

GATEWAY KLONLAMA TEKNOLOJİSİNE GENEL BAKIŞ: DAHA HIZLI, DAHA KOLAY, DAHA ETKİN BİR KLONLAMA YÖNTEMİ

General View on Gateway Cloning Technology: Faster, Easier, More Accurate Cloning Method

Meryem JEFFERIES¹, Mustafa HACİÖMEROĞLU¹

¹Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
Aşı Serum Üretim ve Araştırma
Müdürlüğü, ANKARA

Geliş Tarihi: 21.10.2009
Kabul Tarihi: 12.05.2010

İletişim:
Meryem JEFFERIES
Refik Saydam Hıfzıssıhha
Merkezi Başkanlığı,
Aşı Serum Üretim ve Araştırma
Müdürlüğü, ANKARA
Tel : +90 312 458 20 43
E-posta : meryemjefferies@gmail.com

ÖZET

Gateway Klonlama Teknolojisi (GKT), James Hartley, Dominic Esposito ve Mike Brasch adlı araştırmacılar tarafından geliştirilmiştir. Bu teknoloji temel olarak, bakteriyofaj lambdanın spesifik rekombinasyon özelliklerine göre ayarlanabilen, evrensel bir klonlama yöntemidir. Gateway Klonlama iki aşamada gerçekleştirilmektedir. Amplifiye edilen ve attB içeren PCR ürününün, attP içeren uygun bir donör vektörle BP klonaz enzimi yardımıyla birleşerek attL içeren bir giriş klonu meydana getirdikleri aşama BP olarak adlandırılan birinci aşamadır. İkinci aşama ise LR aşaması olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada, BP aşaması ile elde edilen giriş klonu, attR içeren hedef vektöre LR klonaz enzimi yardımıyla transfer edilerek, attB içeren hedeflenen klon elde edilmektedir. GKT'nin birçok avantajı bulunmaktadır. Bu ileri klonlama teknolojisi, hızlı ve etkili bir şekilde DNA zincirinin çoklu vektör sistemine uygulanarak istenen proteinin elde edilmesini ve fonksiyonel analizinin yapılmasını olanaklı kılmaktadır. Ayrıca çok sayıda genetik DNA zincirinin çoklu sayıda hedeflenen vektörlere transferini sağlamaktadır. Çok sayıda örneklerin uygulanmasına uygun formatta adapte edilebilmektedir. İstenen vektör, hedeflenen gateway vektörüne kolaylıkla transfer edilebilmektedir. Sonuç olarak GKT'nin başarılı sonuçları ve avantajları nedeniyle; özellikle aşı ve ilaç geliştirme çalışmalarında ülkemiz bilim insanlarınınca da tercih edilmesi önerilir.

Anahtar Sözcükler: Gateway klonlama teknolojisi

ABSTRACT

Gateway Cloning Technology (GCT) is developed by the scientists James Hartley, Dominic Esposito and Mike Brasch. This technology is an universal cloning method based on the site-specific recombination properties of bacteriophage lambda. The Gateway Cloning is performed in two steps. The first step, called BP recombination, the reaction between an attB-flanked DNA fragment and an attP-containing donor vector to generate an entry clone by BP clonase. The second step is called as LR Reaction. In this stage, attL-containing entry clone

is transferred to attR-containing destination vector via LR clonase to generate an attB-expression clone. GCT have lots of advantages. Advanced cloning technology, provides a rapid and highly efficient way to move DNA sequences into multiple vector systems for functional analysis and protein expression. GCT easily accommodates the transfer of a large number of DNA sequences into multiple destination vectors and suitable for adaptation to high-throughput formats. GCT allows easy conversion of your favorite vector into a Gateway destination vector. It is a usefull system to be used in vaccine and drug development researches. As result, it is recommended that this technic would be preferred by scientists particularly on drug and vaccine development.

Key Words: Gateway cloning technology

GİRİŞ

A. GATEWAY'DE KULLANILAN L's, R's ve de B's P's lerin TANIMLARI NELERDİR ?

L's, R's ve de B's P's terimleri, Gateway Klonlama Teknolojisi (GKT)'nde çok sıklıkla kullanılmaktadır. Bunlar enzimle kesilen ve "attX" (att: attachment :birleşme) olarak ifade edilen spesifik noktalar. attX tanımındaki X harfi, L, R, B ve P'nin yerlerine kullanılmıştır. Buna göre kullanım anlamları aşağıda tanımlanmıştır:

attL : (attachment Left), solda birleşen

attR : (attachment Right), sağda birleşen

attB : (attachment bacteria), bakteri ile birleşen

attP : (attachment phage), fajla birleşen

Bütün giriş klonları, ilgilendikleri genin her iki tarafında da attL'ye sahiptir. Bunlar Gateway sisteminde gereklidir. Çünkü L'ler Gateway rekombinasyon proteinlerle yapışkan uçları oluşturmak için kesilir. Bu yapışkan uçlar, yapışkan ucu olan ve attR'yi içeren hedef vektörle birleşmektedir. Bu reaksiyon LR aşamasında gerçekleşmekte olup, ekspresyon klonunun nasıl oluşturulduğunu göstermekte ve bu ekspresyon klonundan elde edilen proteinin analizi yapılabilmektedir.

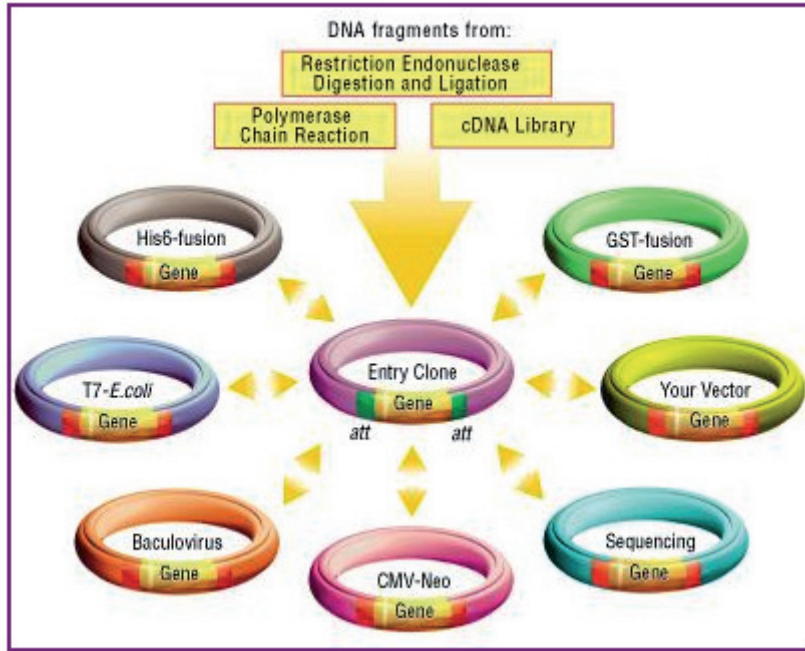
B. GATEWAY KLONLAMA TEKNOLOJİSİ NEDİR ?

Son yıllarda klonlama teknolojilerinin genetik ve moleküler biyolojideki önemi gittikçe artmaktadır. GKT de, diğer geleneksel klonlama yöntemlerinde olduğu gibi, genlerin fonksiyonel analizine, istenen proteinin elde edilmesine ve istenen DNA zincirlerinin klonlanmasına izin vermektedir (1-3). Ancak Gateway klonlama bütün bunları çok daha hızlı ve etkili bir şekilde başarmaktadır. Bu yeni klonlama sisteminde hedeflenen gen, ilk aşamada Gateway'e uygulanarak esas klonlama aşamasına hazır hale getirilmektedir. Gateway yönteminin klonlama aşaması, vektörde (att: attachment) rekombinasyon (birleşen kısım) ve de klonaz enzim karışımlarıyla başarılmaktadır (4-6).

Şekil 1'de görüldüğü gibi ilgililenilen gen giriş klonu oluşturularak gateway sistemine eklenmektedir. Giriş klonunu elde ettikten sonra istenilen gen uygun vektörle birleştirilerek elde edebilmektedir. Elde edilen genlerle tekrar bir giriş klonu oluşturulabilir. Bu da klonaz enzim karışımlarıyla, rekombinasyon att noktalarında birleşerek sağlanabilir.

GWT, iki aşamada gerçekleştirilmektedir (7).

Birinci Aşama: BP olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada, amplifiye edilen ve attB içeren PCR ürünü, attP içeren uygun bir donör vektörle BP klonaz



DNA fragment	: DNA parçası
Restriction Endonuclease	: Restriksiyon endonükleaz enzimi. Bu enzim nükleazlar arasındaki belirli kısımları keser.
Digestion and Ligation	: Parçalama ve bağlama işlemi.
cDNA Library	: Tamamlayıcı (complementary) DNA kütüphanesi
Entry Clone	: Giriş klonu.

Şekil 1. Gateway Klonlama Teknolojisi (10)

enzimi yardımıyla birleşerek attL içeren bir giriş klonu meydana getirir.

İkinci Aşama: LR aşaması olarak adlandırılmaktadır. Bu aşamada, BP aşaması ile elde edilen giriş klonu, attR içeren hedef vektöre LR klonaz enzimi yardımıyla transfer edilerek, attB içeren hedeflenen klon elde edilmektedir.

C. GATEWAY KLONLAMA NASIL KEŞFEDİLDİ ?

GKT, James Hartley, Dominic Esposito ve Mike Brasch adlı araştırmacılar tarafından keşfedilmiş ve geliştirilmiştir (7). James Hartley, 10kDa

büyükliğindeki bir proteini elde ederken zorluklar çektiği için ve Mike Brasch'la birlikte SSR (Site-Specific Recombination) özel rekombinasyon bölgesinin in vitro olarak kullanılabilirliğini ve bu şekilde elde edilen genin yeni bir vektöre uygulanabileceğini öne sürmüşlerdir. Önceleri sadece bir düşünce olan bu tezlerini çalışıp denemiş ve hedefe ulaşmışlardır. Genin yeni bir vektöre verilmesi Gateway'in öncelikli bir avantajı olmuş, daha sonraki çalışmalarda güvenli ve etkili bir klonlama tekniği ortaya çıkmıştır. Bu klonlama ile elde edilen PCR ürünü, BP reaksiyonunda %99 oranında başarılı olmuştur. Bu aşamada kullanılan PDONR vektör, yüksek kopya özelliğine sahip, saflaştırılmış bir DNA zinciridir (7).

D. NEDEN GATEWAY KLONLAMA TEKNOLOJİSİ DAHA AVANTAJLIDIR ?

GKT, spesifik rekombinasyon özelliklerine göre uygulanan evrensel bir klonlama yöntemi olması, protein ekspresyonu ve fonksiyonel analizi için hızlı ve etkili bir şekilde istenen DNA'yı çoklu vektör sistemine transfer edilmesini sağlaması yönünden önemli avantajlara sahiptir (8).

1. Yöntemin birinci avantajı, hızlı ve etkili bir şekilde, DNA zincirinin çoklu vektör sistemine transfer edilerek hedeflenen proteinin ekspresyonu ve fonksiyonel analizini sağlamasıdır. Yöntem çok etkilidir ve %90 başarılıdır. Bu etkinlik, besiyerinde kullanılan antibiyotik ve de ccdB geninin (öldürücü gen) faj üremesini önlemesinden dolayıdır.

2. İkinci avantajı ise, farklı DNA zincirlerinin kullanımına ve ekspresyonuna izin vermesidir. Bu şekilde bütün DNA fragmentleri, PCR fragmentleri, cDNA ve genomik DNA'lar klonlanabilir. Ayrıca Gateway, memelilerde, insektlerde ve Echerichia coli gibi pek çok organizmada kullanılabilir.

3. Diğer bir avantajı, birden fazla giriş klonu oluşturarak, bu klonları aynı anda hedef vektöre bağlayabilmesidir. Özellikle yeni geliştirilmekte olan lipoprotein yapıdaki aşı dizaynı kullanımına çok uygun bir tekniktir.

4. Çok fazla sayıda çalışma tasarlanmasına izin vermesi de diğer bir avantajıdır.

attL ve attR kesim noktalarını içeren yeni bir ekspresyon klon elde edilirken, spesifik rekombinasyon noktaları da oluşturulmaktadır. Bunlar; ekspresyon klonundaki B noktası ve üründeki P noktaları olup, gateway sisteminin tamamen geri dönüşümlü olması nedeniyle çok önemlidir. BP reaksiyonu ile ekspresyon klonunda daha fazla giriş vektörü elde edilebilmektedir (8). LR reaksiyonu, bir giriş klonu, bir hedef vektör ve LR klonaz enzimini gerektirmektedir. BP reaksiyonunda da benzer şekilde farklı vektör ve farklı enzimler lazımdır.

E. GATEWAY KLONLAMANIN ÇALIŞMA MEKANİZMASI NASILDIR ?

İlk aşamada ilgilenilen gen, Gateway sistemine transfer edilmektedir. Bu şekilde verilen gen, giriş klonu ile birleşmektedir.

Giriş klonunun elde edilmesi: Giriş klonu, hedeflenen geni içeren saflaştırılmış bir DNA zinciri ile birleşmiştir. Bu klonu elde etmenin dört aşaması vardır (9).

1. **Aşama:** Bu aşamada amaç içinde attB birleşme noktası bulunan PCR ürünü yaratmaktır ki bu da 25 baz çifti attB içeren primerin kullanılmasıyla başarılmaktadır.

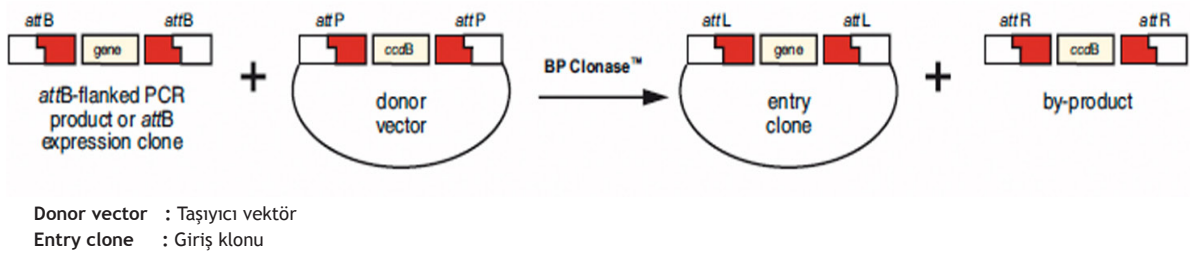
2. **Aşama:** PCR ürünü, BP reaksiyonuyla uygun donör vektöre transfer edilerek, giriş klonu elde edilmesini sağlamaktadır.

3. **Aşama:** Elde edilen giriş klonu LR reaksiyonla hedef vektöre transfer edilerek hedef klonun elde edilmesi başarılmaktadır.

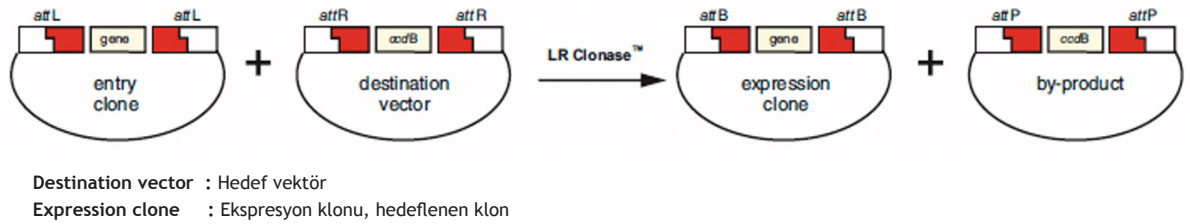
4. **Aşama:** Elde edilen hedef klonun uygun hücreye transfer edilerek üretilmesi, ekspresyon edilmesi, pürifikasyonu ve fonksiyonel analizidir. Burada elde edilen giriş klonu her şeyi kolaylaştırmaktadır. Çünkü bu lambda fajla DNA LR reaksiyonuyla klonlanabilir veya önceki klonlanan vektörden BP reaksiyonu ile yeni bir giriş klonu elde edilebilir.

BP Reaksiyonu: attB bir substrattır. attB içeren PCR ürünü, attB içeren ekspresyon edilmiş klon ile attP içeren donör vektörle birleşerek attL içeren bir giriş klonunu oluşturmaktadır. Bu reaksiyonu BP klonaz enzimi katalize etmektedir (10,11-14). Şekil 2'de BP reaksiyonunda görüldüğü gibi attB içeren PCR ürünü, attP içeren donör vektörle BP klonaz enzimi yardımıyla attL içeren bir giriş klonu oluşturmaktadır.

LR Reaksiyonu: attL içeren giriş klonu ile hedef vektör birleşerek attB içeren istenen klonu oluşturmaktadır. Bu reaksiyon LR klonaz enzimi tarafından katalize edilmektedir. Şekil 3'deki LR



Şekil 2. Gateway klonlamada BP reaksiyonu (7)



Şekil 3. Gateway klonlamada LR reaksiyonu (7)

reaksiyonunda görüldüğü gibi, attL içeren giriş klonu, LR klonaz enzimi yardımıyla attR içeren hedef vektöre transfer edilerek, hedef klonun elde edilmesini sağlamaktadır.

F. GATEWAY KLONLAMA TEKNOLOJİSİNİ NERELERDE KULLANABİLİRİZ ?

GKT, hem küçük baz çiftli DNA klonlama projelerinde hem de çok fazla sayıda genomik klonlamayı içeren projelerde başarılı bir şekilde kullanılabilir. Diğer rekombinant klonlama tekniklerine göre avantajları olduğu için daha çok tercih edilmektedir. Reaksiyonlarda etkinliği yanı sıra hedef vektörlerin belirlenmesinde de seçenekler sağlamaktadır. Geleneksel yöntemlerde özellikle birden fazla genle çalışıldığı zaman işlem çok uzun sürmekte ve her zaman da başarılı sonuç alınamamaktadır. Çok amaçlı olarak kullanılabilir

vektörlerde klonlanmış ORF (Open Reading Frame)'yi oluşturan gen kütüphaneleri, çalışılacak genom hakkında bilgiler sağlanması açısından önemlidir. Klonlama ve ekspresyonda yeni teknolojiyi kullanarak ORF'nin elde edilmesi, Gateway teknolojisi ile mümkündür (13-16).

Esposito'ya (2009) göre, gen veya genlerin klonlanmasının çeşitli amaçları vardır ve bu yöntemler yapısal araştırmalar, antikor belirlenmesi ve bunların ayrıştırılması, in vivo çalışmalar ve biyokimyasal araştırmalarda başarı ile kullanılmaktadır (17). Bu araştırmaların her birisinde proteinlerin eksprese edilmesi ve klonlanmasında farklı stratejiler gerekmektedir. Örneğin bir araştırmacının GST (Glutathione S- transferase)'ye ihtiyacı varsa bu kişi önce proteini pürifiye etmek isteyecek, affinitesini belirleyecek her olasılığa karşı başarılı olmak için birden fazla vektör deneyecektir. Geleneksel yöntemde olduğu gibi çok sayıda klonlama yaparak

uzun aşamalar kullanmak yerine, gateway yöntemi ile dikkatli bir şekilde 5-10 vektör belirlenir ve hedef klon oluşturulur. Bu şekilde hem zaman hem de maliyetten kazanım sağlanmaktadır. Ayrıca *E.coli*'de çözümlü proteinin ekspresyonu artırılabilir. Bu proteinde hangi Taq polimeraz enziminin önemli olduğunu belirten bir yol mevcut değildir. GKT'yle istenen klonun, farklı Taq kombinasyonlarıyla eksprese edilebilme imkanı vardır. Taq'ın çözümlü olmasını, DNA sekans analizi yapmadan öğrenmek mümkündür (17).

Multisite Gateway teknolojisi, hedef vektörlerden başarılı olanların merkezi bir yerde toplanması ve kullanılması, ORF kütüphanelerinin geliştirilmesi, protein ekspresyon bölgesinde klonlanan proteinin

rekombinasyon noktasının bilinmesi gibi çok önemli avantajlar sağlamaktadır. Klonlamanın önceden standardize edilmesi, protein ekspresyon çalışmasında da yol gösterici olacaktır (8, 9, 17).

Çok sayıda DNA klonlama teknolojisi, reverse aşı biliminde (Genomik yaklaşımla aşı geliştirme) yeni aşı hedefleri için önemli ve kritik bir dönüm noktasıdır. Hedef genom bölgesinin elde edilmesi, beraberinde yeni yöntemleri, bilinmeyen bileşikler ve yeni hedef bölgelerini ortaya çıkarmıştır. Çalışılan bakterilerde üretilen rekombinant proteinler ve bunlara karşı geliştirilen antikolar yeni aşı adaylarını da ortaya çıkarmaktadır. Gateway sistemi, aşı-ilaç geliştirme araştırmalarının geleceğini yönlendirecek yeni ve etkili bir klonlama tekniğidir.

KAYNAKLAR

1. Watt P. Screening for peptide drugs from the natural repertoire of biodiverse protein folds. *Nat Biotechnol*, 2006; 24 (2): 177-83.
2. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA Cloning Using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 2000; 10: 1788-95.
3. Landy A. Dynamic, Structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Ann Rev Biochem*, 1989; 89: 913-49.
4. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience 1994.
5. Bernard P, Couturier M. Cell Killing by the F Plasmid CcdB Protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *J Mol Biol*, 1992: 226; 735-45.
6. Bernard P, Kezdy KE, Melderen LV, Steyaert J, Wyns L, Pato ML, Higgins PN, Couturier M. The F plasmid CcdB protein induces efficient ATP-dependent DNA cleavage by gyrase. *J Mol Biol*, 1993; 234: 534-41.
7. Kozak M, Landy A Gateway Technology A universal technology to clone DNA sequences for functional analysis and expression in multiple systems. *Catalog nos.* 12535-019. Version E. 22. 2003.
8. Calmels T, Parriche M, Burand H, Tiraby G. High efficiency transformation of *Tolypocladium geodes* conidiospores to phleomycin resistance. *Curr Genet*, 1991; 20: 309-14.
9. Drocourt D, Calmels TPG, Reynes JP, Baron M, Tiraby G. Cassettes of the *Streptoalloteichus hindustanus* ble Gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res*, 1990; 20: 40-49.
10. Aaron J, Patton Gateway Cloning Technology Overview. <http://www.lifetech.com/gateway> Interview. Life Technologies 2009.
11. Gatignol A, Baron M, Tiraby G. Phleomycin Resistance Encoded by the ble Gene from Transposon Tn5 as a Dominant Selectable Marker in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 1987; 2007: 342-8.
12. Kertbundit S, Greve H, Deboeck F, Montagu MV, Hernalsteens JP. In vivo Random-glycuronidase Gene Fusions in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 5212-6.
13. Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res*, 1987; 15: 8125-48.

14. Mulsant P, Tiraby G, Kallerhoff J, Perret J. Phleomycin resistance as a dominant selectable marker in CHO Cells. *Somat Cell Mol Genet*, 1988; 14: 243-52.
15. Bushman W, Thompson JF, Vargas L, Landy A. Control of directionality in lambda site specific recombination. *Science*, 1985; 230: 906-11.
16. Hartley J, Esposito D. Gateway recombination cloning comes of age quest magazine presents. Davidson's Molecular Biology Homepage 2009.
17. Bernard P, Bushman W, sasaki Y. Gateway Technology Manual, A Universal technology to Clone DNA sequences for Functional analysis and expression in multiple systems. Invitrogen 2007.