

2 GEN KLONLAMA

Moleküler klonlama rekombinant DNA teknolojisinin temel işlemlerinden biridir. Gen klonlamada hedef bir gen veya genleri taşıyan bir DNA bölgesini genom içinden ayırıp daha küçük ve çoğaltılabilir moleküller halinde elde etmektir. Prokaryotlar düşünüldüğünde megabaz (mbç), ökaryotlar düşünüldüğünde binlerce megabaz büyüklüğündeki genomik DNA içinde ve binlerce gen arasında tek bir genin manipulasyonu hemen hemen imkansızdır. Bu durumda ideal olan hedef gen bölgesini genomdan ayırarak sadece o gen bölgesiyle çalışmaktır. Bunun için de ilgili gen bölgesinin klonlanması gerekir.

Bir hedef DNA molekülünü otonom olarak replike olabilen daha küçük moleküller halinde klonlayabilmek için bazı temel gereklilikler vardır. Bunlardan en belirgin olanları restriksiyon endonükleazlar, T4 DNA ligaz, dana bağırsak alkalin fosfataz enzimleri, vektör DNA'sı, konak sistemi ve DNA transfer yöntemleridir.

2.1 Gen Klonlama İçin Temel Gereklilikler

2.1.1 Restriksiyon endonükleazlar

Restriksiyon endonükleazlar DNA moleküllerini 5' uçlarında fosfat ve 3' uçlarında OH grubu kalacak şekilde iç kısımlardan kesen bir enzim grubudur. Bu enzimler yardımıyla her türlü DNA molekülü kesilip küçük fragmentlere ayrılır veya halkasal formdan doğrusal forma dönüştürülür. Restriksiyon endonükleazlar üç tiptir: tip I, tip II ve tip III. Her üç tip enzim de DNA molekülünü belli bir bölgeden tanır ve bağlanırlar. Bu bölgeye **tanıma bölgesi** veya **tanıma dizisi** denir. Bu gün için bilinen yüzlerce restriksiyon endonükleazın her birinin özgül birer tanıma dizisi vardır. İlgili tanıma dizisini bulunduran DNA molekülleri bu enzim tarafından kesilir. Tip I enzimleri tanıma bölgesine bağlanır ve DNA'yı tanıma bölgesinin dışından rasgele bir bölgeden keser. Tip I enzimlerinin DNA'yı nereden kestiği bilinemez. Bu nedenle rekombinant DNA işlemlerinde kullanılamazlar. Tip III restriksiyon endonükleazlar ters yönde yerleşik iki adet tanıma dizisinden DNA'yı tanırlar ve bağlanırlar; sonra tanıma dizisinin 25-27 bç aşağısından DNA'yı keserler.

Restriksiyon endonükleaz tip II enzimleri, DNA'ya tanıma dizilerinden bağlanırlar ve bu dizi içinde daima belli bir noktadan keserler. Dolayısıyla tip II restriksiyon enzimlerinin, eğer bir DNA'yı kesiyorlarsa kestikleri bölge daima aynıdır ve oluşan fragmentlerin uç

kısımlarının nükleotit (baz) dizileri bilinir. Bu nedenle restriksiyon endonükleaz tip II enzimleri rekombinant DNA işlemlerinde kullanılır ve çoğu zaman “tip II” ifadesi atlanır.

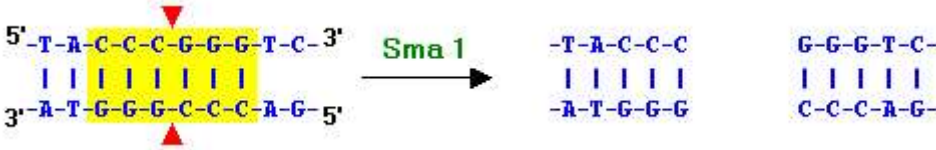
Restriksiyon endonükleazlar (tip II!) kesiş tarzına göre DNA fragmentlerinin uç kısmında tek zincirli bir bölge kalmasına neden olabilir. Bu uçlara **yapışkan uçlar** denir. Eğer uçlarda tek zincirli bölge oluşmuyorsa bu tip uçlara da **kör uçlar** denir. Bu enzimler birbirinin aynısı olan iki alt birimden meydana gelmiştir. Alt birimlerden biri DNA zincirinin birini, diğer alt birim de diğer zinciri keser. Enzimin alt birimlerinin kesme noktalarının konumu uçların yapışkan veya kör uçu olmasını sağlar (Şekil 2.1).



1. 5' yapışkan uç



2. 3' yapışkan uç



3. Kör uç

Şekil 2.1: Restriksiyon endonükleaz tip II enzimlerinin tanıma dizileri ve kesme noktalarının pozisyonları ile uç özelliklerinin oluşumu.

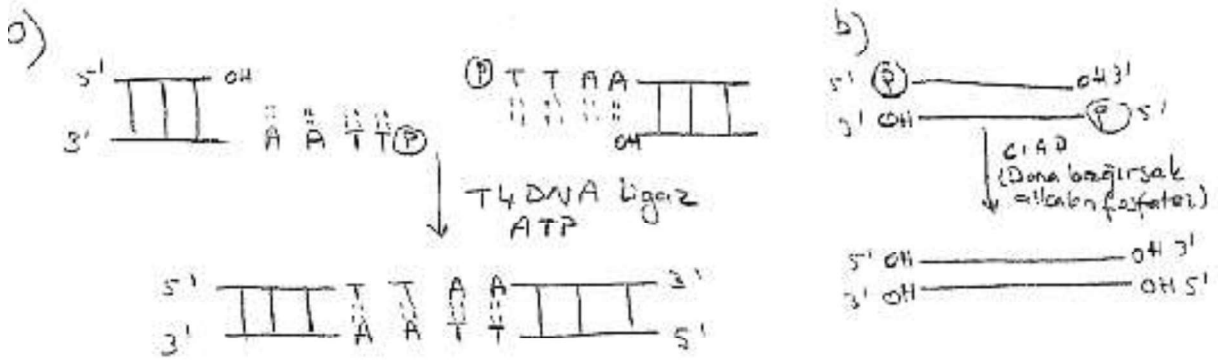
Uçların yapışkanlığının gerekçesi aynı enzimle oluşturulmuş (kesilmiş) olan farklı fragmentlerin uç kısımlarının nükleotit dizilerinin birbirinin komplementeri olmasıdır. Bu fragmentler komplementer bölgeden hidrojen bağlarıyla zayıf bir şekilde de olsa birbirine tutturulur. Bu olay yapışkanlık olarak algılanmaktadır.

2.1.2 T4 DNA ligaz

Bu enzim iki DNA molekülünü 5' fosfat ve 3'-OH uçları arasında bir fosfodiester bağı oluşturarak birbirine bağlar. DNA fragmentlerinin vektör DNA'sına bağlanmasında kullanılır. (Şekil 2.2a)

2.1.3 Dana bağırsak alkalen fosfataz (CIAP)

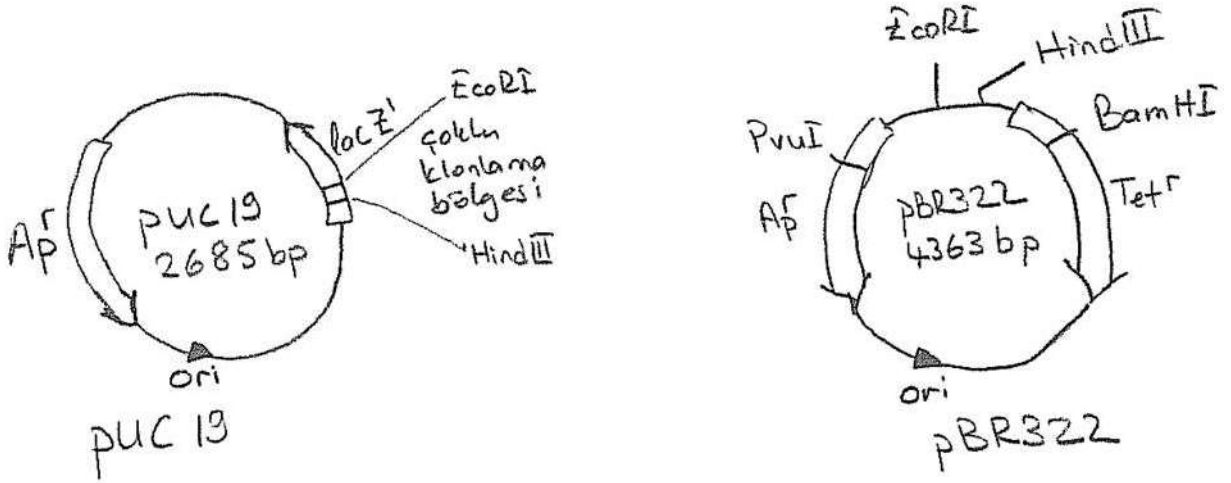
Vektör moleküllerinin yeniden kendi uçlarıyla bağlanmasını engellemek için kullanılır. 5' fosfat gruplarını koparıp yerine OH grubunun kalmasını sağlar. Bu durumda vektör DNA'sının bütün uçları OH olduğundan T4 DNA ligaz bu uçları birbirine bağlayamaz. Dolayısıyla bağlanma vektör ile genom parçaları arasında olacaktır. (Şekil 2.2b)



Şekil 2.2: a) DNA ligazın iki DNA fragmentini birleştirilmesi. b) CIAP uygulanmış bir DNA molekülünün uçları.

2.1.4 Vektör

Genomdan elde edilen küçük DNA parçaları kendi replikasyonlarını gerçekleştiremezler. Bu moleküller daha küçük replikasyon birimlerine bağlanarak, bu birimlerin bir parçası olarak izole edilirler. *Hedef DNA'yı taşımak üzere kullanılan küçük replikasyon birimlerine vektör denir.* Vektör DNA'sı genellikle halkasal moleküller olup doğal plazmit, virüs veya bunların hibritlerinin manipüle edilmiş türevleridirler. 10 kb'ın altında genellikle 5 kb'dan küçük DNA molekülleridirler. Vektörler her şeyden önce bir **replikasyon orijinine** sahiptirler. Ayrıca buldukları hücrede varlıklarını belli edecek bazı **genetik işaretleyiciler** taşırlar. Sözelimi bir veya daha fazla antibiyotik direnç geni veya laktöz metabolizması genlerinden birini kodlayan bir *lacZ'* geni gibi. Ayrıca hedef DNA'nın bağlanması için kullanılacak bir veya daha fazla **restriksiyon endonükleaz tanıma dizisine** sahiptirler. Bu tanıma dizilerinin konumu da önemli olmaktadır. Vektörlerin diğer bir özelliği, **kopya sayısıdır**. Tek bir kopya olarak girdikleri tek bir konak hücrede sayılarını yüzlerce kopyaya çıkarırlar. Dolayısıyla kendileriyle beraber taşıdıkları hedef DNA molekülünü de çoğaltırlar. Yaygın kullanılan vektörlere pUC19 ve pBR322 örnek verilebilir (Şekil 2.3). Bu tip vektörler nispeten küçük DNA fragmentlerini kabul ederler. Özellikle genom araştırmalarında daha büyük (100 kb-2000 kb gibi) DNA moleküllerini kabul eden vektörler de vardır. Bunlar organizmaların yapay kromozomları olarak manipüle edilmişlerdir (BAC, YAC gibi).



Şekil 2.3: pUC19 ve pBR322 klonlama vektörlerinin fiziksel haritası.

2.1.5 Konak sistemleri

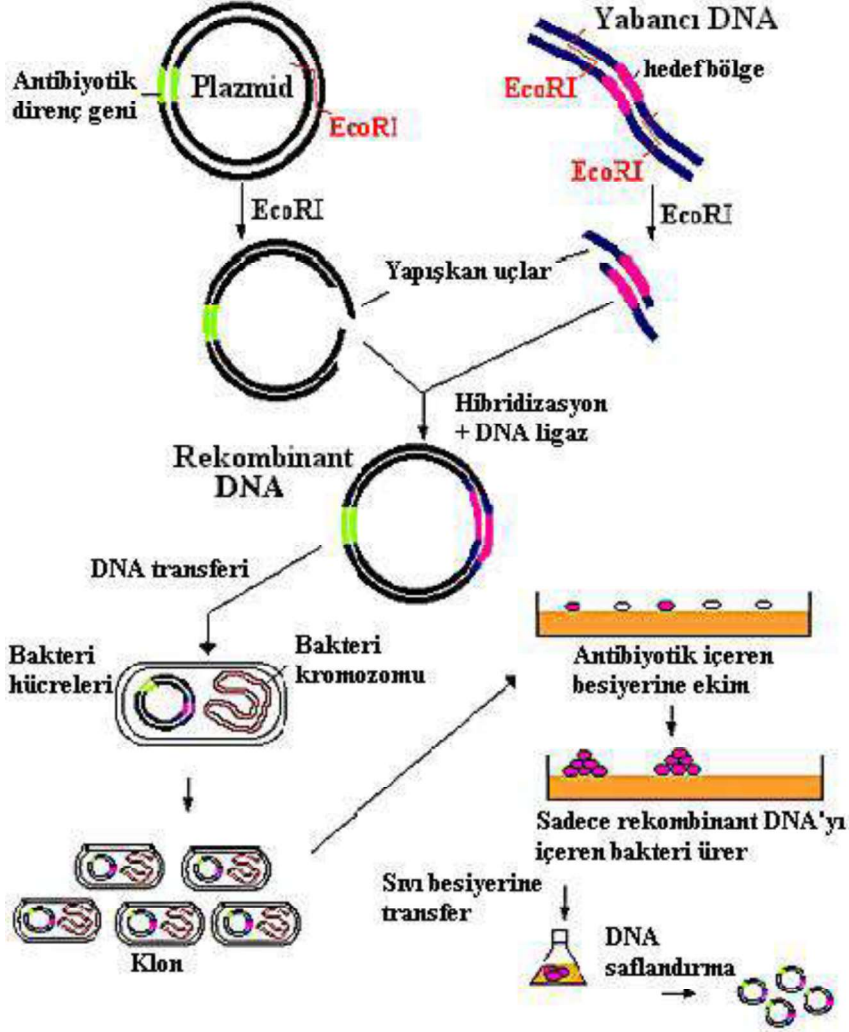
Hedef DNA ile bağlanmış durumdaki bir vektör molekülüne **rekombinant vektör** denir. Rekombinant vektör replike edilerek çoğaltılması gerekir. Bunun için canlı hücelere ihtiyaç vardır. Bu hücreler genellikle prokaryotik hücreler olup, genellikle *E. coli* suşlarıdır. Rekombinant DNA moleküllerinin replikasyonunun yapıldığı bu hücreler **konak hücre** olarak adlandırılır. Her vektörün replike olabildiği belli bir konak hücre vardır. Bir konak hücre kolay üretilebilmeli, çok sayıda vektörü kabul edebilmeli yani onların replikasyonunu gerçekleştirebilmelidir.

2.1.6 DNA transfer yöntemleri

Rekombinant DNA in vitro'da elde edilir. Bu DNA'nın çoğaltılması (replikasyonu) için konak hücre içine transfer edilmesi gerekir. Normalde hücreler yabancı DNA'yı kolayca kabul etmezler. Dolayısıyla konak hücreye DNA transferi için bazı yöntemler gereklidir. Klonlama işlemlerinde *E. coli* hücrelerine DNA nakli için en yaygın olarak kullanılan iki yöntem, **transformasyon** ve **elektroporasyon**dur. Transformasyonda konak hücelere özel işlemler uygulanarak (sözgelimi 4°C'de CaCl₂ uygulaması gibi) hücreler DNA'yı kabul edebilir hale getirilir (alıcı hücre), sonra DNA ile karıştırılır. Bir sıcaklık şokundan sonra DNA hücre içine girer. Elektroporasyonda hücreler kontrollü olarak elektrik alana maruz bırakılarak zar organizasyonunun az miktarda bozulması sağlanır. Bu sırada ortamdaki DNA hücreye girer. Bu yöntemlerin dışında **konjugasyon**, özellikle ökaryotik konak hücreler için virüs aracılığı ile transfer, **biyolistik** (molekül tabancaları) ve **mikroenjeksiyon** yöntemleri gibi DNA nakil yöntemleri de vardır.

2.2 Klonlama İşlemleri

Genomik bir DNA bölgesinin klonlanması, hedef geni taşıyan DNA bölgesinin bir vektöre bağlanarak konak hücreye nakledildikten sonra doğru rekombinant vektörün belirlenmesi işlemlerini içerir (Şekil 2.4)



Şekil 2.4: Moleküler klonlama işlemlerinin özet şeması

2.2.1 Gen kütüphanesinin oluşturulması

1. Belli bir geni klonlanmak istenen organizmanın genomik DNA'sı saflandırılır ve uygun bir restriksiyon endonükleazla kesilir. Artık genom daha küçük, farklı büyüklükte yüzlerce DNA fragmentleri haline gelmiştir. Bu parçaların normalde 10 kb'dan küçük olmaları istenir. Özel durumlar hariç tutulursa bu parçalardan sadece biri hedef geni taşır, fakat bunun hangi fragment olduğunu belirleyip diğerlerinden ayırmak bu aşamada olası değildir.

2. Seçilecek uygun bir vektör genomik DNA'nın kesildiği restriksiyon enzimi ile kesilir ve vektörün kendi üzerine tekrar halkalanmasını engellemek için dana bağırsak alkalen fosfataz enzimi ile 5' fosfat grupları koparılır.
3. Sonra genomik DNA fragmentleri ve kesilmiş vektör karıştırılır, T4 DNA ligaz eklenerek vektör ile genomik DNA parçalarının birbirine bağlanması sağlanır. Bu olay **ligasyon** olarak adlandırılır. Ligasyon sırasında yeterli miktarda vektör ve genomik DNA fragmentleri sağlanırsa, rasgelelik esasına göre genomun tamamının, parçalar halinde farklı vektör moleküllerine bağlanması gerçekleşecektir. Sonuçta, bütün genoma ait bilgi test tüpü içindeki rekombinant vektörlere bağlanmış durumdadır. Bu aşamadan sonra her bir rekombinant vektörün çoğaltılması gerekir. Yani her bir bireysel rekombinant vektör bir konak hücreye nakledilmelidir.
4. Rekombinant vektör karışımı, alıcı hale getirilmiş konak hücrelere veya elektroporasyon uygulanacak konak hücrelere karıştırılır. Her bir konak hücre büyük olasılıkla tek bir rekombinant vektörü kabul eder. Dolayısıyla her hücre, yapısında genomun bir parçasının bağlı bulunduğu tek bir rekombinant vektörü taşır. Bu aşamada, rekombinant vektör taşıyan her bir hücre bir klon olarak kabul edilebilir.
5. Transformasyon sonrasında hücreler vektör tarafından direnç fonksiyonu kodlanan antibiyotiği içeren besiyerinde üretilir. Transformasyon sırasında milyarlarca hücre arasından az sayıda hücre (yüzlerce veya birkaç bin) rekombinant vektörü kabul edecektir. Dolayısıyla antibiyotik içeren katı besiyerinin yüzeyinde de vektörün sağladığı direncin avantajını kullanarak rekombinant vektörü taşıyan hücreler gelişerek koloni oluşturabilecektir. Her koloni tek bir hücreden köken aldığı için bir koloniyi oluşturan her hücre aynı tip rekombinant vektör taşır. Bu nedenle her koloni bir **klon** olarak adlandırılır. Yani bir koloninin bütün üyeleri birbirlerinin klonlarıdır, genetik yapıları aynıdır. Elde edilen bu klonların tamamına **gen kütüphanesi** denir ve optimum şartlarda belli bir geni klonlanmak istenen organizmanın genomundaki genetik bilginin tamamını taşır.

2.2.2 Gen kütüphanesinden doğru klonun seçilmesi

Gen kütüphanelerinden hangi klonun hedef gen bölgesini taşıdığı bilinmez. Yüzlerce klondan (koloni!) biri veya bir kaç doğru klon olabilir. Sonuçta bütün koloniler aynı tip antibiyotik direncine sahip olduklarından bir ayırım yapmak imkansızdır. Bu nedenle doğru klonun seçilebilmesi için ek yöntemlere ihtiyaç vardır. Doğru klonun seçilmesinde başlıca iki yöntem uygulanır: DNA hibridizasyonu ve genetik komplementasyon.

DNA hibridizasyonunda, hedef DNA molekülü ile belli oranda homolojiye sahip olan DNA molekülleri kullanılır. Hedef DNA'ya homolog olan bu molekül radyoaktif olarak veya diğer yöntemlerle işaretlenerek görüntülenebilir hale getirilir. İşaretlenerek görüntülenebilir hale getirilmiş bu tip moleküllere **prob** denir. Bir prob DNA, tam veya belli oranda homolojiye sahip bir DNA karışımında bir denaturasyon-renaturasyon döngüsünden sonra diğer molekülle hibritleşebilir. Hibrit durumdaki prob takip edilebildiği için bilinmeyen DNA'nın proba benzer olduğuna kara verilir.

Klonlamak istediğimiz gen akraba bir organizmadan daha önce klonlanmışsa o organizmanın ilgili gen bölgesi prob olarak kullanılabilir. Böyle bir proba sahipse gen kütüphanesini oluşturan klonlar tek tek veya toplu olarak proba karıştırılarak hangi klonun hibritleştiğini belirleyebiliriz. Proba hibritleşen klon hedef geni taşıyan klon olarak belirlenir ve daha ileri analizler için kullanılır.

Eğer prob mevcut değilse, uygulanacak tek yöntem genetik komplementasyondur. Klonlanacak gen bakımından mutant olan bir suş mevcutsa, bu suşa yabancı tip bir gen sağlandığında suşun fenotipi yabancı tipe dönüşecektir. Bu olay genetik komplementasyon olarak adlandırılır. Mutant hücreye her bir klondan izole edilmiş rekombinant vektör eklenerek yabancı tip fenotipin kazanılıp kazanılmadığına bakılır. Mutant suşa yabancı tip fenotipi sağlayan klon doğru klon olarak alınır ve daha ileri analizlere tabi tutulur.

2.3 Klonlama Sırasında Dikkat Edilecek Hususlar

1. **Restriksiyon endonükleaz seçimi:** Genomik DNA ve vektörü kesmek için kullanılan restriksiyon endonükleazlar yapışkan uçlar üretmelidir. Bu ligasyonu kolaylaştıracaktır. Restriksiyon enzimi tanıma bölgelerinin konumu (direnç geni veya *lacZ'* geni içinde olması) rekombinant ve yabancı tip vektörlerin seçimini kolaylaştıracaktır. Seçilen enzim genomik DNA'yı 10 kb'ın altında fragmentler haline getirmelidir.
2. **Vektör seçimi:** Vektör kullanılacak konağa uyumlu olmalı, yani ilgili konak içinde replikasyon ve ekspresyon yapabiliyor olmalı. Ayrıca birden fazla seçilebilir işaretleyici karakteri kodlayan gen bölgelerine ve yeterli sayıda restriksiyon enzimi tanıma bölgesine sahip olmalıdır. pBR322, iki antibiyotik direnç geni ve birkaç kullanılabilir restriksiyon endonükleaz tanıma bölgesine sahipken pUC19 bir antibiyotik direnç geni, bir *lacZ'* geni ve çok sayıda restriksiyon enzimi tanıma bölgesine sahiptir.
3. **Prob seçimi:** Prob ile hedef DNA arasındaki homoloji ne kadar fazla ise hibritleşme oranı da o kadar yüksektir. Dolayısıyla bir prob seçerken mümkün olan en yakın bir akraba

organizmaya ait gen bölgesi tercih edilmelidir. Bu organizma aynı türün diğer bir suşuna, bu mümkün değilse akraba bir tür veya cinse ait olabilir. Eğer klonlanmak istenen gen akraba organizmalardan da klonlanmamışsa bu durumda uzak akraba organizmaların ilgili genleri karşılaştırılarak sentetik bir DNA sentezlenip bu DNA prob olarak kullanılır.

4. **Klonlanacak genin konağa etkisi:** Klonlanan genler genellikle konak olarak kullanılan organizma dışında diğer bir organizmanın genidir. Bu yabancı genlerin ürünleri konak için zararlı olmamalıdır. Eğer klonlanan genin ürünü konak için zehirli ise bu genin o konak içinde klonlanması mümkün değildir.
5. **Genetik olarak manipüle edilmiş organizmaların kontrolü:** Genetik mühendisliği yoluyla gerek plazmit yapısında ve gerekse genomik DNA'sında manipulasyon yapılmış klonlar (bakteriler veya diğer organizmalar) doğal denge için daima bir tehlike arz ederler. Bu bakımdan her ne şekilde olursa olsun gelişebilir formdaki bu tip organizmaların doğaya bırakılması kesinlikle önlenmelidir. Bu tip organizmalar ancak kontrollü laboratuvar şartlarında üretilebilir. Doğaya bırakılacak organizmalar için özel ve yasal güvenlik testlerinin tamamlanması gerekir.