

3 FONKSİYONEL BİR ÖKARYOTİK GENİN KLONLANMASI: cDNA KLONLAMA

Ökaryotik genomlarda genler **intron** denilen kodlamaya katılmayan DNA dizileri taşırlar. Dolayısıyla ökaryotik bir genomdan fonksiyonel bir gen bölgesi doğrudan klonlanamaz. İntron içeren gen bölgesi transkripsiyon ile öncü mRNA'ya dönüştürüldükten sonra intronlar gen bölgesinden uzaklaştırılır ve sadece **ekson** denilen kodonları taşıyan genin fonksiyonel kısmı kalır (olgun mRNA). Eğer olgun mRNA üzerinden bir komplementer DNA (complementary DNA = cDNA) sentezlenirse bu cDNA prokaryotlarda olduğu gibi fonksiyonel bir gen yapısına sahip olacaktır.

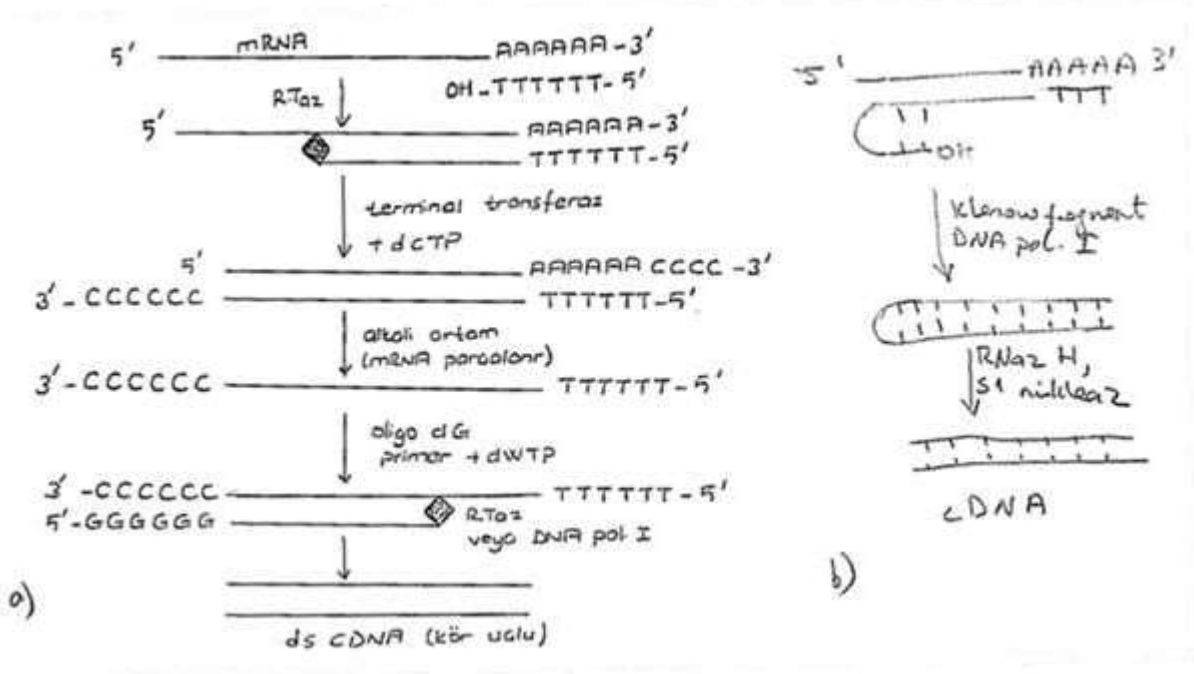
3.1 cDNA Sentezi

Olgun bir mRNA 3' ucunda bir poli A bölgesi içerir. Bu bölgeyle hibritleşmek üzere bir poli T oligonükleotit sentezlenirse, bu bölge DNA polimerazların zincire yeni nükleotitler eklemesi için bir 3'-OH ucu sağlayacak ve komplementer zincir sentezlenecektir. Fakat hücresel DNA polimerazlar RNA'yı kalıp olarak kullanamazlar, sadece DNA'yı kalıp olarak kullanılabilirler. Bazı RNA virüsleri RNA'yı kalıp olarak kullanarak DNA sentezi gerçekleştiren bir enzime, revers transkriptaz (RNA bağımlı DNA polimeraz, ters transkriptaz) enzimine sahiptirler. Bu enzim kullanılarak olgun mRNA'dan bir cDNA sentezlenebilmektedir.

Rekombinant DNA uygulamalarında, etkili bir şekilde cDNA sentezlenebilmektedir. Bu metotların esasları şu şekilde özetlenebilir: mRNA'nın poli A bölgesiyle eşleşmek üzere bir poli T oligonükleotit sentezlenir (Şekil 3.1a). Bu oligonükleotit primer olarak iş görür, 3'-OH grubu sağlar. Revers transkriptaz (RTaz) bu 3'-OH ucuna deoksinükleotit trifosfatları (dATP, dCTP, dGTP ve dTTP) ekler ve mRNA kalıbı boyunca tek zincirli bir cDNA sentezlenir. Bu aşamada iki farklı yaklaşımla diğer zincir sentezlenebilir. Bu yaklaşımlardan birinde, cDNA:mRNA hibritinin 3' uçlarında terminal transferaz ile poliC uçları oluşturulur (Şekil 3.1a). Sonra ortam alkalileştirilerek mRNA zinciri parçalanır, geriye kalan tek zincir cDNA molekülü saflandırılır. Bu cDNA molekülünün 3' ucunda bir poli C bölgesi mevcuttur. Bu poli C bölgesi ile eşleşecek ve 3'-OH ucu sağlayacak bir poli G oligonükleotiti sağlanır. Daha sonra ortama T4 DNA polimeraz eklenerek cDNA çift zincirli hale getirilir.

Diğer yaklaşımda da, in vitro'da ters transkriptaz aktivitesinden faydalanılır. RNA kalıp olarak kullanılıp komplementer DNA zinciri oluşturulur. Kalıp RNA bitiminde DNA'nın kendi üzerinde kıvrıldığı, **saç tokası yapısı** denilen bir yapı oluşur. Bu yapı yeni

sentezlenen DNA zinciri üzerinde bir serbest 3' OH ucu oluşumunu sağlar. Ters transkriptaz bu ucu kullanarak DNA zincirinin komplementerini sentezler. Saç tokası bölgesi tek zincirli olduğundan, tek zincirli DNA'yı parçalayan S1 nükleaz gibi özel DNaz enzimleriyle uzaklaştırılır (Şekil 3.1b).

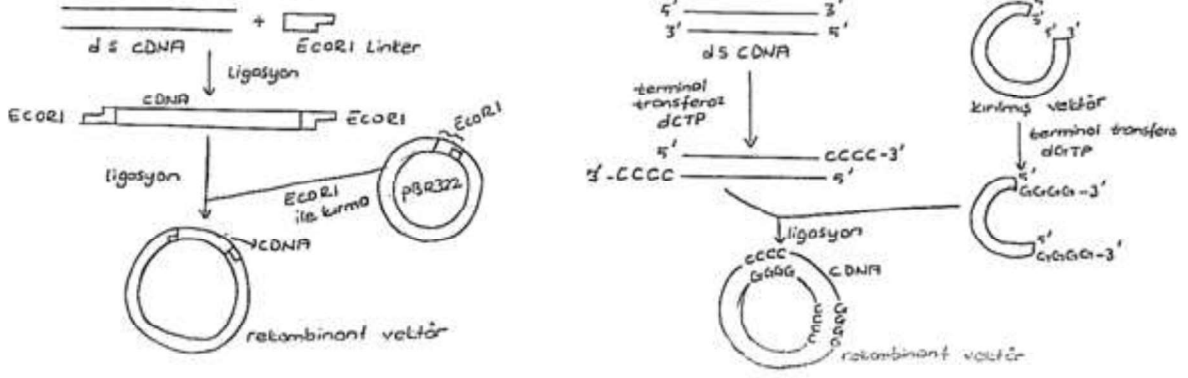


Şekil 3.1: Olgun bir mRNA üzerinden çift zincirli cDNA sentezi.

3.2 cDNA'nın Ligasyonu

Revers transkriptaz aktivitesi ile sentezlenmiş bir cDNA molekülü kör uçlara sahiptir. Kör uçlu DNA moleküllerinin vektör içine ligasyonu çok zordur. Bu cDNA molekülüne yapışkan uçlar eklenmesi klonlamayı kolaylaştıracaktır. Bunun için yaygın kullanılan iki metot vardır (Şekil 3.2). Bu metotlardan biri restriksiyon enzimi tanıma bölgeleri içeren bir linker (bağlayıcı) DNA molekülünün kör uçlara bağlanması ve diğeri de cDNA moleküllerinin uçlarına homopolimerlerin bağlanmasıdır (Şekil 3.2).

Sonuçta yapışkan uçlarla vektör içine ligasyonu sağlanan cDNA genomik DNA klonlama sırasında izlenen yollar takip edilerek klonlanır. Doğru klonun seçimi bir prob mevcutsa radyoaktif veya immünolojik işaretleme ile yada genetik komplementasyon ile gerçekleştirilir.



Şekil 3.2: DNA linker ve homopolimer eklenmesi yoluyla cDNA'nın ligasyonunun kolaylaştırılması.