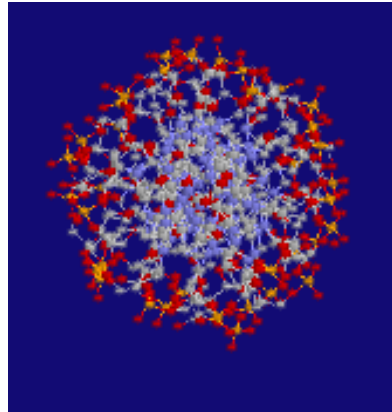


8. Hafta

Gen Klonlanması



& DNA kütüphanelerinin
oluşturulması

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Gen Klonlanması

- Klonlama ne demektir?
- Gen klonlaması nedir? Bütün bir organizmayı klonlamadan farkı nedir?
- Gen klonlaması niçin yapılır?
- Nasıl yapılır?
- DNA kütüphanesi, cDNA kütüphanesi nedir?
- Gen klonlanmasına ilişkin etik kaygılar nedir?

Klonlamada Kullanılan Enzimler

- DNA sentezleyen enzimler
- DNA sekanslarını birleştiren enzimler
- DNA'nın 5'-ucunu modifiye eden enzimler
- DNA'yı ayrıştıran enzimler

- DNA sentezleyen enzimler
 1. DNA polimeraz I
 2. T4 DNA polimeraz
 3. Terminal transferase
 4. Reverse transkriptase
- DNA sekanslarını birleştiren enzimler
 1. *E. coli* DNA ligase
 2. T4 DNA ligase

- DNA'nın 5'-ucunu modifiye eden enzimler

1. Alkalın fosfataz
2. T4 polinukleotid kinase

- DNA'yı ayırıştırıcı enzimler

1. Nuklease S1
2. Ekzonukleaz III

3. Restriksiyon endonukleazlar

- a) Yapışkan uç oluşturanlar
- b) Küt uç oluşturanlar
- c) İzoşizomerler
- d) Değişik tanıma yapanlar

DNA KLONLAMA: RESTRIKSİYON ENZİMLERİ

RESTRIKSİYON ENZİMLERİ: DNA moleküllerini spesifik bölgelerden kesen bakteriyel proteinler (endonükleazlar).

- **restriksiyon bölgesi:** Bir restriksiyon enzimi tarafından tanınan 4-8 bazlık spesifik DNA sekansı
- **restriksiyon fragmenti:** Bir ya da daha fazla RE ile kesim sonucu daha büyük bir DNA parçasından (örn. genomik DNA) ayrılan daha küçük DNA porsiyonu
- birbirinden farklı yüzlerce RE bulunmaktadır, bunların her biri kendine özel restriksiyon bölgesine sahiptir

EcoRI adının tanımlanması

Kısaltma	Anlam	Tanım
E	<i>Escherichia</i>	genus
co	<i>coli</i>	tür
R	RY13	suş
I	İlk identifiye edilen	Bakteri içerisinde identifikasyon sırası

Tablo 5.1. Bazı restriksiyon enzimlerinin spesifik kesim bölgeleri.

Organizma	Enzim Adı	Kesim Bölgesi
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRI</i>	G↓ A <u>A</u> TTC
<i>Escherichia coli</i>	<i>EcoRII</i>	↓ CC <u>A</u> GG
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>HindII</i>	GTPPy↓ PuA <u>C</u>
<i>Haemophilus hemolyticus</i>	<i>HhaI</i>	G <u>C</u> G↓ C
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>BsuRI</i>	G↓ <u>C</u> C
<i>Brevibacterium albidum</i>	<i>BalI</i>	TGG↓ <u>C</u> CA
<i>Thermus aquaticus</i>	<i>TaqI</i>	T↓ CG <u>A</u>

Restrüksiyon Enzimleri (Spesifik Makaslar)

...AATTGCTTAG**GAATTC**GATTTG...
...TTAACGAAT**CTTAAG**GCTAAAC...



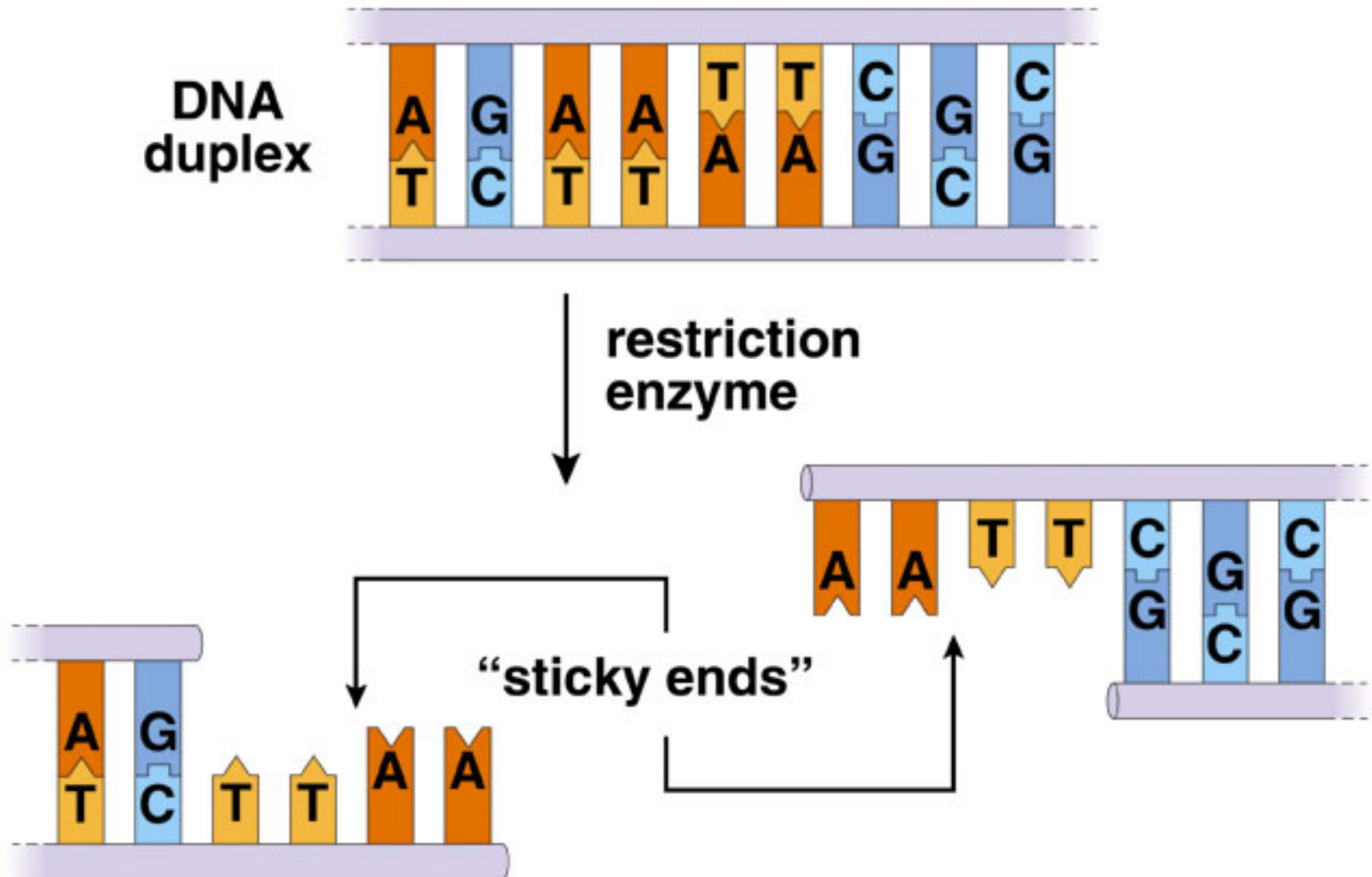
EcoRI GAATTC sekansına bağlanır ve DNA'yı keserek
DNA fragmentleri oluşturur



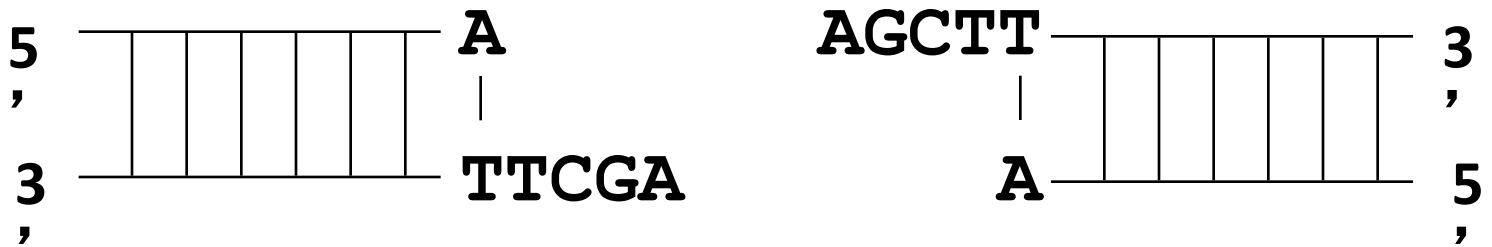
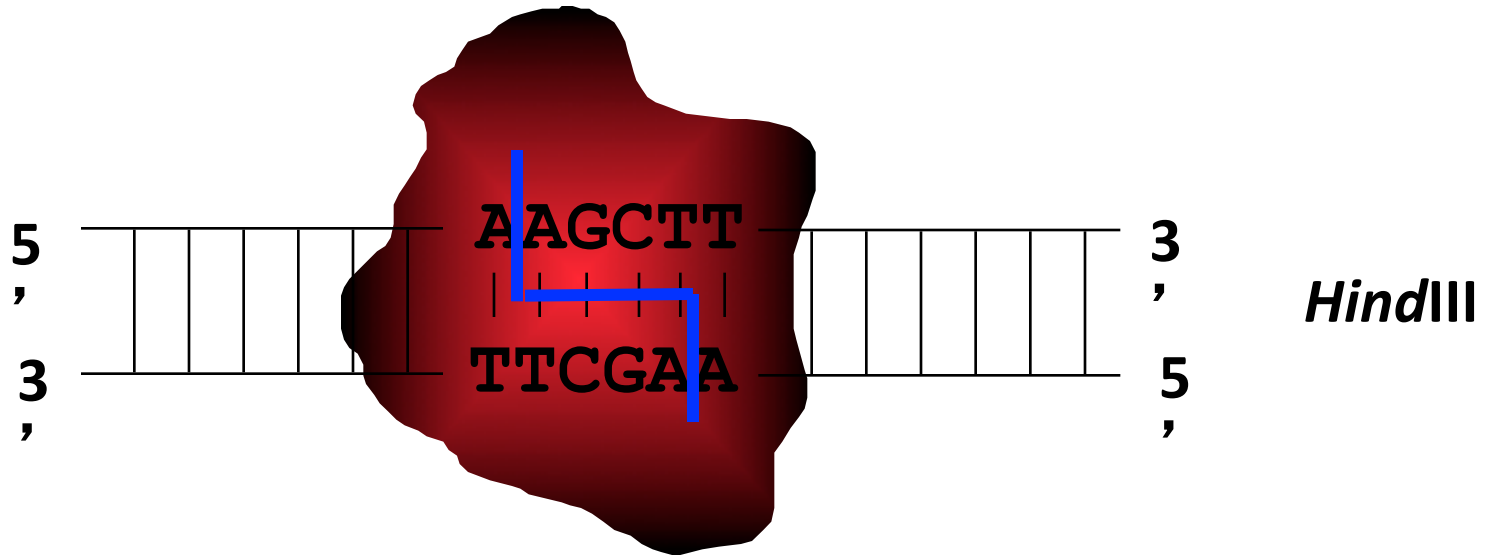
...AATTGCTTAG**G**
...TTAACGAAT**CTTAA**

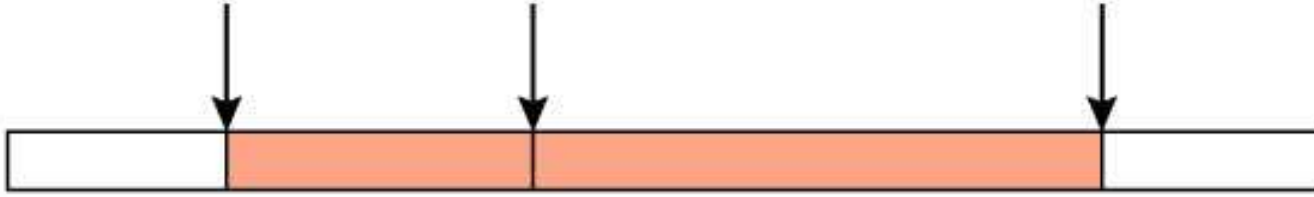
AATTCGATTTG...
GGCTAAAC...

Rekombinant DNA

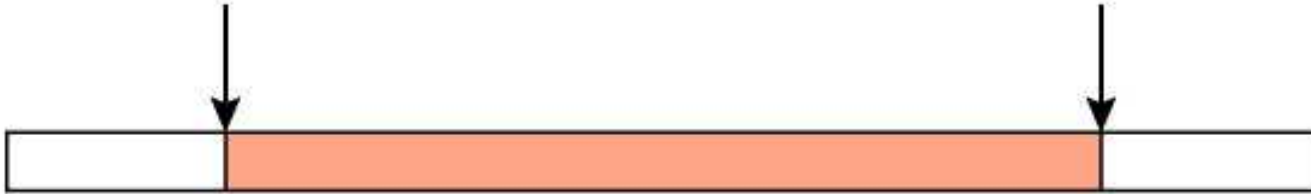


DNA KLONLAMA: RESTRÜKSİYON ENZİMLERİ





**EcoRI ile kesim
4 fragment üretmiş**



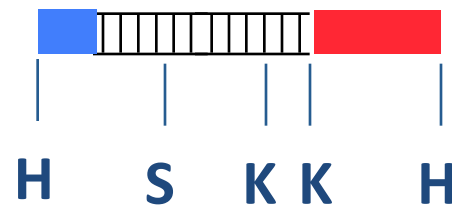
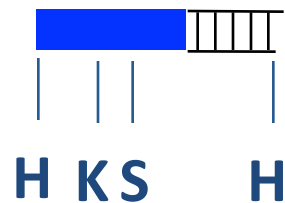
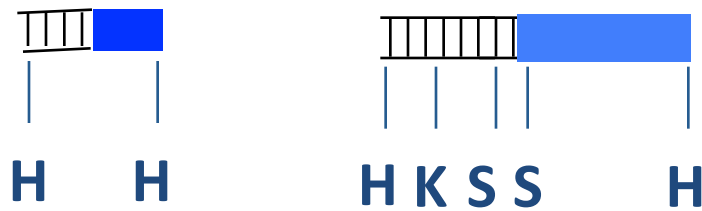
**EcoRI ile kesim
3 fragment üretmiş**



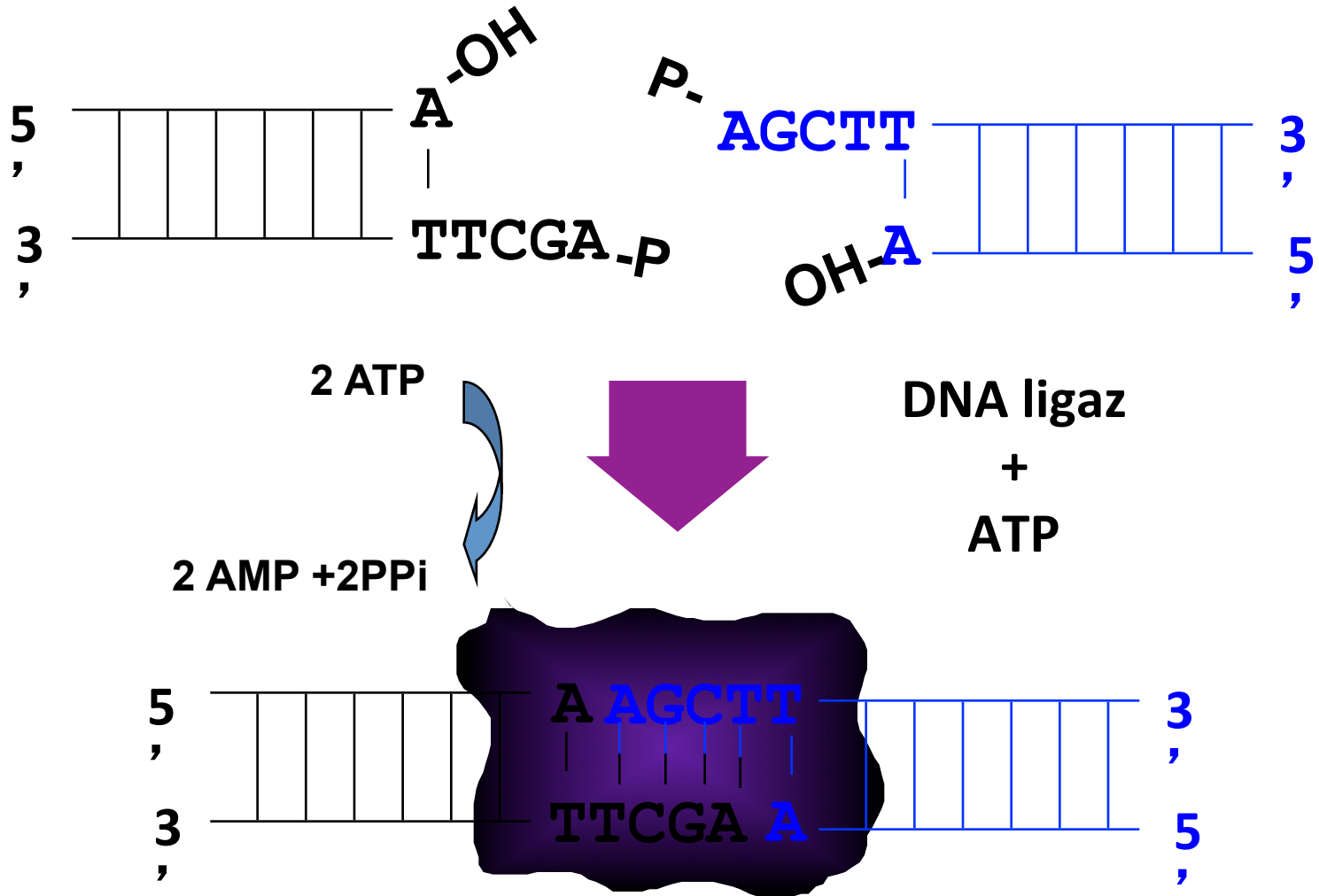
DNA KLONLAMA: RESTRIKSİYON HARİTALARI



*Hind*III kesimi



DNA KLONLAMA: DNA LIGAZ



Klonlama (Tanımı)

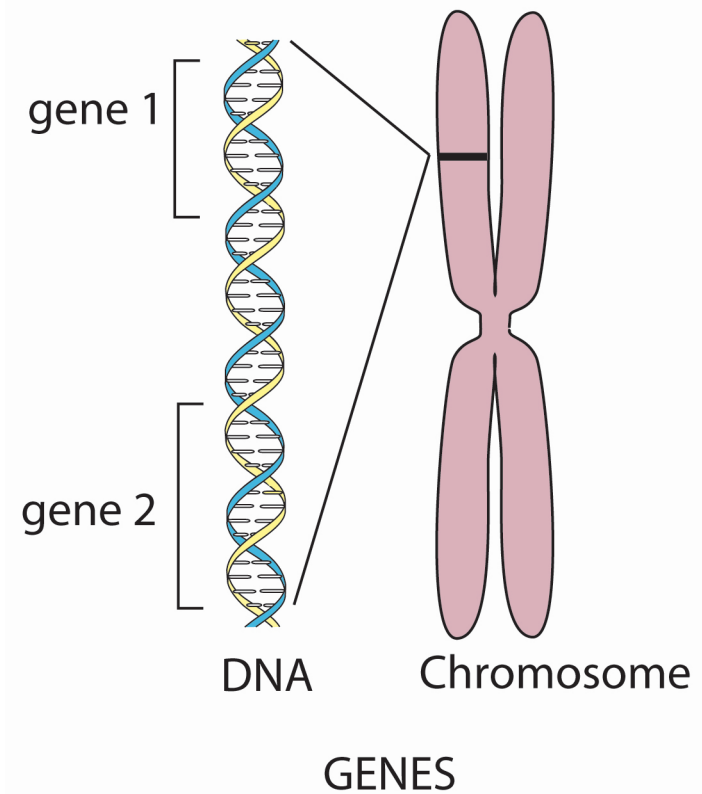
- Yunancada - klon, ikiz
- Belirli bir DNA parçasının (klon) kompleks bir DNA karışımının içerisinde saptanarak elde edilmesi ve daha sonra bu DNA parçasının (klonun) fazla miktarlarda üretilmesi
- Bir bireyin aseksüel olarak üretilmiş bileşimi; bir makromolekülün (DNA ya da bir antikor) tamamı ya da bir kısmının kopyasını içeren bir grup
- Ebeveyninin tek bir somatik hücresinden oluşturulan ve genetik olarak ebeveynine benzer olan birey (sözlük)

Gen Klonlaması'nın Aşamaları

- Gen taşıyan DNA'nın (veya RNA) saf olarak elde edilmesi,
- Genin yerinin belirlenmesi
- Genin çıkarılması
- Taşıyıcı vektör DNA'nın elde edilmesi
- Gen DNA'sının vektör DNA'sı ile birleştirilmesi
- Oluşan rekombinant vektör DNA'nın alıcı hücreye aktarılması
- Seleksiyon
- Gen ürününün kontrol edilmesi

DNA klonlama nedir?

- DNA bir organizmadan ekstrakte edildiğinde bütün genleri elde edilir
- Gen (DNA) klonlamasında belirli bir gen kopyalanır



Tüm organizmalar da klonlanır ancak
bu daha farklı şekilde olur!!!



Neden DNA klonlarız?

- Spesifik bir genin izole edilerek nukleotid dizisinin belirlenmesi
- Kontrol DNA sekanslarının belirlenmesi
- Protein/enzim/RNA fonksiyonlarının araştırılması
- Mutasyonların belirlenmesi Örn. Spesifik hastalıklara yönelik gen kusurlarının ortaya konması
- Organizmaların spesifik amaçlarla tekrar üretilmesi Örn. İnsulin üretimi, dirençli ırkların oluşturulması

DNA nasıl klonlanır?

- DNA kan gibi organik materyalden ekstrakte edilir
- RE'ler, örn. *EcoRI*, *HindIII*, vb., DNA'yı küçük parçalara ayırır
- Aynı enzimle kesilmiş farklı DNA parçaları birleştirilebilir ya da rekombine edilebilir

Kan örneği



DNA



Restriksiyon enzimleri

DNA KLONLAMASINDA KULLANILAN BİLEŞENLER

RESTRIKSİYON ENZİMLERİ

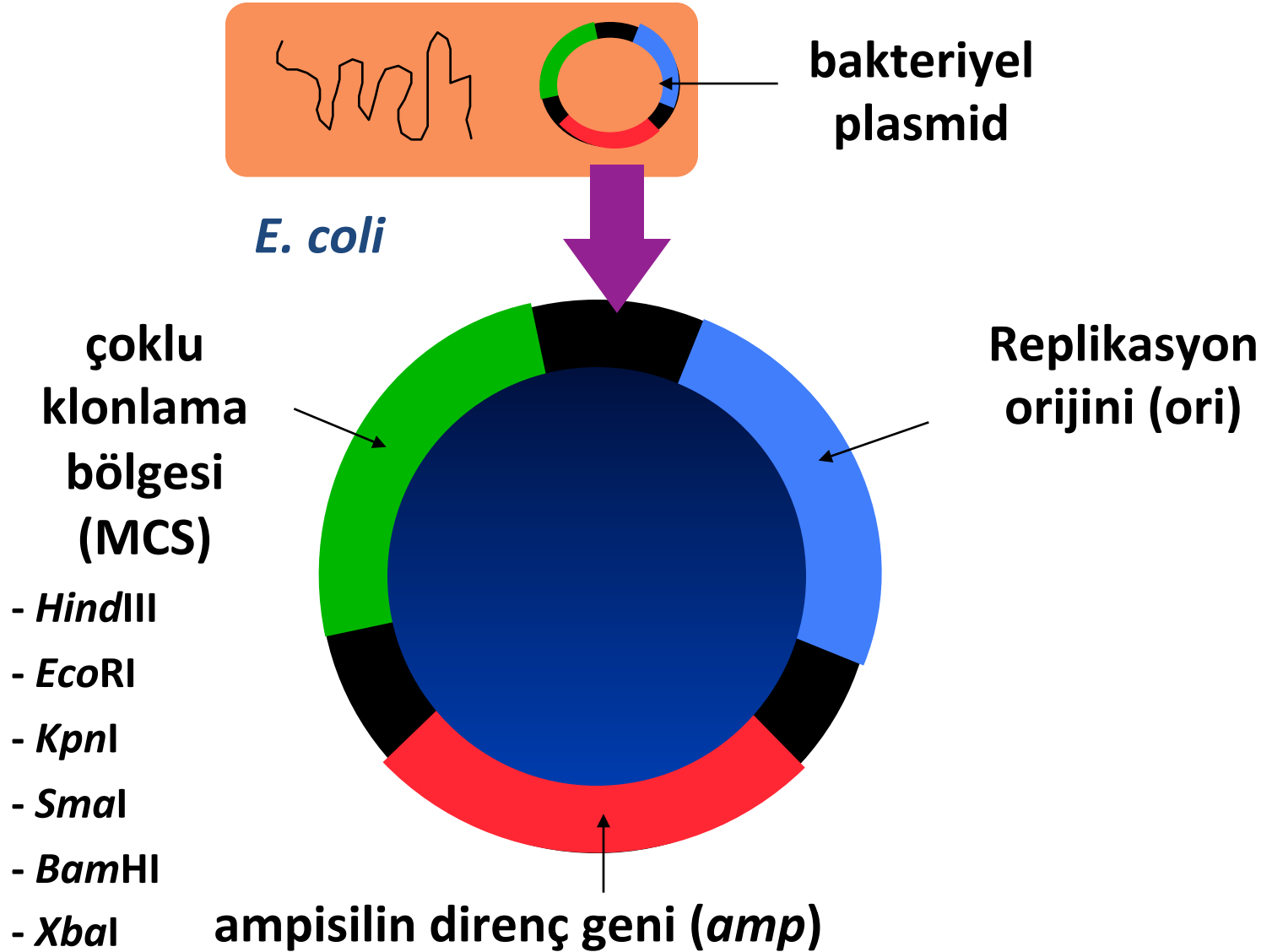
VEKTÖRLER

DNA LİGAZ ENZİMİ

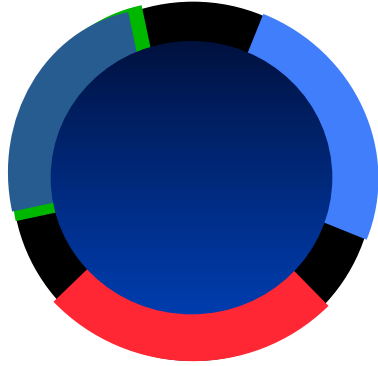
KOMPETENT BAKTERİYEL HÜCRELER

ANTİBİYOTİKLER

DNA KLONLAMASI: plasmid vektörler



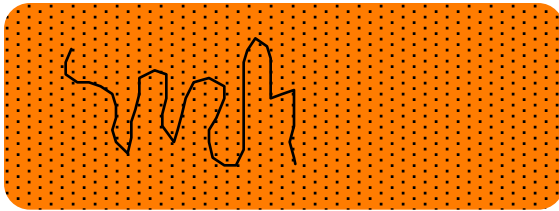
DNA KLONLAMASI: TRANSFORMASYON



“VEKTÖR”

+

+



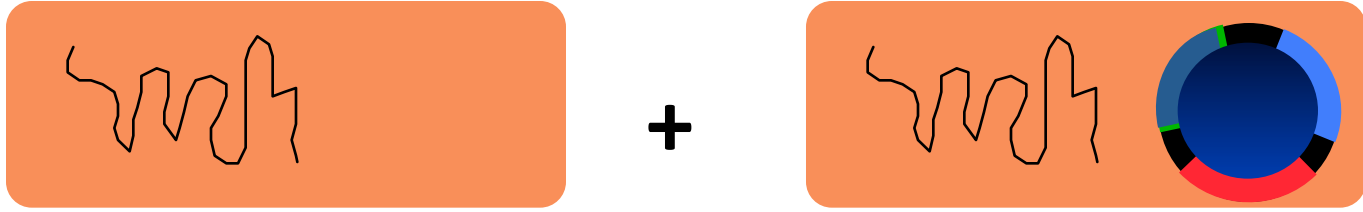
“KOMPETENT HÜCRELER”
DNA alımını kolaylaştıracak şekilde
kimyasal muamele görmüş hücreler

E. coli

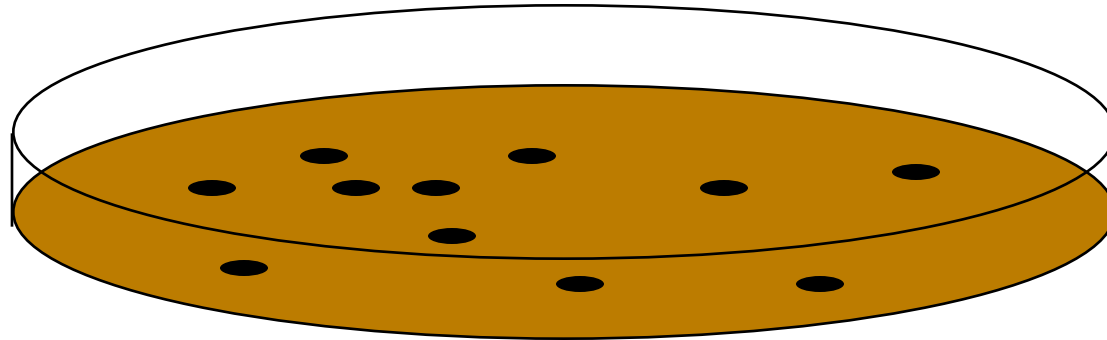


“TRANSFORME EDİLMİŞ”
BAKTERİ

DNA KLONLAMASI: SELEKSİYON

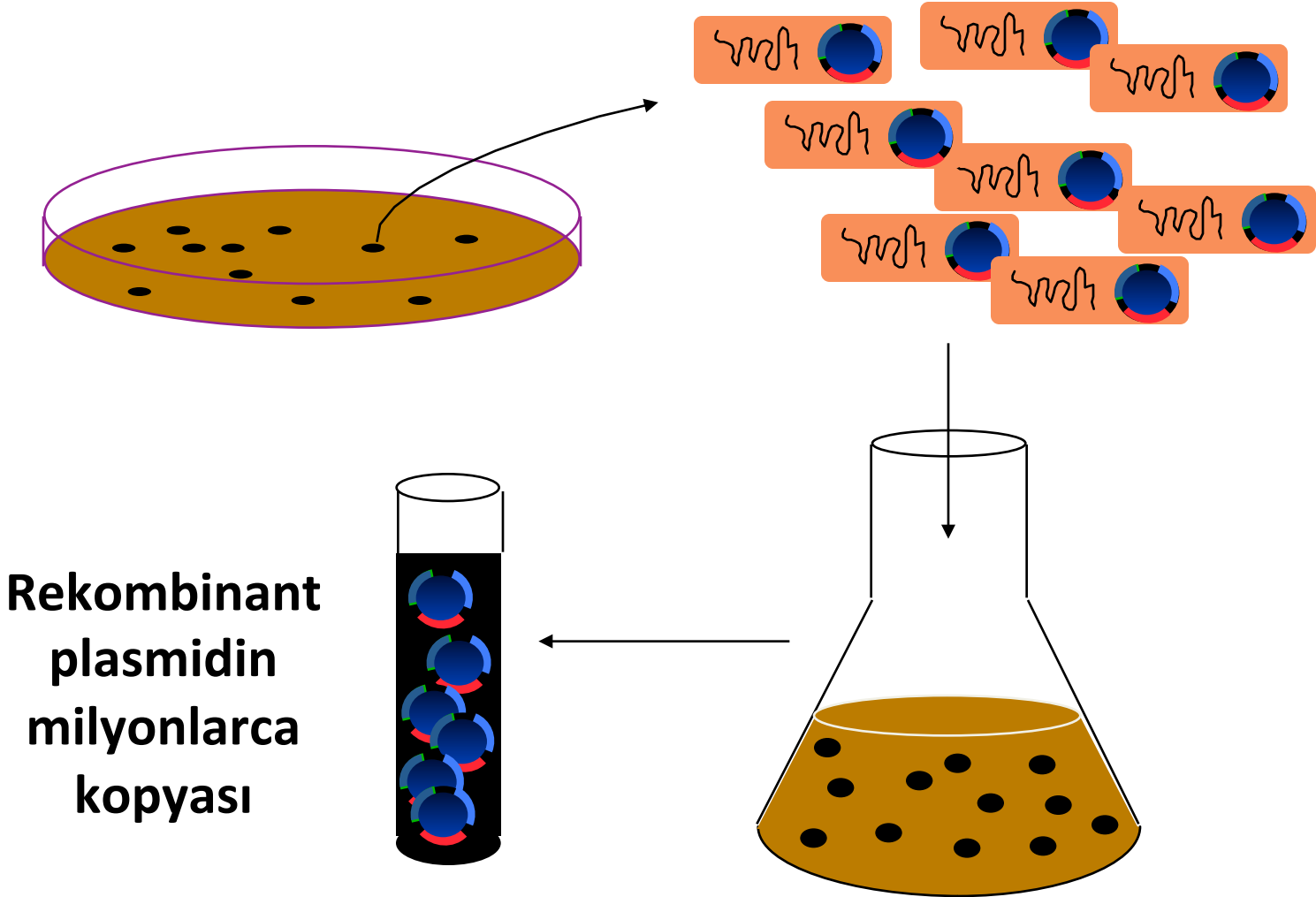


Luria Broth Agar
+
Ampicillin



**SADECE AMPİSİLİNE DİRENÇLİ (PLASMİD-İÇEREN)
BAKTERİLER ÜREYEBİLMEKTE**

DNA KLONLAMASI: YÜKSEK MİKTARDA ÜRETİM



DNA KLONLANMASI: PLAZMİDLER

PLASMİD: Bakteri içerisinde bakteriyel genomdan ayrı olan, ayrı olarak replike olan, sirküler çift-iplikçikli DNA molekülü

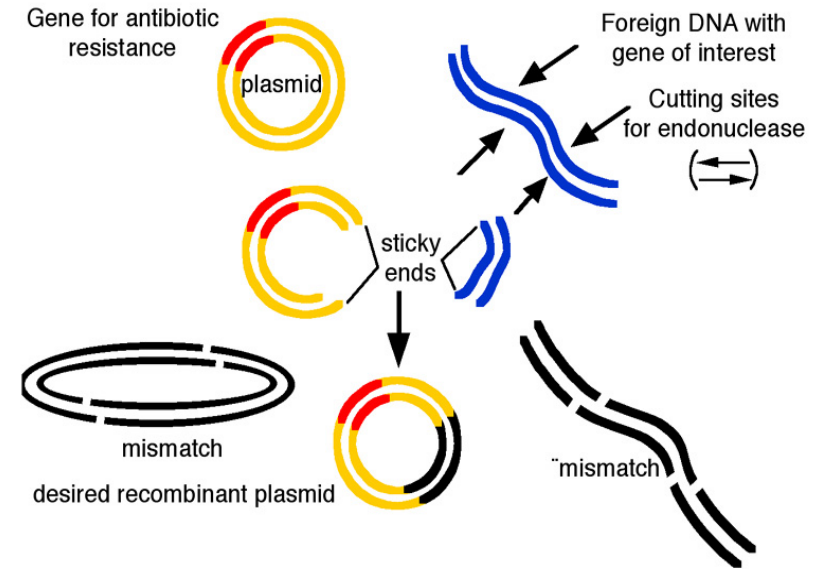
- bir DNA klonlama vektörü olarak işlev görecektir şekilde dizayn edilir ve sadece klonlanacak sekansları içerir:
 - bir bakteriyel **replikasyon orijini** (ori)
 - bir **antibiyotik direnç geni** [örn. ampicilline dirençten sorumlu (amp)]
 - bir ya da daha fazla **özel restriksiyon enzim kesim bölgesi** bu yabancı DNA parçasının eklenmesine olanak sağlar (MCS)
- DNA MCS'ye eklendiğinde aktivite kaybeden bir ***B-galactosidase*** geni,
- yabancı bir genin prokaryotik veya ökaryotik hücrelerde ekspresyonunu sağlayan **promotorlar** içerebilirler.

Vektör Tipleri

- Plasmidler: 15 kb'lık kapasite.
- Bakteriyofajlar (Lambda fajı): 25 kb kapasite.
- Kosmid vektörler: 35-45 kb kapasite.
- Bakteriyel orijinli yapay kromozomlar (BAC): 50-300 kb.
- Maya orijinli yapay kromozomlar (YAC): 300-1500 kb.
- İnsan orijinli yapay kromozomlar (HAC): 2000 kb'dan büyük kapasite.

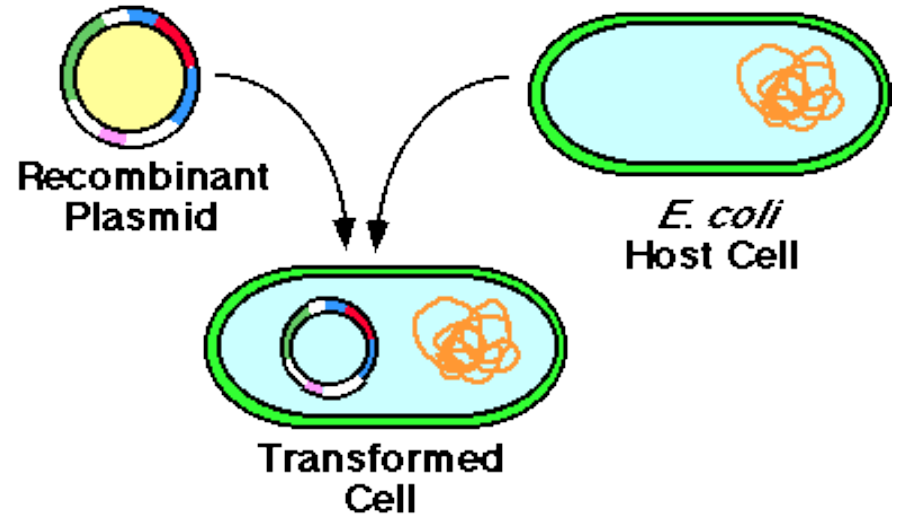
DNA Klonlanması, II

- Bakteriyel plazmidler (bakterinin kromozomu dışında bulunan küçük sirküler yapıdaki DNA'lar) aynı RE ile kesilir
- Böylelikle bir DNA parçası plazmid DNA'ya eklenerek bir rekombinant DNA molekülü oluşturulabilir



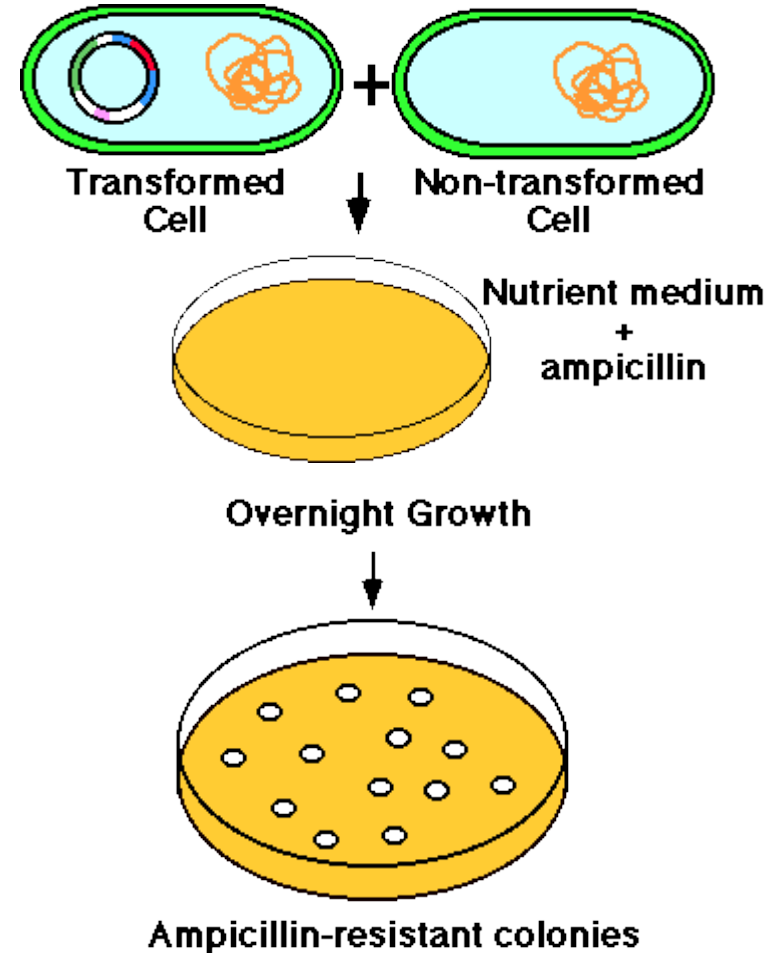
DNA Klonlanması, III

- Bu rekombinant plazmidler daha sonra kompetent hale (plazmidleri alabilir hale) getirilmiş bakterilerle bir araya getirilir
- Bu ekleme ya da aktarım işlemine transformasyon adı verilir.



DNA Klonlanması IV

- Bu plasmidler antibiyotik direnç genleri taşımaktadır
- Bu şekilde direnç genlerini taşıyan bakteriler özel antibiyotikli besiyerlerinde ürerken diğer bakteriler ölür, dolayısıyla sadece transforme edilen bakteriler hayatta kalır.

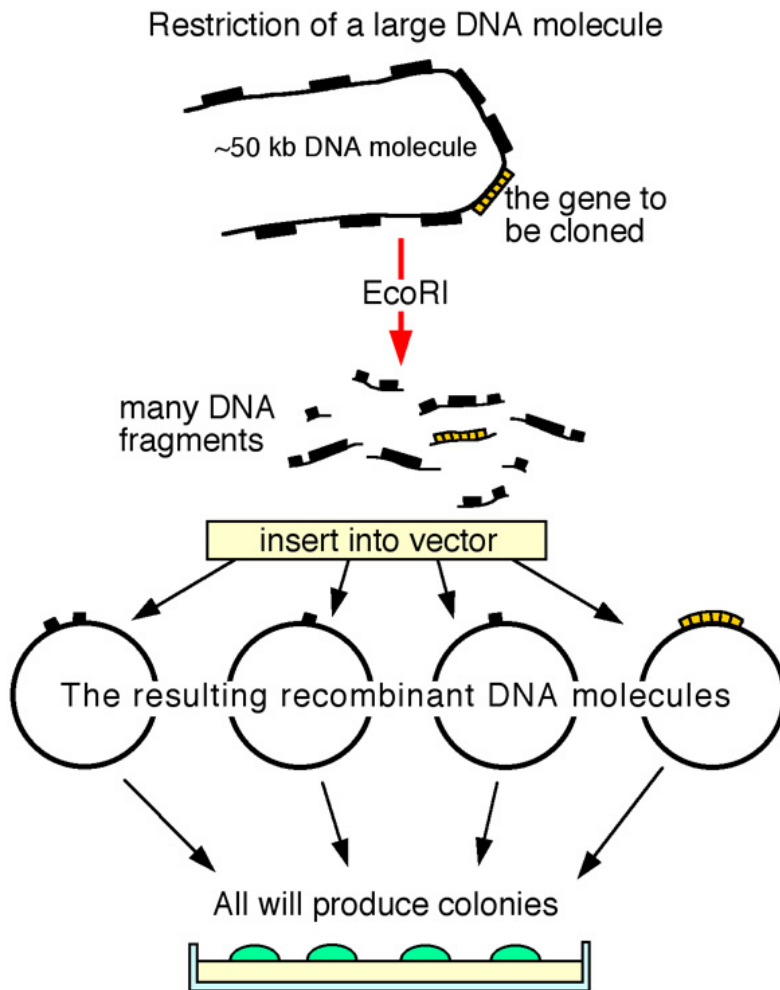


Antibiyotik Direnci

- Bu petrideki besiyeri kanamisin içermektedir
- Sağdaki bakteriler Kan^r, plasmidi taşıyıp, Kanamycin'e karşı dirençli iken, solda direnç söz konusu değildir
- Üreme farklılığına dikkat ediniz



DNA Klonlanması V

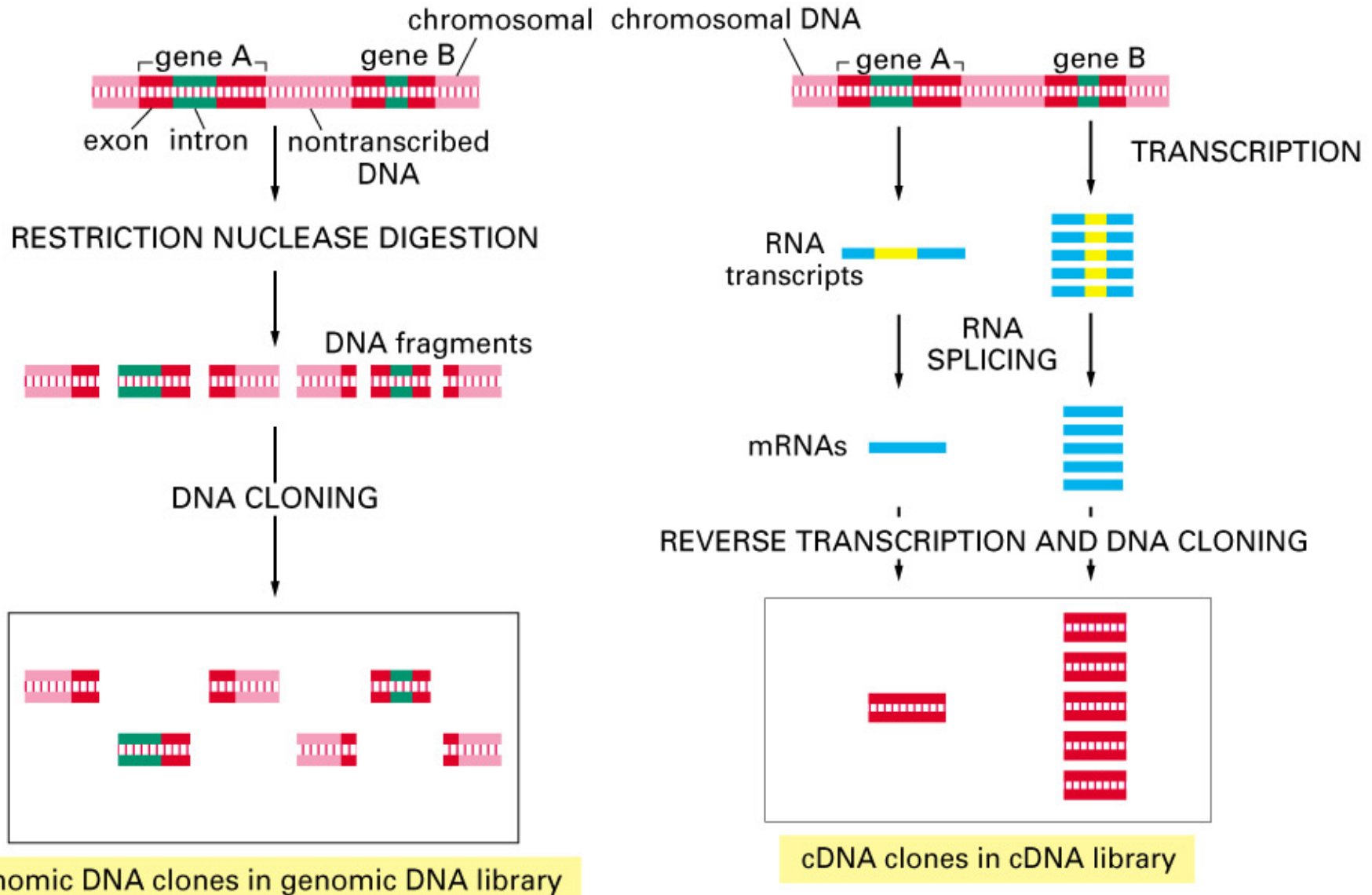


- Transforme edilen bakteri hücreleri besiyeri üzerinde koloniler oluşturur
- Bir koloni içerisindeki her bir hücre aynı plasmide sahiptir (ve aynı DNA'ya)
- Farklı kolonilerdeki hücreler farklı plasmidler (yani farklı DNA parçaları) içerirler.

DNA Kütüphaneleri

- DNA Kütüphanesi: Moleküler Biyolojide, moleküler klonlama işlemi boyunca **mikroorganizma populasyonlarında saklanan ve üretilen DNA fragmentlerinin oluşturduğu koleksiyona** verilen isimdir.
- Bir gen kütüphanesi ilgili gen kaynağı olan organizmadan izole edilen farklı DNA parçaları ile transforme edilmiş canlı bakteriyel kolonilerden oluşan bir koleksiyondur
- Bu gen kütüphanesi görüntülenerek araştırmacıların ilgilendiği geni taşıyan koloniler belirlenmelidir
- Farklı DNA kütüphaneleri (reverz-transkripte edilmiş RNA'dan oluşturulan **cDNA kütüphaneleri** ve genomik DNA'dan oluşturulan **gen kütüphaneleri**) bulunmaktadır.
- Her bir DNA fragmenti bir klonlama vektörüne (çoğunlukla plasmid) inserte edilir ve sonra bunlar bir bakteri populasyonuna transfer edilir. Her bir mikroorganizma bir yapı (**vektör+insert**) içerir. Bakteri populasyonu kültürde üredikçe içerdikleri DNA molekülleri de kopyalanır ve çoğaltılır (KLONLANIR!!!)

Klon Kütüphaneleri



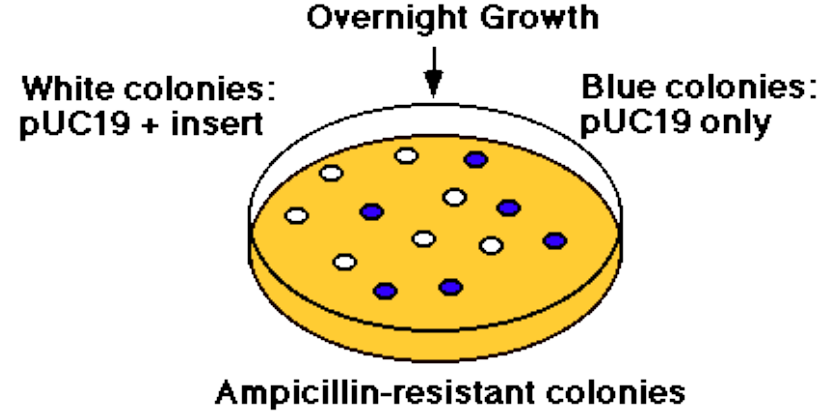
cDNA ve Gen Kütüphanesi Uygulamaları

- Yeni genlerin keşfedilmesi
- Gen fonksiyonlarının *in vitro* araştırılmasına yönelik çalışmalarda kullanılmak üzere cDNA moleküllerinin klonlanması
- Farklı hücre veya dokularda eksprese edilen mRNA koleksiyonlarının araştırılması
- Belirli bir organizmanın tüm genom dizisinin belirlenmesi Örn. (insan genom projesi ya da diğer türlerin genom projeleri)
- Transgenik hayvanların genetik mühendisliği yoluyla üretimleri için genomik dizi kaynaklarının oluşturulması
- Regulator dizi fonksiyonlarının *in vitro* olarak araştırılması
- Kansere dokularında genetik mutasyonların araştırılması

Görüntüleme I

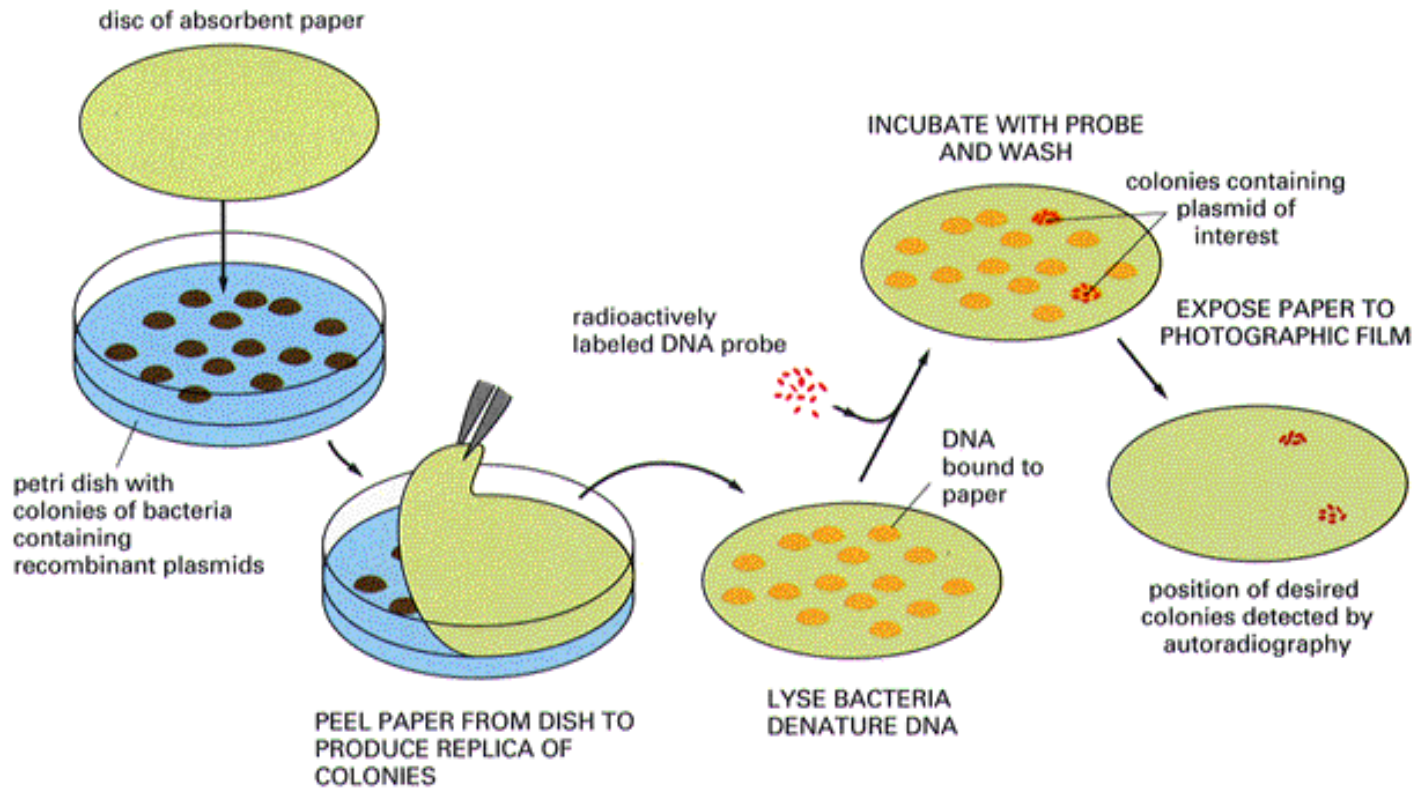
Görüntüleme:

1. Fenotipik görüntüleme-
Gen tarafından kodlanan protein koloninin renginin değişmesini sağlar
2. Belirli bir gen tarafından üretilen protein spesifik antikorlar yardımıyla saptanabilir



Görüntüleme II

3. Klonlanmış bir genin DNA sekansının bir prob yardımıyla saptanması (DNA hibridizasyonu)



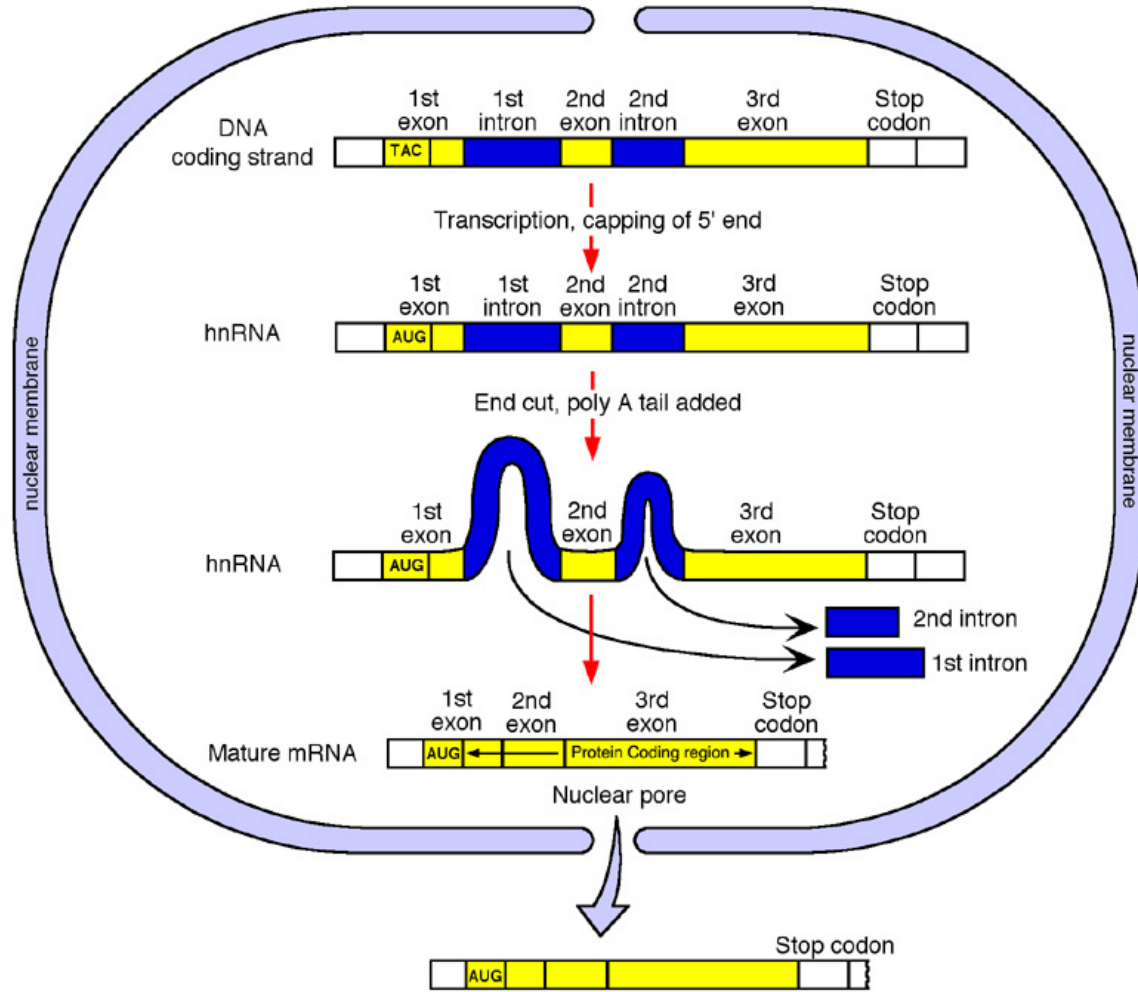
Görüntüleme III

- Koloniler bir kez belirlendikten sonra sıvı besiyerlerinde kültüre edilerek sayıları dolayısıyla da DNA miktarı artırılabilir
- Örnekler hazırlandıktan sonra -80°C 'de yıllarca saklanabilir.



cDNA I

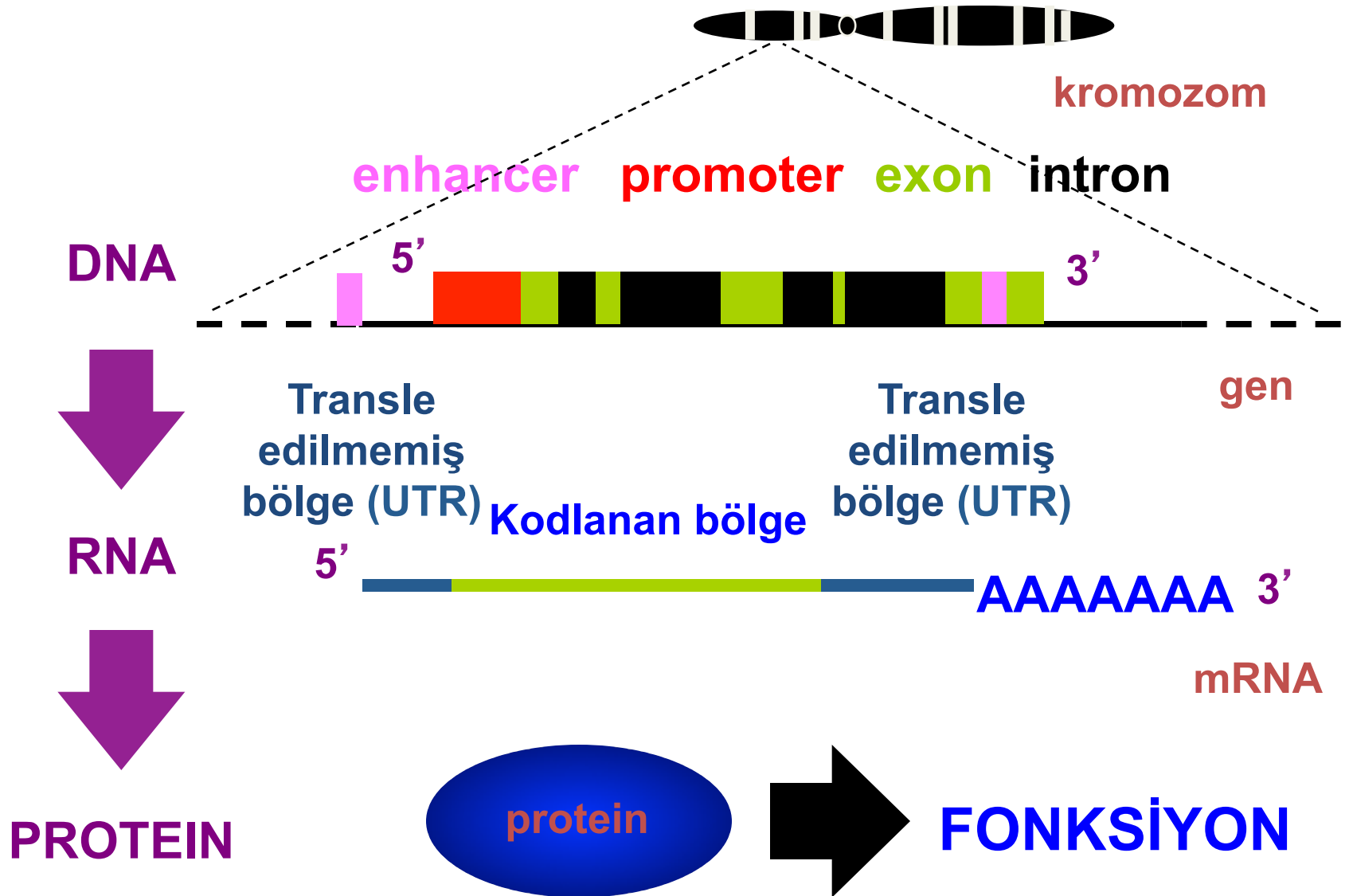
- Ökaryotik DNA bakteriyel (prokaryotik) DNA'dan **intron** (intervening sequences) ve **exon** (expressed or translated sequences) adı verilen sekanslara sahip olmasıyla ayrılır.
- Bir ökaryotik genin eksprese edilebilmesi için, transkripsiyonu takiben intronların mRNA'dan çıkartılması gerekmektedir.



Ökaryotlarda transkripsiyonu gösteren basit bir şema

hnRNA = 'heterojenöz nukleer' RNA kesilerek mRNA'ya dönüştürülmesi

CENTRAL DOGMA ve GEN KLONLAMA



cDNA II

- Bakteriler intronlarla uğraşamaz, bu nedenle, bir ürünün (örn. insulin) bakteriler tarafından ekspresyonu söz konusu olduğunda tam bir (bölünmemiş) kodlayıcı sekansa ihtiyaç bulunmaktadır.
- Bunun yanında, intronlar bir ökaryotik genin yaklaşık %90'nını oluşturabildiğinden uzun fragmentlerin klonlanması güç olmakta ve bazı zamanlar sadece kodlanabilen (eksprese edilebilir) sekanslarla (ekzonlar) çalışmak tercih edilmektedir

cDNA III

- Bunu gerçekleştirmek için, *mRNA* şablon olarak kullanılarak özel DNA sentezi gerçekleştirilir. Bu işlem aynı zamanda bir primer ve de **reverz transkriptaz** (*mRNA*'dan bir DNA iplikçığı sentezleyen bir DNA polimeraz enzimi) olarak adlandırılan bir enzim gerektirmektedir.
- İşte bu komplementer DNA **cDNA** olarak adlandırılır.
- **cDNA** plazmid gibi bir vektöre aktarılarak bakteri hücrelerine sokulabilir.

Dikkat Edilmesi Gerekenler

- Gen klonlamasında kullanılan plazmidler belirli antibiyotiklere karşı direnç geni taşımaktadır - Örn. *Ampisilin* veya *Tetrasiklin*. İşte bu genler transjenik bir organizmanın oluşturulmasında kullanıldığında *direnç genleri* aktarılabilir. İşte bu direncin diğer organizmalar tarafından alınabileceği dolayısıyla antibiyotik direncine ilişkin sorunların ortaya çıkmasına yönelik kaygılar bulunmaktadır.

Endişeler!!!

- Bazı kültür ve bireylerde transgenezis yani klonlama ya da genetik değişim konseptinin kabulüne karşı duyarlılık ve tartışma söz konusudur
- Bazı klonlanmış genler *genetiği değiştirilmiş* gıda maddelerinin mühendisliğinde kullanılmakta bu da kamuoyunu gıda güvenliği konusunda endişelendirebilmektedir
- İlgili duyulan genlere yönelik patent alımı söz konusu olmakta, bu da, araştırma ve teşhis çalışmalarının maliyetini artırabilmektedir