni zincirin uçları DNA ligaz ile bağlanır ve konak *E. coli* hücrelerine transfer edilir. Taşıdığı mutasyonun düzeltilmesini engellemek için mutasyon noktasında yanlış eşleşme bulunan plazmit DNA'sının, DNA tamir sistemi mutant olan (*mutS*) bir konak hücreye nakledilmesi gerekir. Bu hücrede ilk replikasyon sonrasında oluşan iki DNA molekülünden biri mutant diğeri yabancı tiptir. Hücre bölündüğünde bu karışık plazmitler yavru hücrelere paylaşılır. Dolayısıyla yabancı tip geni ve mutant geni taşıyan plazmitlerin bir birinden ayrılması gerekir, diğer bir ifade ile yabancı tip DNA molekülleri yok edilmelidir. Bunu başarmak için çok farklı yöntemler vardır. Yabancı tip ve mutant DNA'yı taşıyan vektörleri ayırma yöntemlerinden biri restriksiyon endonükleaz tanıma dizisi mutasyonu yöntemidir.

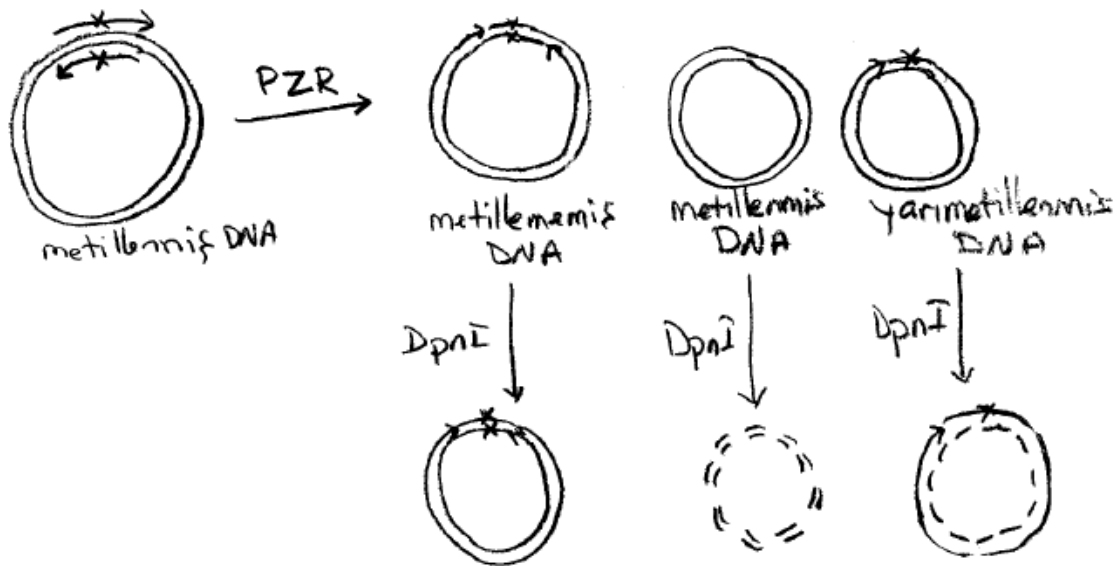
Aslında oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon yönteminde aynı anda birden fazla mutajen primer kullanılarak birden fazla noktada mutasyon oluşturmak mümkündür. Bir yandan hedef

bölgeye bir mutasyon eklenirken aynı zamanda ikinci bir bölgeye de mutasyon uygulanabilir (Şekil 11.3b). Bu ikinci mutasyon ile vektörü tek bir noktadan kesen bir restriksiyon endonükleaz enziminin tanıma dizisi bir mutajenik primer ile değiştirilebilir. Bu değişim sonucunda mutant DNA molekülleri bu restriksiyon endonükleaz ile kesilemez. Konak hücrede replikasyon sonrasında vektör DNA'sı izole edildiğinde yabancı tip vektör ilgili restriksiyon endonükleaz ile kesilirken mutasyonu taşıyan vektör kesilmez. Bu özellikten faydalanılarak kesilmemiş mutant vektörler elde edilebilir.

11.2.2 PZR kullanılarak gerçekleştirilen oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon

PZR diğer alanlarda olduğu gibi mutasyon oluşturma çalışmalarına da kolaylıklar getirmiştir. PZR kullanılarak birçok mutasyon ve oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon yöntemi geliştirilmiştir. Burada temel yaklaşım değiştirilmek istenen DNA molekülünün kalıp olarak kullanılarak hedef DNA molekülünün PZR ile çoğaltılmasıdır. Burada kullanılan PZR primerinin mutasyon uygulanmak istenen bölge ile komplementer olması gerekir. Tasarlanacak olan primerin orta kısmına mutasyon yerleştirilir. Bu bir baz ekleme, baz çıkarma veya baz değiştirme mutasyonu olabilir. Sonra PZR uygulanır, sentezlenecek yeni zincirlerde primerin bağlandığı bölgede mutasyon oluşacaktır.

Ters PZR, oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon elde etmek üzere uygulanan PZR esaslı metotlardan biridir. Bir vektör içerisine klonlanmış bir DNA molekülünün belli bir pozisyonunda mutasyon elde etmek için PZR uygulanır. Bu halkasal vektörün mutasyon uygulanacak bölgesi ile ters yönde (her bir zincire) komplementer bir çift mutajen primer tasarlanır ve PZR için kullanılır (Şekil 11.4). Kalıp olarak kullanılan orijinal vektör DNA'sı *in vivo*'da (konak hücre içinde) metillenmiş durumdadır. PZR ile *in vitro*'da sentezlenen zincirler ise metillenmez. PZR işlemleri sonucunda üretilen moleküllerin çoğunluğu PZR ile sentezlenmiş mutasyonu taşıyan metillenmemiş moleküllerdir. Karışımında ayrıca her iki zinciri de metillenmiş olan kalıp olarak iş gören orijinal vektör DNA ve bir zinciri de yeni sentezlenmiş metillenmemiş DNA zincirinden oluşan yarı metillenmiş DNA molekülleri de mevcuttur. Metillenmemiş DNA molekülleri mutasyonu taşıyan hedef vektör DNA molekülleri. Bu moleküller *in vitro*'da ligasyonla bağlanarak konak hücrelere nakledilebilir. Ayrıca herhangi bir ligasyon yapmaksızın da konak hücreye transfer edilmesi halinde hücre içinde ligasyon kendiliğinden gerçekleşecektir.



Şekil 11.4: PZR ile bir oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonun şematik görünümü. Öncelikle mutajen primerler kullanılarak metillenmemiş DNA zincirleri sentezlenir, sonra karışıma DpnI eklenerek metillenmiş zincirler parçalanır.

Bu yöntemde de mutant diziye sahip DNA molekülleriyle yabani tip diziye sahip DNA moleküllerinin ayrılması gerekir. Mutant vektörün metillenmemiş ve diğer istenmeyen moleküllerin metillenmiş veya yarı metillenmiş olması bu ayrımı yapmak için kolay bir yöntem sağlar. Restriksiyon endonükleaz *DpnI* GATC tanıma dizisine sahiptir ve bu dizi içindeki A bazı metillenmişse DNA'yı bu noktadan keser fakat eğer tanıma dizisi içindeki A metillenmemişse kesmez. Dolayısıyla ters PZR sonucu elde edilen moleküllere *DpnI* uygulanırsa metillenmiş olan (mutasyonu taşımayan) bütün zincirler kesilerek parçalanır (Şekil 11.4). Kesilmeyen zincirler ise mutasyonu taşıyan metillenmemiş DNA molekülleridir. *DpnI* uygulamasından sonra konak hücreye transfer edilecek DNA'ların tamamı mutasyonu taşıyacaktır.

12 Gen Hedefleme ve Genom Düzeltme

Bir organizmanın genomunun belli bir bölgesine müdahale etmenin değişik nedenleri vardır. Bunlardan birisi belli bir gen bölgesini mutasyona uğratarak bu genin organizmada hangi fonksiyonun yürütülmesinde rol aldığını belirlemektir. Diğer bir amaç ekonomik değeri olan bir ürünü kodlayan bir geninin diğer bir organizmanın genomuna transfer etmektir. İnsan genetik hastalıklarına neden olan mutant genlerin yabancı tipleriyle değiştirilmesi, diğer bir ifade ile gen tedavisi de bu amaçlar arasında sayılabilir.

12.1 Gen hedefleme

Bir organizmanın veya hücrenin genomuna dışardan transfer edilen bir DNA molekülü genomun (kromozomlardan birinin) bir bölgesine rasgele integre olabilir. Bu gibi rasgele integrasyonlarda belli bir DNA molekülünün hedeflenen bir bölgeye bağlanması tamamen tesadüfe bağlıdır. Böyle bir integrasyon sonrasında çok sayıda hücre analiz edilerek doğru bölgeye transferin gerçekleştiğinin doğrulanması gerekir. Bazı durumlarda transfer edilen DNA molekülü hücrede tolere edilemeyen bir mutasyona neden olmadıysa DNA transferi başarılı olarak kabul edilebilir. Ancak hücrenin normal fonksiyonel durumunu etkilemeksizin bir gen transferi yapılmak istendiğinde genin doğrudan hedef bölgeye transfer edilmesi en doğru yoldur. Belli bir DNA molekülünün (belli bir gen veya genleri içeren DNA molekülünün) genomun belirlenmiş bir bölgesine integre edilmesi işlemine **gen hedefleme** denir.

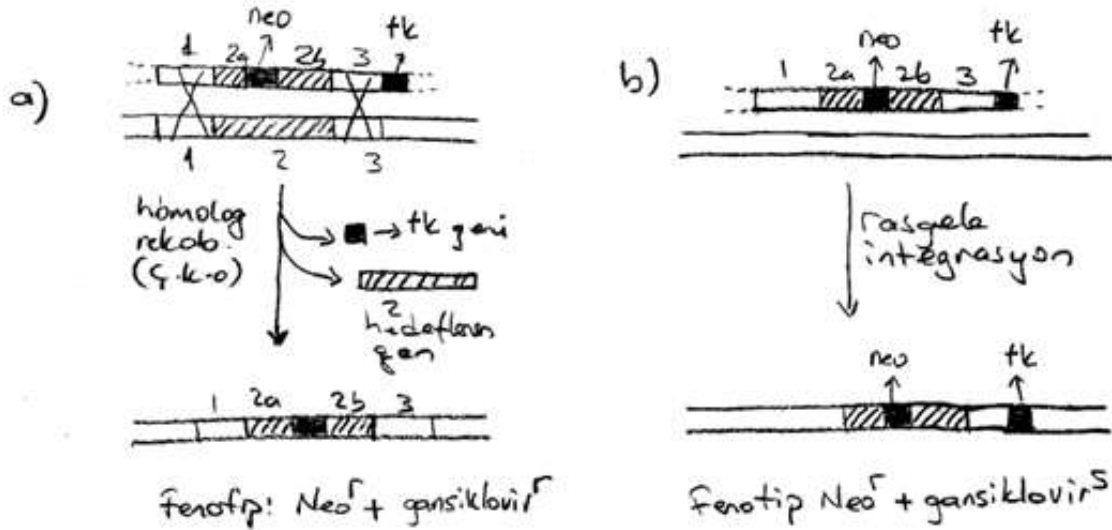
Prokaryotik organizmalar ve tek hücreli ökaryotlarda genomun belli bir bölgesini hedeflemek nispeten kolaydır. Ancak çok hücreli ökaryotlarda ve özellikle de sadece eşeyli üreyen hayvanlarda genoma müdahale etmek daha zordur ve karmaşık işlemleri gerektirir. Bir genoma müdahale etmeden önce transfer edilecek gen *in vitro*'da manipüle edilerek hazır hale getirilmelidir. Transfere hazır hale getirilmiş olan DNA moleküllerinin genoma integrasyonu için homolog rekombinasyon en yaygın kullanılan yöntemdir. Bazı gen terapi yöntemlerinde kullanılan rasgele integrasyonun aksine homolog rekombinasyonda DNA, hedef bölgeye yönlendirilir ve bu bölgeye integre olur.

12.1.1 Homolog rekombinasyon ile gen hedefleme

Hücrede homolog DNA molekülleri arasında gerçekleşen rekombinasyon ile parça değişim sürecine **homolog rekombinasyon** denir. Homolog rekombinasyon, özellikle rekombinasyonun etkin bir şekilde işlediği prokaryotlarda ve tek hücreli ökaryotlarda, bir hedef genin mutasyonu amacıyla veya mutant bir genin yabancı tip veya herhangi bir şekilde manipüle edilmiş bir DNA ile değiştirilmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu işlemler için öncelikle hedef gen klonlanmalı, manipüle edilmeli ve sonra tekrar geri genoma transfer edilmelidir. Manipulasyon işlemlerinde klonlanan genin içine veya diğer bölgelerine seçilebilir belirteç dizileri eklenmelidir. Belirteç hedef genin içine eklendiği takdirde gen mutasyona uğrayacaktır. Eğer gen yabancı tip olarak kalacaksa belirteçler genin yukarısı veya aşağısına eklenmelidir.

Gen hedefleme stratejilerinden biri **yedekleme hedefleme** olarak adlandırılır. Öncelikle hedef DNA bölgesi klonlanır, sonra amaca uygun olarak gen mutasyona uğratılabilir. Hedef gen, yukarı ve aşağı bölgelerinde yeterli uzunlukta kromozom bölgesiyle birlikte klonlanmalıdır (Şekil 12.1a). Genin iç kısmında bir pozisyona neomisin direnç geni gibi bir antibiyotik direnç geni eklenir. Bu durumda gene bir insersiyon mutasyonu uygulanmış olur (Şekil 12.1a). Ayrıca klonlanmış genin sonuna ikinci bir seçilebilir belirteç eklenmesi gerekir. Bunun nedeni homolog rekombinasyon ile (çift krosing over) integrasyon gerçekleşen hücrelerle rasgele integrasyon gerçekleşen hücreleri ayırt etmektir.

Neomisin dirençli hücrelerde integrasyonun gerçekleştiği anlaşılır. Bu durumda krosing overler 1 ve 2 bölgelerinden gerçekleşir (bakınız Şekil 12.1a) ve *tk* geni integre olmaz. *tk* geni bir viral timidin kinaz enzimini kodlar. Bu enzim nükleotit analogu gansikloviri fosforlayarak DNA sentezine katılmasını sağlar. Gansiklovirin bağlandığı zincirin sentezi durur. Dolayısıyla *tk* genine sahip hücreler gansiklovire duyarlı bu geni taşımayanlar ise dirençlidir. Homolog rekombinasyon ile oluşan çift krosing over sonucunda *tk* geni genoma integre olmaz ve hücreler gansiklovire dirençlidir. Özet olarak neomisin+gansiklovire dirençli hücreler homolog rekombinatlardır. Diğer yandan rasgele integrasyonda hem neomisin geni ve hem de *tk* geni genoma integre olur (Şekil 12.1b). Dolayısıyla rasgele rekombinasyon geçiren hücreler neomisin dirençli ve gansiklovir duyarlı hücrelerdir.

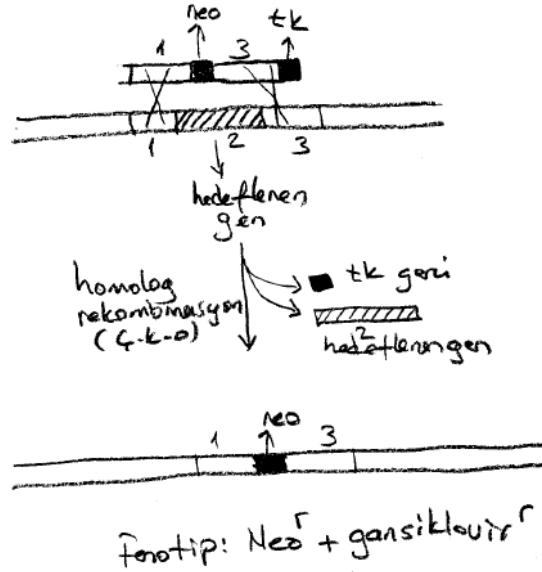


Şekil 12.1: Homolog ve rasgele rekombinasyon ile manipüle edilmiş bir DNA molekülünün genoma integrasyonu. a) Manipüle edilmiş bir gen gölgesinin homolog rekombinasyon (çift krosing over) ile genoma integrasyonu. b) Manipüle edilmiş bir gen gölgesinin rasgele rekombinasyon ile genoma integrasyonu. Integrasyon gerçekleşen iki tip hücre fenotipik olarak farklılık gösterir.

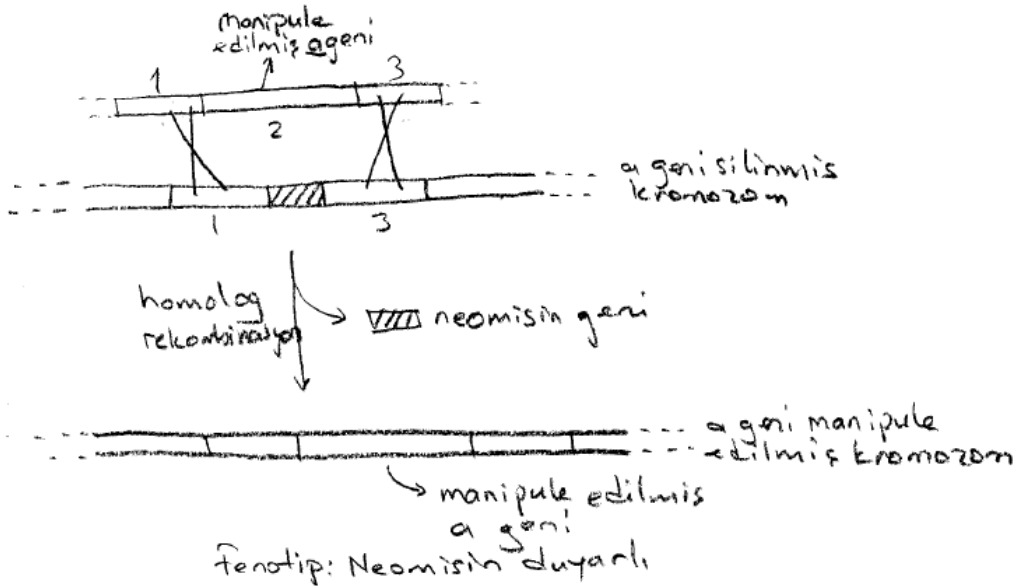
Bazı durumlarda belli bir genin kodlayıcı bölgesinin tamamının silinmesi hedeflenebilir, yani bir silinme mutasyonu hedeflenebilir. Bu durumda genin kodlayıcı bölgesi uzaklaştırılarak yerine neomisin direnç geni gibi bir seçilebilir belirteç eklenir (Şekil 12.2). Bu durumda genin yukarısında ve aşağısındaki kromozom bölgeleri homolog diziler olarak kullanılabilir olacaktır. Ayrıca rasgele integrasyon meydana gelen hücreleri ayırt edebilmek için klonlanan DNA gölgesinin aşağısına (3 bölgesinin sonuna) bir *tk* geni de eklenir. Bu manipüle edilmiş DNA hücrelere transfer edilerek neomisin ve gansiklovir dirençli hücreler hedef mutasyonu taşıyan hücreler olarak seçilir.

Özellikle bir gen bakımında silinme mutasyonları amino asit dizisi manipüle edilmiş genlerin genomun doğru pozisyonuna eklenmesi için son derece kullanışlı genetik sistemler sağlarlar. Bir *a* geni tarafından kodlanan bir A proteininin amino asit dizisi değiştirilmek istendiğinde bu gen yukarı ve aşağısındaki bir miktar DNA dizisiyle beraber klonlanır. Klonlanan gen üzerinde oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyonlarla gerekli kodon değişiklikleri yapılır. Sonra bu manipüle edilmiş DNA molekülü bu gene ait dizinin silindiği bir konak hücreye transfer edilir (Şekil 12.3). Klonlanmış DNA molekülünün genin yukarı ve aşağısındaki bölgeleri sadece konak hücre kromozomuyla homologdur. Dolayısıyla homolog rekombinasyon sadece o bölgede gerçekleşebilir. Böylece amino asit dizisi değiştirilmiş proteini kodlayan gen genomda hedeflenen bölgeye integre olur. Bu durumda silinme mutant hücrenin genomundaki *a* geninin bulunduğu bölgede neomisin direnç geni gibi bir belirteç

DNA bağlıdır ve mutant hübre bu antibiyotiğe dirençlidir. Bu bölgeye manipüle edilmiş DNA integre olduğunda hedeflenen gen ile antibiyotik direnç geni yer değiştirir. Sonuçta hücre antibiyotik direnç genini kaybeder ve bu antibiyotiğe karşı duyarlı hale gelir. Bu durumda negatif seçim ile hedef hücreler ayırt edilebilir. Yani antibiyotik duyarlı hücrelerde homolog rekombinasyon gerçekleşir.



Şekil 12.2: Homolog rekombinasyon ile bir genin tamamının silindiği bir mutant hücrenin elde edilmesi. Klonlanmış ve manipüle edilmiş DNA molekülünde hedef gen bölgesinin olmadığına dikkat ediniz. Neomisin geni ile hedef gen yer değiştirmiştir.



Şekil 12.3: Kodlayıcı dizisi manipüle edilmiş bir *a* geninin aynı gen bakımından silinme mutasyonu taşıyan bir hücrenin kromozomuna homolog rekombinasyon ile integrasyonu. Kromozom ile manipüle edilmiş DNA arasındaki homoloji sadece genin yukarısı ve aşağısındaki iki bölge (1 ve 3) arasında gerçekleşebilir.

Gen hedefleme amacıyla manipüle edilen DNA molekülleri genellikle bir vektöre bağlı durumdadır. Rekombinant vektör DNA'sı olarak hücrelere transfer edilir. Rekombinasyon vektörün sadece genomik DNA kısmı ile gerçekleşir. Kromozom ile rekombinant vektör arasındaki DNA değişiminden sonra vektör yeni DNA içeriğiyle beraber hücrenin içindedir. Ancak bu tip çalışmalarda

kullanılacak vektör hedef hücre içinde replikasyon yapamayan vektörler arasından seçilir. Dolayısıyla replikasyonu yapılamayan vektör peşpeşe hücre bölünmelerinin sonunda yok olur.

12.2 Tasarlanmış nükleazlarla genom düzeltme

Yüksek yapılı hayvanlarda manipüle edilmiş gen nakilleri genellikle kültüre alınmış embriyonik kök hücrelerine yapılır. Fakat homolog rekombinasyon embriyonik kök hücrelerine gen hedeflemede nispeten verimsizdir. Başarılı sonuçlar daha çok özellikle nispeten etkili rekombinasyon sistemlerine sahip olan maya ve fare modellerinde mümkündür. Dolayısıyla homolog rekombinasyon metodu geniş bir organizma grubu için uygulanabilir değildir. Ayrıca bu yöntem *in vitro* vektör oluşturma, seçim ve görüntüleme gibi emek yoğun çalışmalar gerektirmektedir. Son zamanlarda geniş bir organizma grubunda ve hücre tipinde hedeflenmiş genom değişikliklerine izin veren diğer teknikler geliştirilmiştir. Özel tasarlanmış nükleazlar kullanılarak bu tekniklerle, bitki, hayvan ve insan genomlarına insersiyon, delesyon ve yer değiştirme şeklindeki genom düzeltme işlemleri uygulanabilir hale gelmiştir. Bu yaklaşımda genetik manipülasyonlarla inşa edilmiş iki domainden meydana gelmiş nükleazlar kullanılır. İki domainden oluşan bu nükleazların domainlerden biri genomu belli bir spesifik diziden tanır, diğer domain ise tanınan DNA bölgesi civarında belli bir noktadan her iki zinciri de kırar. Bu nükleazlar arasında en yaygın bilinenleri çinko-parmak nükleazları (ZNF, zinc-finger nucleases), transkripsiyon aktivatör benzeri efektör nükleaz (TALEN, transcription activator-like effector nuclease) ve CRISPR-Cas9 (CRISPR, clustered regularly interspaced short palindromic repeat) sistemidir.

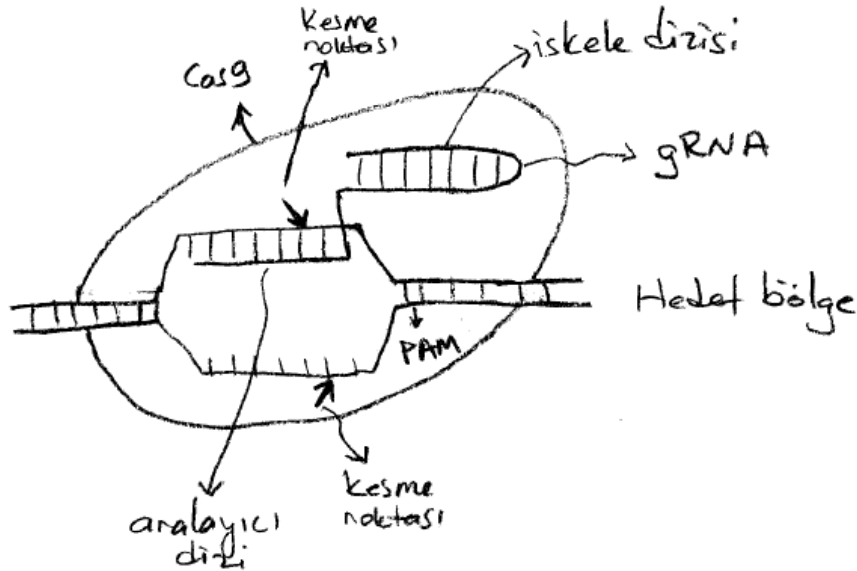
ZNF nükleazların çinko parmak domaini özel amino asit dizisine sahip olduğunda belli bir nükleotit dizisini tanır ve bağlanır, TALEN nükleazlarda ise transkripsiyon aktivatör benzeri efektör domaini belli amino asit dizisine sahipken belli bir nükleotit dizisini tanır ve bağlanır. Bu nükleazlar özel bir bölgeye hedeflemek istendiğinde her defasında o bölgedeki nükleotit dizisini tanıyan özel polipeptit domainler tasarlamak gerekir. Dolayısıyla hedeflenen her genom bölgesi için özel polipeptit dizilerinin yeniden oluşturulması için yoğun genetik manipülasyon çalışmaları yapmak gerekir. ZNF ve TALEN nükleazların ilgili domaini hedef bölgeye bağlandığında ikinci domainleri tanıma bölgesine yakın bir bölgeden her iki DNA zincirini de keser. ZNF nükleazlarda kesme noktası tanıma bölgesinden 5-7 bp uzakta iken TALEN nükleazlarda bu uzaklık 33-35 bp'dir. Sonuçta hedef bölgede bir çift zincir kırığı oluşturulur. Bu iki nükleaz ile gen hedeflemesi yapabilmek için belirlenecek her hedef DNA dizisi için yeni bir tanıma domaini tasarlamak zorunluluğu vardır. Bu nedenle uygulama alanları sınırlıdır. Her defasında polipeptit yapısında farklı bir tanıma domainine ihtiyaç olmadığından CRISPR-Cas9 sistemi çok daha etkili ve daha kolay uygulanabilir bir DNA düzeltme aracı olarak iş görür.

CRISPR-Cas9 sistemi orijinal olarak prokaryotik organizmaların virüs istilasına karşı geliştirdiği bir savunma istemidir. Bu organizmaların genomunun belli bir bölgesinde kısa palindromik diziler arasına farklı virüslere ait kısa aralayıcı (spacer) diziler vardır. Bu aralayıcı diziler bir bakıma o türün karşılaştığı farklı virüslere ait kimlik dizileridir. Bu aralayıcı bölgedeki dizi ile homolog olan diziye sahip bir virüs hücreye girdiğinde hücre genomunun CRISPR bölgesinden o virüse ait genomdaki kısa aralayıcı diziyi de içeren kılavuz RNA (gRNA) denilen bir RNA molekülü sentezlenir. Bu molekül bir endonükleaz olan Cas9 proteini ile kompleks oluşturarak yabancı DNA'yı tarar. Eğer yabancı DNA üzerinde gRNA ile homolog bölge mevcutsa bu bölge ile eşleşerek bağlanır. Bu bağlanma gerçekleştiğinde bu bölge içinden Cas9 endonükleaz viral DNA'nın her iki zincirini keser ve sonuçta viral DNA yıkılarak enfeksiyon engellenir. Bu sistemde spesifik olan dizi, gRNA'nın hedef viral DNA bölgesine bağlanan aralayıcı diziyi içeren kısımdır.

CRISPR-Cas sistemi, birçok organizmaya ait birçok hücre tipinde genomun hemen hemen bütün bölgelerindeki DNA yapısında çift zincir kırıkları oluşturmak için kullanılabilir. Sistem iki bileşenden oluşur:

- 1) bir kılavuz RNA (gRNA) ve
- 2) spesifik olmayan CRISPR ilişkili endonükleaz (Cas9) (Şekil 12.4).

gRNA dizisi iki fonksiyonel kısımdan oluşur. İskele dizisi denilen kısım Cas9 endonükleaza bağlanır. Yaklaşık 20 nükleotit uzunluğundaki araştırmacı tarafından tasarlanan aralayıcı dizi genomun hedef bölgesiyle eşleşir. Tasarlanmış aralayıcı dizi genom üzerinde hedeflenen bölge ile komplementerdir. gRNA/Cas9 endonükleaz kompleksi aralayıcı gRNA bölgesi ile komplement olan genomik DNA dizisine bağlanır. Bu bağlanmanın gerçekleşebilmesi için genomun komplementer bölgenin bitişiğinde 2-5 bp uzunluğunda korunmuş bir diziye ihtiyaç vardır, bu dizi PAM (protospacer adjacent motifs) olarak adlandırılır. CRISPR-Cas9 sisteminde PAM dizisi NGG şeklindedir. Bir CRISPR-Cas9 sisteminin gRNA'sının aralayıcı dizisi bir PAM dizisinin bitişiğindeki komplementer DNA zinciriyle eşleşir. Sonra Cas9 endonükleaz üzerindeki iki aktif merkez DNA zincirlerinin her ikisini de PAM dizisinin yakınından keser. Böylece hedeflenen bölgede bir çift zincir kırığı oluşur. İnsan genomunda 160×10^6 adet NGG dizisi vardır, dolayısıyla insan genomu bu dizilerin bulunduğu herhangi bir bölgeden CRISPR-Cas9 sistemi tarafından kesilebilir. CRISPR-Cas9 sistemiyle farklı aralayıcı diziler tasarlayarak genomun farklı bölgelerinin hedeflenmesi mümkündür. ZNF ve TALEN nükleazlarda olduğu gibi her hedeflenecek DNA dizisi için yeni bir polipeptit tasarımına ihtiyaç yoktur, Cas9 endonükleaz gRNA'nın bağlandığı PAM bölgesi bitişiğindeki herhangi bir genom bölgesini kesebilir.



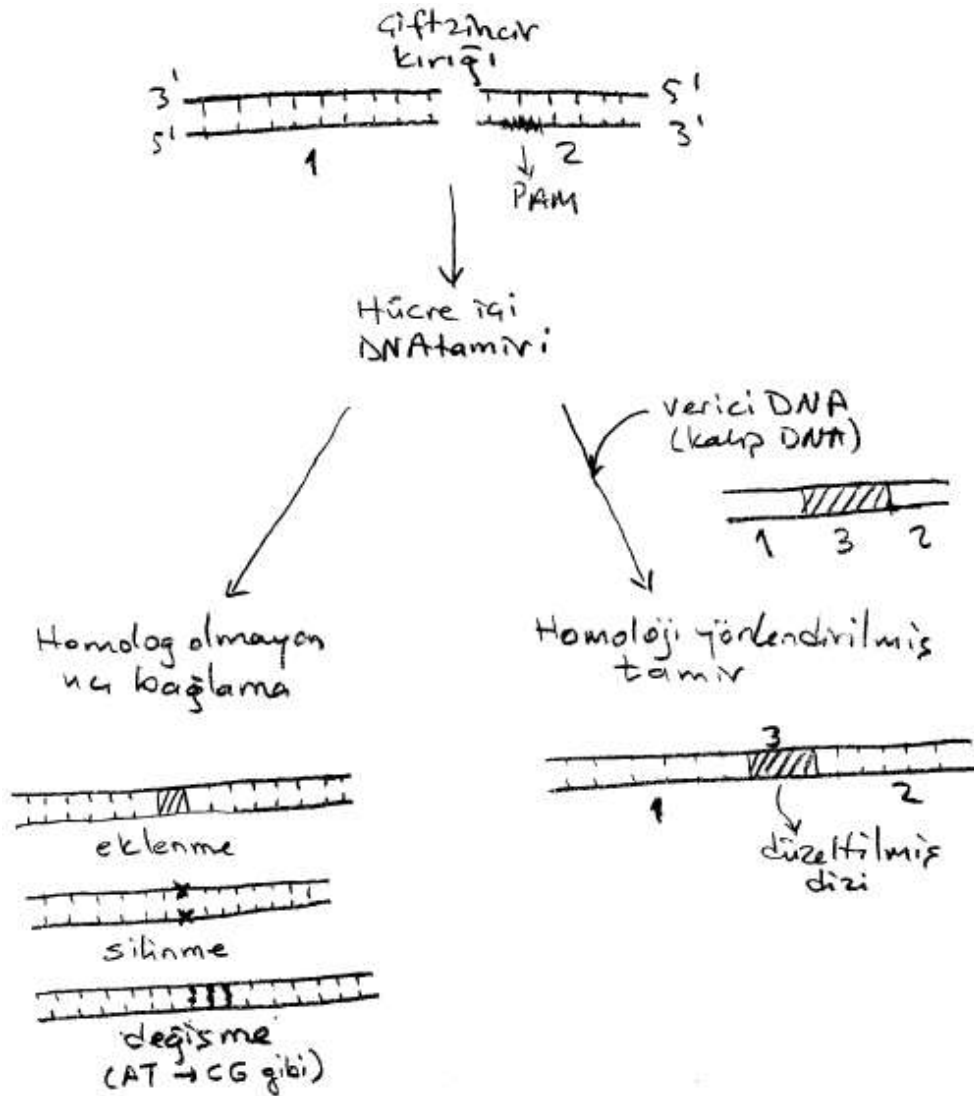
Şekil 12.4: CRISPR-Cas9 sisteminin çalışma şeklinin şematik görünümü.

Bu sistemin elemanlarından biri olan gRNA'yı kodlayan DNA dizisi ve Cas9 endonükleaz geni uygun bir vektöre bağlanarak gerekli promotor ve genetik belirteçler eklendikten sonra hedef hücreye transfer edildiğinde bu hücrede gRNA ve Cas9 endonükleaz sentezlenir. (ZNF ve TALEN endonükleazlar için de aynı yöntem uygulanabilir) gRNA'nın aralayıcı dizisi hedeflenen genom bölgesinin NGG dizisinin yukarısına (5' tarafına) komplementer DNA zinciri ile eşleşerek bağlanır. Sonra Cas9 endonükleaz PAM bölgesi yakınından DNA zincirlerini keser.

Hedeflenen genom bölgesinde çift kırıkların oluşturulması genom düzeltmenin ilk basamağıdır. Bu aşamadan sonra kırık bölgesinde bir düzeltme işlemi gerçekleşmelidir. Hücreler çift zincir kırıklarını iki mekanizma ile tamir ederler: **homolog olmayan uç birleştirme** ve **homoloji**

yönlendirilmiş tamir. Homolog olmayan uç birleştirmede en iyimser işlem kesilen uçların herhangi bir hasar oluşmadan birleştirilmesidir. Bu durumda herhangi bir değişiklik olmadan çift zincir kırığı bölgesi tamir edilir. Ancak bu mekanizma nispeten sıklıkla uçlardan nükleotitler kopararak veya yeni nükleotitler ekleyerek kırık bölgesinde mutasyonlara neden olur. Bu durumda kesik bölgesindeki yabancı tip bir gen mutasyona uğrayacaktır.

Homoloji yönlendirilmiş tamir sisteminde ise ilave bir kalıp DNA (verici DNA) rehberliğinde kırık bölgesi tamir edilir. Bu durumda kırık bölgesinin her iki tarafı ile komplementer olan ve orta kısmında yapılmak istenen değişikliği içeren bir kalıp DNA hücreye verilirse kırık bölgesi kalıp DNA'daki diziye uygun bir şekilde tamir edilir (Şekil 12.5). Böylece genom bölgesinde istenen bir değişiklik gerçekleştirilir: bir veya bir grup bazın eklenmesi, bir veya bir grup bazın çıkarılması ve bir veya bir grup bazın değiştirilmesi.



Şekil 12.5: Çift zincir kırıklarının tamiri yoluyla genom düzeltme. Çift kırık oluşturulmuş hücreye bir verici (kalıp) DNA zinciri sağlanarak homoloji yönlendirilmiş tamir mekanizmasıyla çift zincir kırık bölgesinin modifikasyonu. Taralı bölge çift kırık bölgesine uygulanmak istenen düzeltmeyi içerir. Bu bölgedeki dizi eklenme, silinme veya değiştirme şeklinde düzeltmelerden birini veya daha fazlasını içerebilir.

CRISPR-Cas9 sistemi yüksek yapıli organizmalarda gen hedefleme ve genom düzeltme işlemleri için son derece etkili yöntemler sunar. Bu gün için hızlı bir şekilde farklı alanlara uygulanabilirliğı üzerine yoğun araştırmalar devam etmektedir. Diğer bütün gen hedefleme sistemlerinde olduğu gibi CRISPR-Cas9 sisteminde de hedeflenen bölge dışında rasgele bölgelere integrasyon riski daima mevcuttur.

12.3 Transgenik bitki ve hayvan oluşturma

Herhangi bir hücrenin genomuna dışardan bir DNA molekülünün eklenmesi mümkündür. Bu ekleme işleminin amaçlarından biri bir organizmaya diğer bir organizmanın geninin eklenmesiyle bir transgenik organizma elde etme olabilir. **Transgenik organizmalar** genomuna, bir veya daha fazla gen taşıyan, başka bir organizmaya ait bir DNA molekülü eklenmiş organizmalardır. **Transgen** ise *in vitro*'da rekombinant DNA teknikleriyle manipüle edilerek diğer bir organizmanın genomuna nakledilen gendir.

Tek hücreli organizmalarda transgenik bireyler elde etmek nispeten kolay bir süreçtir. Transgen, homolog rekombinasyon ile hücre genomunun belli bir bölgesine hedeflenerek integrasyon sağlanır. Kısa generasyon zamanları ve tek hücreli olmalarından dolayı transgenik organizmayı kısa sürede elde etmek mümkündür. Ancak çok hücreli organizmalarda organizmanın bütün hücrelerine transfer yapmak oldukça zordur. Eşeysiz üreyen organizmalarda kültüre alınmış bir hücreye transfer yapılarak bu hücre yeni bir birey oluşturmak üzere yönlendirilebilir. Eşeyli üreyen organizmalarda ise gen nakli totipotent bir hücreye yapılmaksızın, bütün hücreleri transgenik olan çok hücreli bir birey elde etmek mümkün olmaz. Bitkisel hücrelerin çoğu totipotenttir. Fakat eşeyli üreyen hayvanlarda hücreler, embriyonik gelişimin çok erken safhalarında totipotentlik özelliklerini kaybederler. Bu durumda transgenik organizma elde etmek için ya zigota veya totipotentlik özelliğini kaybetmemiş erken embriyonik evredeki hücrelere transfer yapmak gerekir. Ayrıca diploit organizmalarda bir gen transferi gerçekleştiğinde genellikle sadece homolog kromozomlardan birine integrasyon gerçekleşir ve transgenik birey transgen bakımından heterozigot olur. Homozigotları elde etmek için ilave segregasyon çalışmalarına ihtiyaç duyulur.

Transgenik organizma oluşturulurken genelde üç aşamadan söz etmek mümkündür:

- i) ***In vitro* manipölasyon:** Transfer edilmek istenen gen veya genlerin *in vitro*'da manipölasyonu yapılır. Bu aşamada hedef gene düzenleyici bölgeler, bir veya daha fazla antibiyotik direnç geni ve benzeri genetik belirteçler eklenir. Hedef DNA uygun bir vektöre aktararak veya doğrudan doğrusal DNA moleülleri şeklinde, transfere hazır hale getirilir.
- ii) **Hedef hücreye transfer:** Manipüle edilmiş hedef geni de taşıyan DNA molekülü genetik yapısı değiştirilmek istenen organizmanın hücrelerine transfer edilir. Konjugasyon, transformasyon, molekül tabancası, virüsler aracılığıyla veya mikroenjeksiyon gibi yöntemlerden biri ile hedef gen hücrelere nakledilir. Farklı tip hücrelere transfer yapılabilir. Bu hücre bir zigot olabileceğı gibi bir kök hücre de olabilir. Ayrıca hücreler kültüre alınarak oluşturulmuş bitki ve hayvansal hücre kültürleri de olabilir. Eğer transgen germ hücrelerine transfer edilirse yeni nesillere aktarılacaktır. Somatik hücrelere transfer edildiğı takdirde transgen yeni nesillere aktarılmayacak sadece o bireyi etkileyecektir.
- iii) **Transgenik bireylerin izolasyonu:** Genetik belirteçlerin de yardımıyla transgeni taşıyan bireyler (veya hücreler) izole edilir. Bu aşamada transfer edilen hücre bir zigot ise transgen kromozoma integre olduğunda embriyonik gelişim sırasında oluşacak bütün hücrelere transgen aktarılacaktır. Transgeni taşıyan hücreler manipölasyon sırasında eklenen genetik belirteçler (sözgelimi neomisin direnç geni gibi) kullanılarak pozitif veya negatif olarak

seçilebilir. Transgen büyük olasılıkla homolog kromozomlardan sadece birine integre olacağı için oluşan olgun birey muhtemelen heterozigot olarak transgeni taşıyacaktır. Daha sonraki nesillerde bu soydan gelen bireylerin kontrollü aprazlamalarıyla transgen bakımından homozigot olan bireylerin seçilmesi gerekir.

İnsan gibi yüksek yapılı hayvanların germ hatlarına gen nakline etik nedenlerden dolayı yasal olarak izin verilmez. Böyle bir durumda bu organizmalarda sadece somatik hücrelere gen nakli yapılabilir. Kültüre alınmış kök hücrelere gen transferi yapıldıktan sonra bu transgenik hücreler vücuttaki uygun dokuya transplante edilir. Sonuçta organizma tamamen değil de kısmen transgenik olacaktır. Ayrıca transgen yeni nesillere aktarılmayacaktır.

Kaynaklar

1. Brown, T. A. 2009. Gen Klonlama ve DNA Analizi. 5. Baskıdan çeviri, Çev. Kur. F. Bardakçı. Nobel Yayınevi.
2. Howe C. 2015. Gene Cloning and Manipulation. 2nd Edition, Cambridge University Press.
3. Nicholl D. S. T. 2016. An Introduction to Genetic Engineering. Cambridge University Press.
4. Wong D. W. S. 2018. The ABCs of Gene Cloning. 3rd Edition. Springer
5. Jiang F. and Doudna J. A. 2017. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. Annu. Rev. Biophys. 2017. 46:505–29

İçindekiler

1	Giriş.....	1
1.1	DNA, RNA ve proteinler	1
1.2	DNA replikasyonu ve gen ekspresyonu	4
1.3	Gen organizasyonu.....	7
2	Rekombinant DNA İşlemlerinde Yaygın Kullanılan Enzimler	10
2.1	DNA'yı kesen enzimler	10
2.1.1	Restriksiyon endonükleazlar	10
2.1.2	DNazl.....	12
2.2	DNA'yı modifiye eden enzimler	12
2.2.1	Fosfatazlar	12
2.2.2	Polimerazlar	12
2.2.3	Ekzonükleazlar	14
2.3	DNA moleküllerini birleştiren enzimler	14
2.3.1	DNA ligaz	14
3	Gen Klonlamada Kullanılan Temel Teknikler	16
3.1	DNA izolasyonu	16
3.2	Jel elektroforez ve DNA görüntüleme	18
3.3	Jelden filtrele DNA transferi (Southern blotlama).....	20
3.4	DNA çözümlerine enzimatik işlemlerin uygulanması.....	21
4	Gen Klonlamada Kullanılan Vektörler	22
5	Rekombinant DNA Teknolojisinde Konak Sistemleri	25
5.1	Konak hücrelere DNA transferi	25
6	Genomik DNA'nın Klonlanması.....	27
6.1	Gen kütüphanesinin oluşturulması	28
6.2	Gen kütüphanesinden doğru klonun seçilmesi	31
6.2.1	Nükleik asit hibridizasyonuna dayalı teknikler	31
6.2.2	Hedef genin yönettiği fonksiyonun <i>in vivo</i> 'da gerçekleştiğini göstermeye dayalı teknikler.	33
7	cDNA Klonlama	36
7.1	cDNA sentezi	36
7.2	cDNA'nın klonlanması	38
8	PZR ve PZR Klonlama	41
8.1	Plimeraz zincir reaksiyonu (PZR)	41
8.2	PZR klonlama	43
9	Klonlanmış DNA Moleküllerinin Analizi	46
9.1	Restriksiyon endonükleaz tanıma dizilerinin varlığı ve pozisyonlarının belirlenmesi	46
9.2	Klonlanmış DNA molekülünün nükleotit dizisinin belirlenmesi	48
9.3	DNA dizilerinin biyoinformatik analizi.....	49
9.4	Alt klonlama ve manipülasyon.....	54
10	Klonlanmış Genlerin Ekspresyonu.....	57
10.1	Ekspresyon vektörleri	57
10.2	Hedef genin ekspresyon vektörüne klonlanması	59
10.3	Ekspresyonu yapılmış proteinin saflaştırılması	59
11	Yönlendirilmiş Mutasyon	61
11.1	Restriksiyon endonükleazlara bağlı mutasyon.....	61
11.2	Oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon	63
11.2.1	PZR kullanılmadan gerçekleştirilen oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon.....	63
11.2.2	PZR kullanılarak gerçekleştirilen oligonükleotit yönlendirilmiş mutasyon.....	65
12	Gen Hedefleme ve Genom Düzeltme.....	67
12.1	Gen hedefleme	67
12.1.1	Homolog rekombinasyon ile gen hedefleme	67
12.2	Tasarlanmış nükleazlarla genom düzeltme	70
12.3	Transgenik bitki ve hayvan oluşturma	73
	Kaynaklar	75