

Keyifli Okumalar Dileriz

Binlerce kategoride milyonlarca PDF e-kitap, ders kitapları, dergiler ve romanlara platformumuz üzerinden ücretsiz ulaşabilirsiniz.

RESMİ WEB SİTEMİZ

<https://rantey.org>

Yedek ve Duyuru Kanallarımız

Sitemize erişim engeli gelmesi veya adres değişikliği durumunda aşağıdaki kanallardan güncel giriş adresine erişebilirsiniz:

- Telegram: <https://t.me/birkitapbir>
- WhatsApp Kanalımız : <https://whatsapp.com/channel/0029VbDHv8uE50Us4lvMoc0Y>

MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN TEMELLERİ



Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

**DORA
BURSA 2018**

MOLEKÜLER BİYOLOJİNİN TEMELLERİ

Prof. Dr. Elif DEMİRKAN

edemirkan@uludag.edu.tr

● DORA Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti. 2018

Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti

Tel : +90 (224) 221 38 39

+90 (224) 225 37 46

Fax : +90 (224) 220 36 73

Altıparmak Mah. Bozkurt Cad.

Avdan Apt. 10/1 Osmangazi / BURSA

dorayayinevi@gmail.com

info@dorayayincilik.com.tr

www.dorakitap.com

www.dorayayincilik.com.tr

Sayfa Tasarımı : Nurhan BULMUŞ

Kapak Tasarımı : Önder AYDOĞMUŞ

Basım ve Cilt : Ezgi Matbaacılık

Sertifika No : 12142

1. Baskı, 2018

ISBN: 978-975-2447-67-7

Her hakkı saklıdır. Bu kitabın tamamı veya bir kısmı 5846 sayılı yasanın hükümlerine göre **DORA Basım-Yayın Dağıtım Ltd. Şti.**'nin önceden iznini almaksızın elektronik, mekanik, fotokopi veya herhangi bir sistemle basılamaz, çoğaltılamaz ve bilgisayar ortamında tutulamaz.

ÖNSÖZ

Ders notları başta Biyoloji, Moleküler Biyoloji ve Genetik olmak üzere, Veteriner, Ziraat, Tıp, Eczacılık gibi alanlarda öğrencilere biyolojinin temelleri konusunda oldukça açıklayıcı bir alt yapı sunmak üzere hazırlanmıştır. Ders notlarının hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen sevgili asistanım Tuba Sevgi'ye, Yüksek Lisans öğrencilerim Baran Enes Güler ve Büşra Özalpar'a içtenlikle teşekkür ediyorum.

Prof.Dr. Elif DEMİRKAN

Uludağ Üniversitesi,
Fen-Edebiyat Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Bursa

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ İÇİNDEKİLER

KISIM 1

MOLEKÜLER HÜCRE BİYOLOJİSİNİN TARİHİ, ATOMLAR, KİMYASAL BAĞLAR, MAKROMOLEKÜLLER ve HÜCRE.....	1
Kimyasal Bağlar.....	2
İyonik Bağ	2
Kovalent Bağ	3
Hidrojen Bağı	3
Van der Waals Bağları	4
Organik Moleküller (Biyomoleküller, Makromoleküller)	5
HÜCRE	8
Prokaryot Hücre	10
Ökaryot hücre.....	11
Arkeal Hücre.....	12

KISIM 2

NÜKLEİK ASİTLERİN YAPI ve FONKSİYONLARI	15
Griffith'in Deneyi	17
Chargaff Kuralı	20
NÜKLEİK ASİTLERİN YAPISAL ÜNİTELERİ	21
Şekerler.....	21
Bazlar	22
Nükleozitler	23
Polinükleotitler	27
DNA (Deoksiribonükleik Asit)'nin YAPISI (WATSON-CRICK MODELİ)	29
DNA'nın FARKLI FORMLARI	32
DNA'nın GENEL ÖZELLİKLERİ	35
DNA'nın YAPISAL FORMLARI	36
RNA (Ribonükleik asit)'nin YAPISI	37
MITOKONDRIAL DNA (mtDNA ya da mDNA)	38

KISIM 3

PROKARYOT ve ÖKARYOTLARDA DNA SENTEZİ (REPLİKASYON)41

DNA Sentezi Semikonservatiftir	42
DNA REPLİKASYON ORJİNLERİ.....	44
REPLİKASYONDA GÖREV ALAN ENZİMLER.....	46
Prokaryotik DNA polimerazlar.....	46
Ökaryotik DNA Polimerazlar.....	48
Prokaryotik Hücrelerde DNA Replikasyonu	49
DNA Sentezi İçin Gerekli Komplementler (Bileşenler)	49
DNA sentezinde görev alan önemli proteinler	50
Replikasyon Mekanizması.....	51
Ökaryotik Hücrelerde Replikasyon	55
Lineer (Düz) Dna'larda Replikasyon Uç Problemi.....	57
HİSTONLAR.....	58
VİRÜSLERDE NÜKLEİK ASİTLER	60

KISIM 4

PROKARYOT ve ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON

ÖKARYOTLARDA RNA İŞLENMESİ (RNA PROCESSING)63

PROKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON	65
RNA Polimeraz Enzimi (RNA pol)	65
ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON	72
ÖKARYOTLARDA RNA İŞLENMESİ (RNA Processing)	76
1. mRNA'ya başlık yapısının ilave edilmesi	76
2. Poliadenilasyon	77
3. RNA splicing (Kesip-çıkartma)	78
İntronların Uzaklaşma Mekanizmaları	79
RNA'nın DÜZENLENMESİ (RNA Editing)	81
ALTERNATİF (Seçenekli-Farklı) SPLAYSİNG.....	82

KISIM 5

PROKARYOTLARDA GENLERİN YAPI ve İŞLEYİŞİ

TRANSKRİPSİYONUN KONTROLÜ85

PROKARYOTİK HÜCRELERDE PROTEİN SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ.....	88
OPERON HİPOTEZİ.....	89
Gen Transkripsiyonunun Negatif Kontrolü	90
Gen Transkripsiyonunun Pozitif Kontrolü	92

Triptofan (Trp) Operonu	95
Zayıflatıcı (Attenuation) kontrol olarak Triptofan operon sistemi	97

KISIM 6

ÖKARYOTLARDA GENLERİN YAPI ve İŞLEYİŞİ

TRANSKRİPSİYONUNUN KONTROLÜ.....	101
ÖKARYOTİK REGÜLATÖR PROTEİNLER (Transkripsiyon Faktörleri)	103
ÖKARYOTLARDA TRANSLASYON AŞAMASINDAKİ DÜZENLENME	106
METİLYASYONU İLE DNA'NIN SESSİZLEŞTİRİLMESİ.....	106

KISIM 7

RİBOZOMAL PROTEİN SENTEZİ (TRANSLASYON).....	109
GENETİK KOD (GENETİK ŞİFRE)	110
Genetik kod Tablosu	111
PROTEİN SENTEZİ İÇİN GEREKLİ OLAN KOMPONENTLER.....	112
tRNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu	113
Ribozomların Yapısı ve Fonksiyonu.....	117
mRNA'nın Yapısı	121
PROTEİN SENTEZİNİN AŞAMALARI	121
PROTEİN YAPILARI.....	132
PROTEİN SENTEZİNİ İNHİBE EDEN ANTİBİYOTİKLER	134

KISIM 8

NON-RİBOZOMAL (RİBOZUM DIŞI) PEPTİD SENTEZİ	135
--	------------

KISIM 9

MUTASYONLAR ve DNA TAMİR MEKANİZMALARI	143
MUTAJENLER	143
MUTASYONLAR.....	145
TAMİR MEKANİZMALARI.....	149
Fotoreaktivasyon	149
Missmatch (Hatalı Eşleşme) Tamiri.....	150
Eksisyon (Kesip Çıkarma) Tamiri.....	151
SOS Tamiri.....	154

KISIM 10

HÜCRE SIKLUSU PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZİS) 157

HÜCRE SIKLUSU.....	157
Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları (Check Points)	161
HÜCRE ÖLÜMÜ.....	162
APOPTOZİS (KONTROLLÜ, PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ)	163
Apoptozis’de Kaspaz Enzimleri	163
Bcl-2 Ailesi	164
p53 geni.....	165
APOPTOSİZDE SİNYAL YOLAKLARI.....	166
APOPTOZUN AŞAMALARI	168
Apoptozdaki Morfolojik ve Biyokimyasal Olaylar	169
Apoptotik Cisimcikler ve Hücrelerin Fagositozu	169
Apoptozun Kontrol Noktaları.....	171
APOPTOZUN HESAPLANMASI	171

KISIM 11

REKOMBİNAT ONA TEKNOLOJİSİ (rDNA Teknolojisi) 173

rDNA TEKNOLOJİSİNDE KULLANILAN VEKTÖRLER	174
Plazmidler	174
Shuttle (mekik) plazmid vektörler	175
Bakteriyofajlar.....	176
Kozmid vektörler	176
Bakteri yapay kromozomları BAC (Bacterial artifical chromosomes) vektörleri	176
Maya yapay kromozomu, YAC (Yeast artifical chromosomes) vektörleri	176
Memeli yapay kromozomu (MAC) vektörleri	177
İnsan yapay kromozomu (HAC) vektörleri	177
Ekspresyon Vektörleri.....	177
rDNA TEKNOLOJİSİNDE MAKAS GÖREVİ YAPAN RESTRİKSİYON ENZİMİ...177	
GEN KLONLAMA BASAMAKLARI	181
REKOMBİNANT TEKNOLOJİSİNİN KULLANIM ALANLARI.....	184

KISIM 12

HÜCRESEL SİNYAL İLETİMİ 187

SİNYAL İLETİMİNDE cAMP'nin ROLÜ	189
---------------------------------------	-----

KISIM 13

KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ.....193

KANSER OLUŞUMUNDA ETKİLİ OLAN GENLER 194

Protoonkogenler ve Sellüler (hücrel) Onkogenler (c-onc) 194

Başlıca Onkogenler..... 196

Tümör oluşturan viruslar;..... 197

Tümör Supresör Genler (Antionkogenler, Onkosupresör Genler) 198

KAYNAKLAR201

KISIM 1

MOLEKÜLER HÜCRE BİYOLOJİSİNİN TARİHİ, ATOMLAR, KİMYASAL BAĞLAR, MAKROMOLEKÜLLER ve HÜCRE

Moleküler Biyoloji, hücrelerin fonksiyonları ve onarımı için gerekli biyolojik süreçleri yürüten nükleik asit ve proteinler gibi hücresel moleküllerin kompozisyonunu, yapısını ve etkileşimlerini inceleyen biyoloji alanıdır. Diğer bir deyişle, moleküler biyoloji, moleküler düzeyde biyolojik aktivitelerle ilgilenen bilim dalıdır.

Moleküler biyoloji alanı biyoloji, kimya ve özellikle genetik ve biyokimya alanlarıyla örtüşmektedir. Moleküler biyolojinin önemli bir alanı, çeşitli hücresel sistemlerin DNA, RNA ve protein sentezi işlevi bakımından nasıl etkileşimde bulunduğunu anlamakla ilgilidir.

Moleküler biyolojide kullanılan spesifik teknikler alana özgüdür, ancak genetik ve biyokimya ile ilgili yöntem ve kavramlarla da birleştirilebilir, bu nedenle bu disiplinler arasında büyük bir fark yoktur.

Moleküler biyoloji, replikasyon, transkripsiyon, translasyon ve hücre fonksiyonu gibi süreçlerin arkasındaki moleküler mekanizmaları inceler, moleküler biyolojinin temelini ifade etmenin bir yolu, genlerin RNA'ya nasıl transkribe edildiğini ve RNA'nın proteine nasıl dönüştürüldüğünü anlamaya yönelik olduğudur. Bununla birlikte, bu basitleştirilmiş betimleme halen RNA'nın rolleri ile ilgili yeni bulgular nedeniyle tekrar gözden geçirilmekte ve revize edilmektedir.

Kimyasal Bağlar

Birçok elementin atomları, diğer atomlara bağlanarak daha kompleks ve yeni moleküller meydana getirme özelliğine sahiptirler. Atomları bir arada tutan çekim kuvveti kimyasal bağdır.

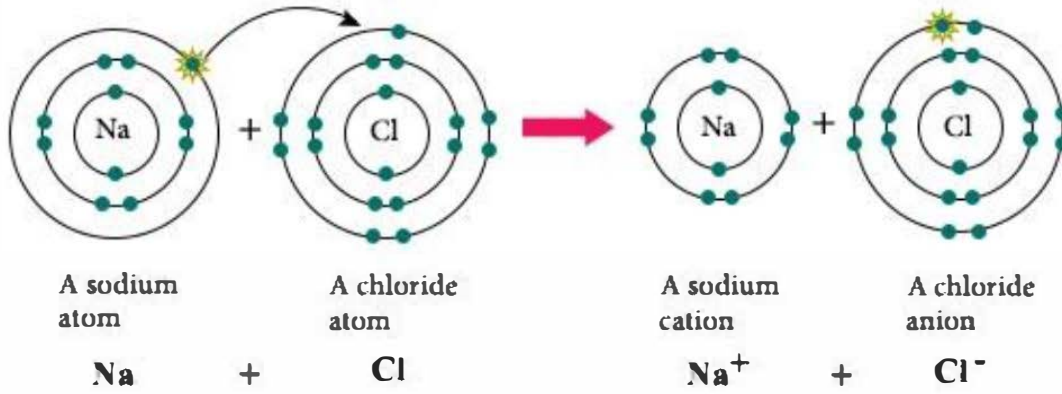


İyonik Bağ

Atomlar ancak dış e^- tabakasında bulunan elektronları tamamladığında kararlı olur. İyonik bağlar bir veya birkaç elektronun bir atom bünyesinden tamamen ayrılıp diğer bir atomun bünyesine geçmesi sonucu $(+)$ ve $(-)$ yüklü iyonlar arasında oluşur. Böyle $(+)$ ve $(-)$ yüklere **iyon** denir. İki iyon arasındaki bağ, **iyonik bağ**dır. Bu bağ güçlü bir bağdır.



Sodyum, atom numarası 11 olan bir atomdur. 11 elektronlu sodyum atomu 1 elektron vererek kararlı hale geçerken, atom numarası 17 olan Klor atomu (17 elektronlu) 1 elektron alarak kararlı yapıya geçer (Şekil 1).



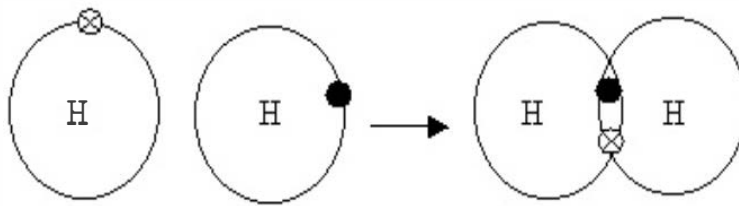
Şekil 1. İyonik Bağ Oluşumu

(<http://chemistry.tutorvista.com/inorganic-chemistry/ionic-and-covalent-bonds.html>, 2017)

Kovalent Bağ

İyonik bağlarda elektronun bir atomdan diğerine transferi söz konusudur. Fakat birçok durumda elektron bir atomdan diğerine geçmeyip ortaklaşa kullanılır. Oluşan bağ **kovalent bağ**dır. Kovalent bağlar kuvvetlidir. Kırılması için 50-110 kcal'lik enerji gerekir.

Örnek: H_2 , Burada H molekülündeki her atom elektronu ortaklaşa kullanır, sanki her H atomunun iki elektronu var gibidir (Şekil 2).



Şekil 2. Kovalent Bağ Oluşumu

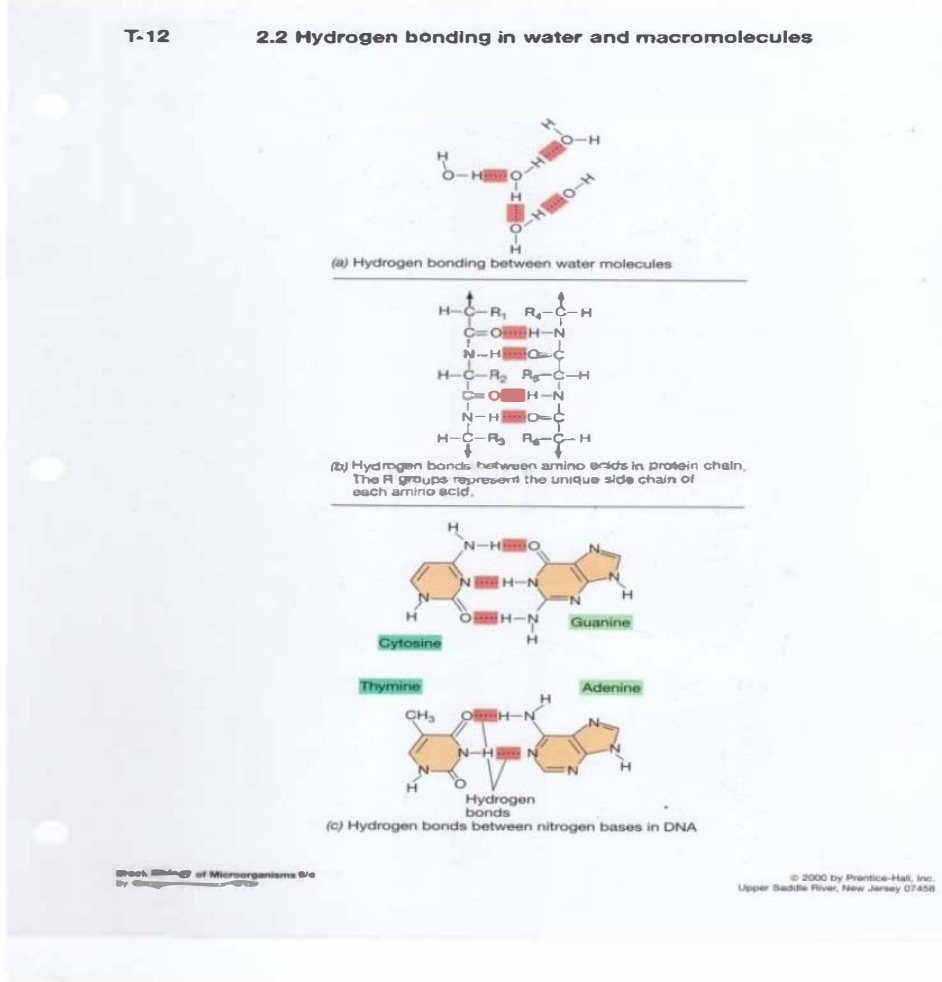
(<http://chemistry.tutorvista.com/organic-chemistry/chemical-bonds.html>, 2017)

Hidrojen Bağ

Eğer tek bir H atomu O veya N gibi iki elektronegatif atom arasında ortaklaşa kullanılırsa **hidrojen bağ**ı oluşur. Hidrojen bir oksijen

ve bir azota kovalent bağlanabilir. Kırılması için gerekli enerji 4-5 kcal'dir. Bu bağ zayıftır.

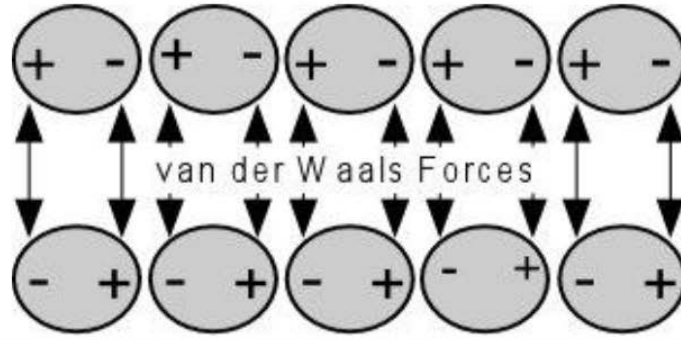
Örnek: H_2O (Su) molekülleri arasında (Şekil 3)



Şekil 3. Su ve Makromoleküllerde Hidrojen Bağ Oluşumu
(Madigan MT., Martinko JM., Parker J., 2000)

Van der Waals Bağları

Bir molekülün nonpolar grupları arasında oluşan hidrofobik bağlar veya van der waals bağları adı verilmektedir (Şekil 4). Zayıf bağlardır. Organizmada bulunan büyük moleküllerin şekillerini stabilize etmede önemli rol oynar. Bu bağların enerjileri yaklaşık 1-3 kcal/ mol arasındadır. Zayıf bağlardır.



Şekil 4. Van der Waals Bağ Oluşumu

(<http://www.unariunwisdom.com/paradigm-shift-scientists-demonstrate-the-wavelike-nature-of-van-der-waals-forces/>, 2016)

Organik Moleküller (Biyomoleküller, Makromoleküller)

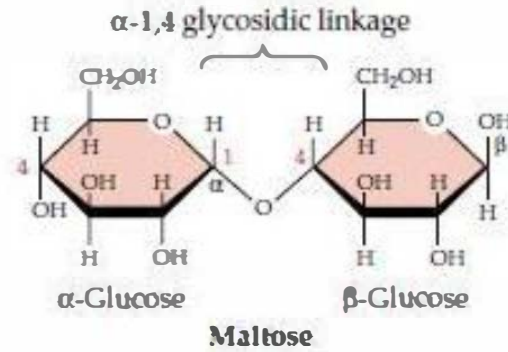
Kovalent bağlarla bağlanmış karbon (C) zinciri içeren moleküllere organik moleküller denilmektedir. Biyomoleküllerin birçoğu karbonun organik bileşikleridir. Karbon atomu oldukça önemlidir. Çünkü karbon atomu hidrojen, oksijen ve azot gibi kovalent bağ yapma kapasitesine sahiptir. Karbon oksijen ve azot ile de tek ve çift bağ yapma özelliğine sahiptir. Ayrıca karbon atomlarının elektronlarını kendi aralarında ortaklaşa kullanmaları ve oldukça dayanıklı olan C-C tek bağı da yapabilir. Bu sayede çok çeşitli yapıda biyolojik molekül elde edilmektedir. Karbon atomunun diğer atomlara çeşitli şekilde bağlanması sınırsız sayıda organik molekülün meydana gelmesine olanak sağlamıştır.

Biyomoleküller su molekülünün ayrılmasıyla birbirine bağlanır, bu olaya dehidrasyon reaksiyonu denir. Diğer taraftan su molekülünün ortama ilave edilmesiyle biyomoleküllerin birbirinden ayrılmasına hidroliz denir.

Karbohidratlar, Proteinler, Lipidler, Nükleik asitler en önemli organik moleküllerdir.

Karbohidratlar: Karbonhidratlar, canlılarda bulunan organik moleküllerin üçüncü büyük grubunu oluşturur. C, H ve O elementlerinin $C_n(H_2O)_n$ formülüne göre kurulmasıyla meydana gelir. Ancak bu genel formüle uyduğu halde karbonhidrat olmayan (Asetik asit ($C_2H_4O_2$), Lak-

tik asit ($C_3H_6O_3$) veya genel formüle uymadığı halde karbonhidrat olan (Deoksiriboz ($C_5H_{10}O_4$, Ramnoz ($C_6H_{12}O_5$) bileşikler de vardır. Azot ve kükürt ihtiva eden bazı karbonhidratlar da bu genel formüle uymazlar. Karbonhidratlar, polihidroksilik alkollerin aldehit veya keton türevleri (monosakkaritler), bunların polimerleri (oligo- ve polisakkaritler), oksidasyon ürünleri (şeker asitleri), redüksiyon ürünleri (şeker alkoller)'dir. Moleküldeki basit şeker ünitelerinin sayısına göre: Monosakkaritler, Disakkaritler, Oligosakkaritler ve Polisakkaritler; Reaktif gruplarına göre: Aldozlar Ketozlar; Karbon zincirinin uzunluğuna göre: Diozlar, Triozlar, Tetrozlar, Heptozlar, Pentozlar, Heksozlar olarak isimlendirilmektedir. Monosakkaritlerin birbirine kovalent olarak Glikozidik bağ ile bağlanması sonucu disakkaritler, oligosakkaritler ve polisakkaritler oluşur. Karbonhidratlar lipitlere bağlandığında glikolipit, proteinlere bağlandığında glikoprotein olarak isimlendirilirler.

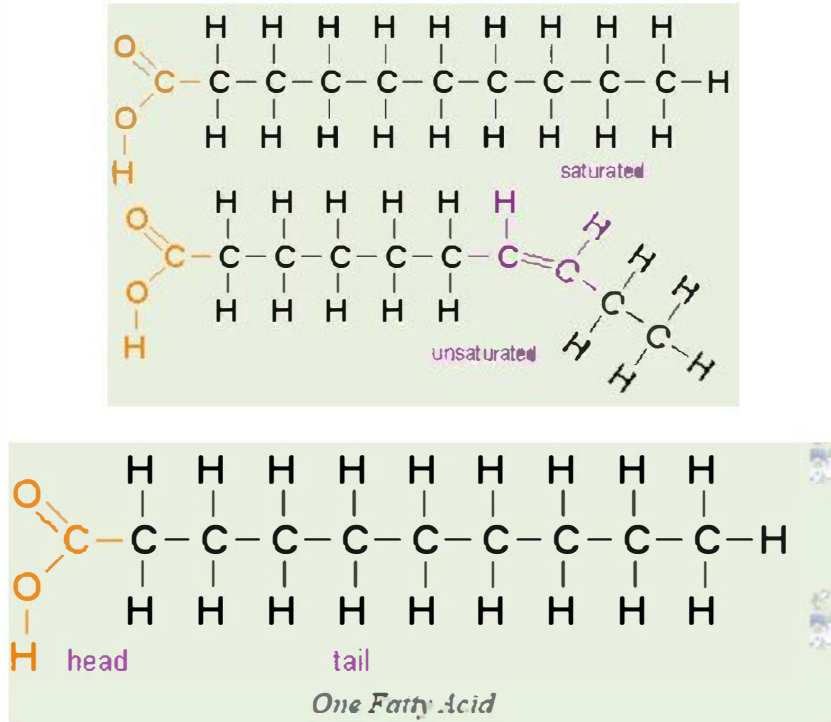


Şekil 5. Maltoz Şekerinde Glikozidik Bağ Oluşumu

(<https://socratic.org/questions/what-does-alpha-acetal-linkage-mean>, 2016)

Lipidler: Lipidler, biyolojik kaynaklı organik bileşiklerdir Lipidlerin yapılarında C, H, O bulunur; ayrıca N, P, S gibi elementler de bazı lipidlerin yapısına girerler Lipidlerin temel yapı taşları yağ asitleridir. Yağ asitleri, hidrokarbon zincirli monokarboksilik organik asitlerdir; yapılarında, 4-36 karbonlu hidrokarbon zincirinin ucunda karboksil grubu bulunur. Lipidler, suda çözünmeyen, apolar veya hidrofob bileşiklerdir. Lipidler, kloroform, eter, benzen, sıcak alkol, aseton gibi organik çözücülerde çözünebilirler. Yağ asitlerinin çeşitli alkollerle oluşturdukları esterler

basit lipidler olarak bilinirler. Yağ asitleri ve alkole ek olarak başka gruplar içeren lipidler bileşik lipidlerdir. Yağ asitlerinin sınıflandırılmaları: - doymuş yağ asitleri ve doymamış yağ asitleri olarak iki grupta incelenmektedir. Doymuş yağ asitleri, hidrokarbon zincirleri çift bağ içermeyen ve dallanmamış olan yağ asitleridirler. Hayvansal yağlarda en çok bulunan doymuş yağ asitleri, 16 karbonlu palmitik asit ile 18 karbonlu stearik asittir. Doymamış yağ asitleri, hidrokarbon zincirinde bir veya daha fazla çift bağ içeren yağ asitleridirler. Doymamış yağ asitleri oda sıcaklığında genellikle sıvıdırlar, suda çözünmezler, uçucu değildirler. Hayvansal yağlarda en çok bulunan doymamış yağ asitleri, palmitoleik asit, oleik asit, linoleik asit, araşidonik asittir.

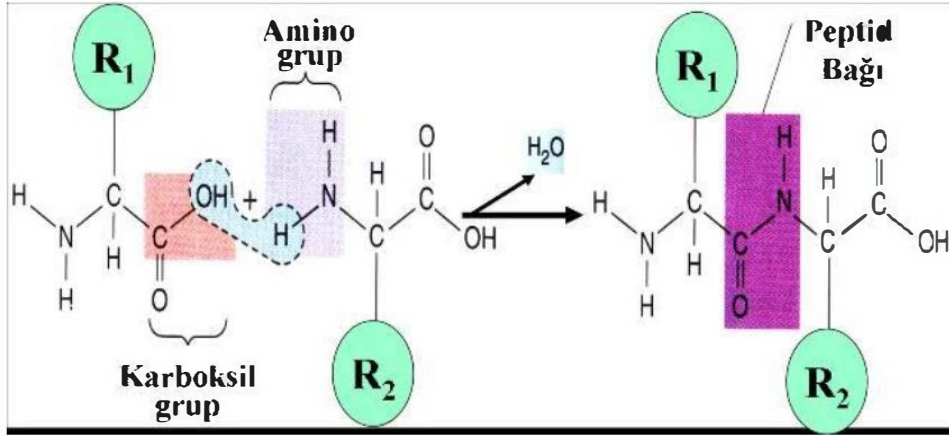


Şekil 6. Doymuş ve Doymamış Yağ Asit Zincirleri

(<http://biologyclermont.info/wwwroot/courses/lect1/lipids.htm>, 2017)

Proteinler: Yunanca 'proteios' kelimesinden türetilmiş ve 'en önemli' ya da 'en önde yer alırım' manasındadır. Proteinler bir veya birden çok polipeptid zincirden oluşmuş polimerlerdir. Aminoasitler proteinlerin temel yapısal üniteleridir. Proteinler, aminoasitlerin birbirlerine peptid bağları ile bağlanarak oluşan polimerlerdir. Aminoasitlerin poli-

peptid yapıya polimerizasyonu bir aminoasidin $-\text{COOH}$ (karboksil) grubu ile bir diğesinin $-\text{NH}_2$ (amino) grubu arasından su çıkışı ile olur. Bu reaksiyondan bir peptid bağı meydana gelir (Şekil 7). Birçok aminoasidin bu şekilde birbirine bağlanması ile polipeptid zinciri oluşur. 20 aminoasit farklı yapı ve boyutta yaklaşık 100.000 farklı protein oluştururlar.



Şekil 7. Aminoasitler Arasında Peptid Bağ Oluşumu

(http://80.251.40.59/veterinary.ankara.edu.tr/fidanci/Ders_Notlari/Ders_Notlari/Proteinler.html, 2017)

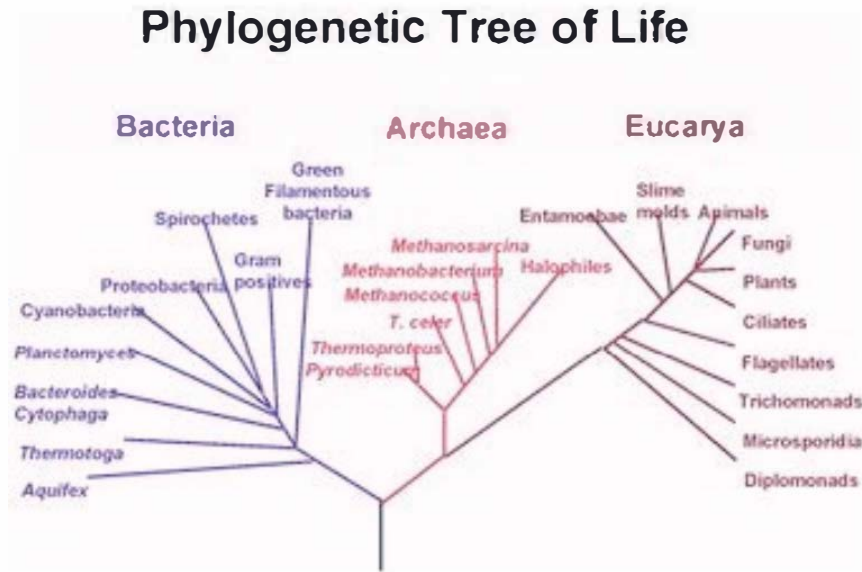
Nükleik Asitler: Genetik materyal olan nükleik asitler nükleotid birimlerinin polimerleşmesi ile meydana gelmişlerdir. Bir nükleotid bir baz, bir şeker ve bir fosfat molekülünden oluşur. Bazlar pirimidinler ve pürinler olmak üzere iki grubu ayrılırlar. İki tip nükleik asit vardır Bunlardan ribonükleik asit (RNA)'ın şeker grubu bir ribozdur. Deoksiribonükleik asit (DNA) de ise ribozun 2' (iki üssü) karbondaki hidroksil ($-\text{OH}$) grubu, yerini bir hidrojene (H) bırakmıştır (deoksiriboz şeker). RNA'da yer alan bazlar adenin, urasil, guanin ve sitozindir. DNA da ise urasilin yerine timin bazı yer alır. Bu iki nükleik asitin baz dizilişleri hücrenin genetik bilgisini temsil eder.

HÜCRE

Organizmalar sistemlerden, sistemler organlardan, organlar dokulardan, dokular hücrelerden, hücreler ise organel, organik ve inorganik maddelerden oluşmaktadır. Tüm canlı organizmaların yapısal en küçük birimi hücredir. Hücrenin temel yapı taşları ve kimyasal bileşimini

incelediğinde bir hücre içindeki bileşiklerin % 99'undan fazlası başlıca altı elementten meydana gelmiştir. Bu elementler karbon (C), hidrojen (H), nitrojen (N), oksijen (O), fosfor (P) ve kükürt (S)'dür. Karbon ile diğer elementler arasında kurulan kovalent bağlar sonucunda çok sayıda bileşik meydana gelebilir. Karbonhidratlar, yağlar, aminoasitler (proteinler) ve nükleotid olan bu dört grup organik bileşiğe hücre ağırlığının % 70-80 kadarını kapsayan su ve dış ortamdan alınan elektrolitler de eklenince hücrenin kimyasal yapısı ortaya çıkar.

İki yaygın hücre grubu vardır. Bunlar: Prokaryotlar (bakteriler, arkeler) ve Ökaryotlar (bitki ve hayvan hücresi). Karyot=nükleus, çekirdek; Pro=ilkel, önce; Eu (Ö)=gerçek anlamına gelmektedir. Prokaryotlarla ökaryotlar arasındaki en temel farklar prokaryotların gerçek bir nükleusa (çekirdek) ve zar içeren organellerinin olmamasıdır. Her ikisinin de ortak özelliği DNA'sı, hücre zarı ve zar içermeyen tek organel olan ribozomlarının olmasıdır. Günümüzdeki modern sınıflandırma sisteminde ise artık organizmalar 3 temel sınıf içinde incelenmektedir: Bakteriler, Arkeler ve Ökaryotlar (Ökarya). Bakteriler ve arkeler, temel olarak pek çok açıdan benzerdirler, ancak ciddi farklılıkları da vardır. Arkeler metabolik süreçlerinde bakteriler'den çok ökaryotlar'a benzemektedir. Bu yüzden ayrı olarak sınıflandırılmaktadır (Şekil 8).



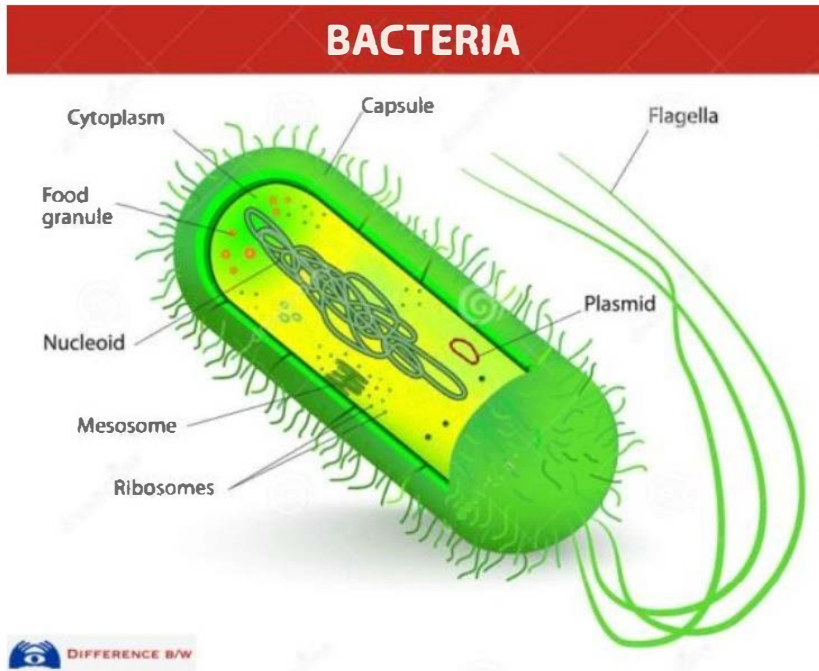
Şekil 8. Filogenetik Yaşam Ağacı

(<http://www.nabaser.com/articles/phylogenetic-tree/>, 2017)

Prokaryot Hücre

Temel özellikleri:

- Tüm ortamlarda bulunan tek hücreli organizmalar. Bunlara bakteriler ve arkeler dahildir;
- Çekirdeksiz; nükleer membran yok (sitoplazmada dağılmış genetik materyal)
- Zarla çevrili organeller yoktur;
- Hücre sitoplazmada bulunan sadece bir dairesel DNA molekülü içerir;
- DNA çıplaktır (histon yok);
- Basit iç yapı (Şekil 9);
- Basit ikiye bölünme ile hücre bölünmesi.



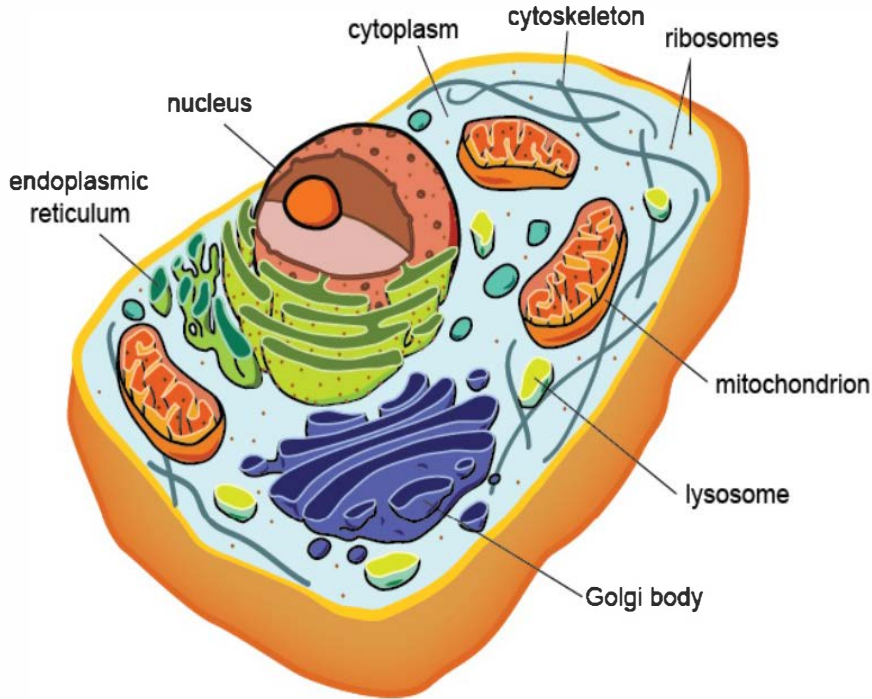
Şekil 9. Bakteri Hücre Yapısı

(<http://www.differencein.com/difference-between-archaea-bacteria/>, 2014)

Ökaryot hücre

Temel özellikleri:

- Ökaryotik hücreler hayvanlarda, bitkilerde, mantarlarda ve protist hücrelerde bulunur;
- Genetik materyalin bir zar ile çevrelendiği gerçek bir çekirdeği olan hücre;
- Ökaryotik genom prokaryotlardan daha karmaşıktır ve çoklu kromozomlar arasında dağılmaktadır;
- Ökaryot DNA düzdür;
- Ökaryotik DNA, histonlar adı verilen proteinlerle kompleksir;
- Zarla çevrili birçok organeli vardır;
- Kompleks iç yapı (Şekil 10);
- Mitoz ile hücre bölünmesi.

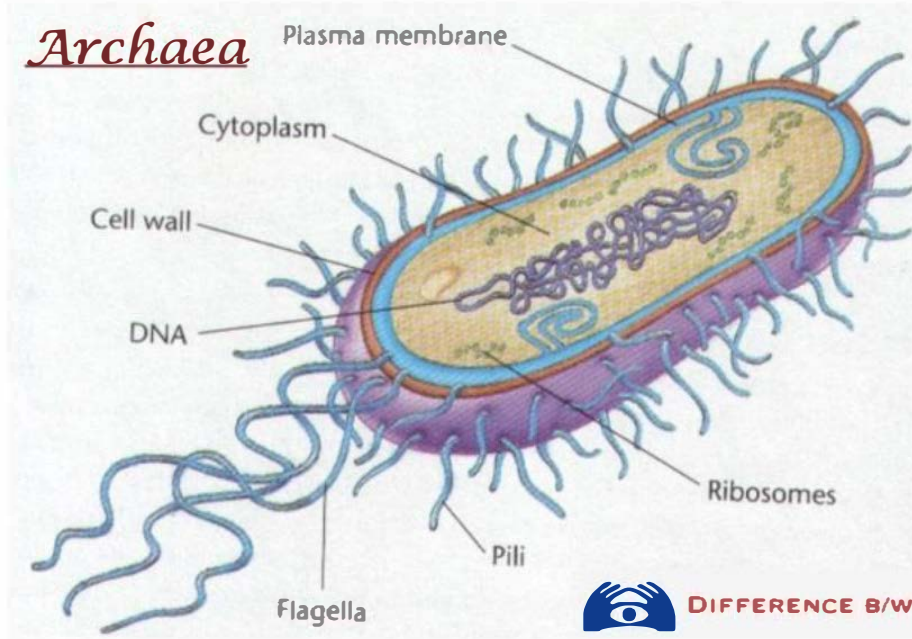


Şekil 10. Ökaryotik Hücre Yapısı

(<http://www.shmoop.com/biology-cells/all-eukaryotic-cells.html>, 2017)

Arkeal Hücre

Arkeler prokaryotlardır, çekirdeksiz organizmalar (Şekil 10), ancak arkelerin moleküler biyolojisi bazı yönleri ile ökaryotlarınkilere daha benzerdir.



Şekil 11. Arke Hücre Yapısı

(<http://www.differencein.com/difference-between-archaea-bacteria/>, 2014)

Tablo 1’de Bakteri, Arke ve Ökaryotlar arasındaki bazı temel farklılıklar verilmiştir.

Tablo 1. Bakteri, Arke ve Ökaryotlar arasındaki bazı temel farklılıklar

OZELLİKLER	BAKTERİLER	ARKELER	ÖKARYOTLAR
<u>Moleküler Özellikler</u>			
Halkasal kromozom yapısı	+	+	-
Plazmid bulunuşu	+	+	Nadir
Ribozom sedimentasyon sabiti	70 S	70 S	80 S ¹
Ribozomal RNA sedimentasyon sabitleri	16S, 23S, 5S	16S, 23S, 5S	18S, 28S, 5.8S, 5S
RNA polimeraz sayısı	1adet (4 alt birim)	Birkaç adet (Herbiri 8-12 alt birim)	3 adet (Herbiri 12-14 alt birim)
Trinskripsiyon faktörü (EF-2) gerekliliği	-	+	+
Promotör yapıları	TATAAT (Pribnow) kutusu (-10 ve -35 sekansları)	TATA kutusu (-38 ve -25 sekansları)	TATA kutusu (-30 ve -25 sekansları)
<u>Metabolik Özellikler</u>			
Azot fiksasyonu	+	+	-
Denitrifikasyon	+	+	-
Metan oluşturma	-	+	-
Klorofille fotosentez	+	-	+
Kemolitotrofik metabolizma	+	+	-
80°C üzerindeki sıcaklıkta ve 1.5 M'in üzerindeki tuz konsantrasyonlarında üreme	+	+	-
<u>Kimyasal Analizlere Dayalı Özellikler</u>			
PHB üretimi	+	+	-
Peptidoglikan bulunuşu	+ ²	-	-
Sterol bulunuşu (hücre zarlarında)	+	-	+
Zar lipitleri	Gliserole ester bağlı yağ asitleri	Gliserole eter bağlı fanil zincirleri	Gliserole ester bağlı yağ asitleri
<u>Sitolojik Özellikler</u>			
Prokaryotik hücre yapısı	+	+	-
Histon proteinleri	-	+ ³	-
9+2 düzeninde flagella yapısı	-	-	+
Başlangıç amino asiti	N-formilmetiyonin	Metiyonin	Metiyonin
5'CAP ve poli-A uzantısı	-	-	+
Mitoz	-	-	+
<u>Antibiyotiklere Duvarlılık</u>			
B-laktam, kloramfenikol, streptomisin	+	-	-
Siklohekzimit	-	-	+

1: Mitokondri ve kloroplastı hariç, 2: Protein yapıda hücre duvarına sahip Chlamydiae ve Planctomycet'ler hariç, 3: Bazı tRNA genleri intron proteinleri içermektedir

Kaynak: Özcan, 2004.

KISIM 2

NÜKLEİK ASİTLERİN YAPI ve FONKSİYONLARI

İnsan-genom projesi 1990'da başlamış ve 2003'te tamamlanmıştır. Proje sonuçlarına göre; çekirdekli hücrenin her birinde DNA'nın 2 metre uzunluğunda olduğu ve haploit hücrelerde (23 kromozomlu-eşey hücreleri) 3 milyar baz çiftine, diploit hücrelerde (46 kromozomlu) 6 milyar baz çiftinin olduğu ve bunların da 20 - 30 bin geni oluşturduğu ve bu genlerden de yaklaşık 100 bin proteini kodladığı bulunmuştur. Yapılan çalışmalarda DNA'nın %10'luk intron olduğu ve DNA'da %60 oranında tekrarlanan diziler olduğu, %97 oranında protein şifreleyen DNA bölgesinin olduğu ve sadece %2'sinin anlamlı protein kodladığı görülmüştür. İnsan hücresi 46 kromozoma sahiptir ve bu kromozomda bulunan DNA zincirlerinin bazıları yan yana yazılırsa 820.000 sayfa tutmaktadır, bu da her biri 1000 sayfadan 820 cilt kitap demektir.

Son bulgulara göre yetişkin bir insan vücudunda yaklaşık 3.72×10^{13} (37.2 trilyon) hücre bulunmaktadır. Buradan gidilerek tek bir hücre ve toplam hücredeki DNA uzunluğu hesaplanmıştır.

DNA'nın Uzunluğunun Hesabı:

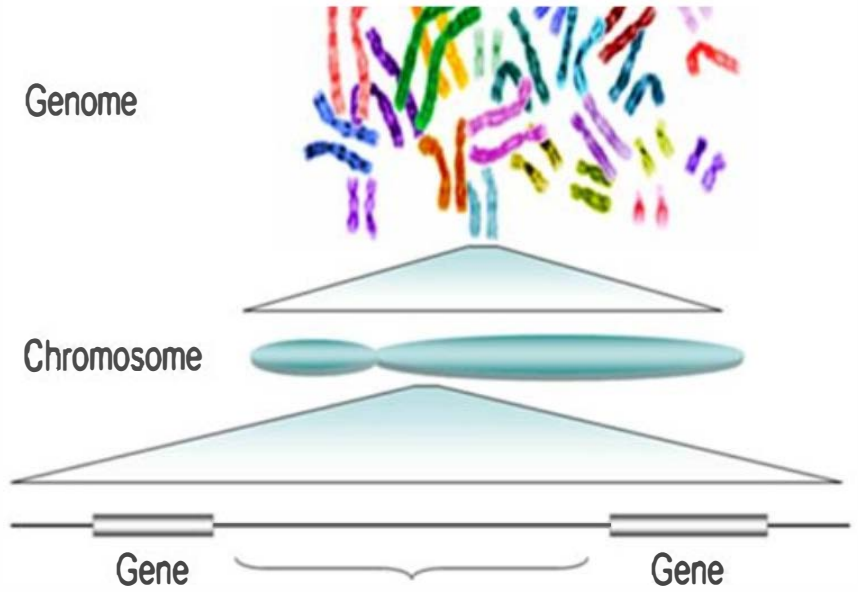
$(1 \text{ baz çiftinin uzunluğu}) \times (\text{hücredeki baz çiftinin sayısı}) \times (\text{vücuttaki hücre sayısı})$

$$(0.34 \times 10^{-9} \text{ m}) \times (6 \times 10^9) \times (10^{13}) = 2.0 \times 10^{13} \text{ metredir.}$$

Bir hücrede ise 2 metredir. 2.0×10^{13} metre. Bu, dünyadan güneşe yaklaşık 70 geziye eşdeğerdir.

Genom, bir canlının sahip olduğu genetik bilginin toplamı yani bütünlüğüdür (Şekil 12).

Proteom, belirli bir çevresel koşullar altında bir organizmada bulunan toplam proteindir.

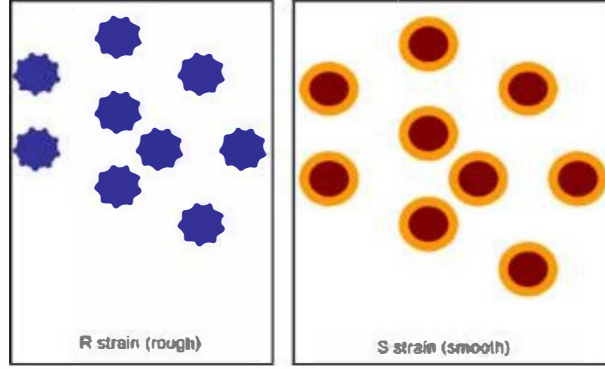


Şekil 12. Genom

(https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Human_genome_to_genes.png, 2014)

1903'te W.S. Sutton adlı bir bilim adamı kalıtımı sağlayan genlerin kromozomlar üzerinde bulunduğunu ifade etmiştir. Kalıtımın DNA molekülü tarafından taşındığı ilk olarak 1928'de Fred Griffith adlı bilim adamı tarafından ortaya atılmıştır. Bu bilim adamı zatürreye sebep olan *Streptococcus pneumoniae* (ya da kısaca pnömokok)'nin 2 ırkını (suş) deneyinde kullanmıştır. Bunlardan birisine hücrenin en dışında yapışkan polisakkaritten oluşan kapsüle sahip, bu yapıdan dolayı hastalık oluşturan (patojen) ırk olup, petri kabında düz ve büyük koloniler oluşturduğu için '**S ırkı**' (Smooth = düzgün, düz, pürüzsüz) adını vermiştir. Diğer ırka ise kapsülsüz, bundan dolayı hastalık oluşturmeyen (patojen olmayan), petri kabında küçük ve kenarları pürüklü koloniler oluşturduğu için '**R ırkı**' (Rough = pürüklü, pürüzlü) adını vermiştir (Şekil 13).

Serotip	Koloni Morfolojisi	Kapsül	Virülans
II R	Pürüzlü	Yok	Hastalık yapmaz (avirülant)
III S	Düz	Var	Hastalık yapar (virülant)



Şekil 13. R ve S İrkinin Özelliği ve Görünüşü

(<http://www.truniversity.net/ICBdemo/view/article/52446f810cf264abcd85e912/>, 2017)

(<http://www.visionlearning.com/en/library/Biology/2/DNA-I/149>, 2017)

Griffith'in Deneyi



Patojen S ırkını üretilmiş ve fareye enjekte edildiğinde **fare ölü-**

yor, çünkü zatüre olmuştur.



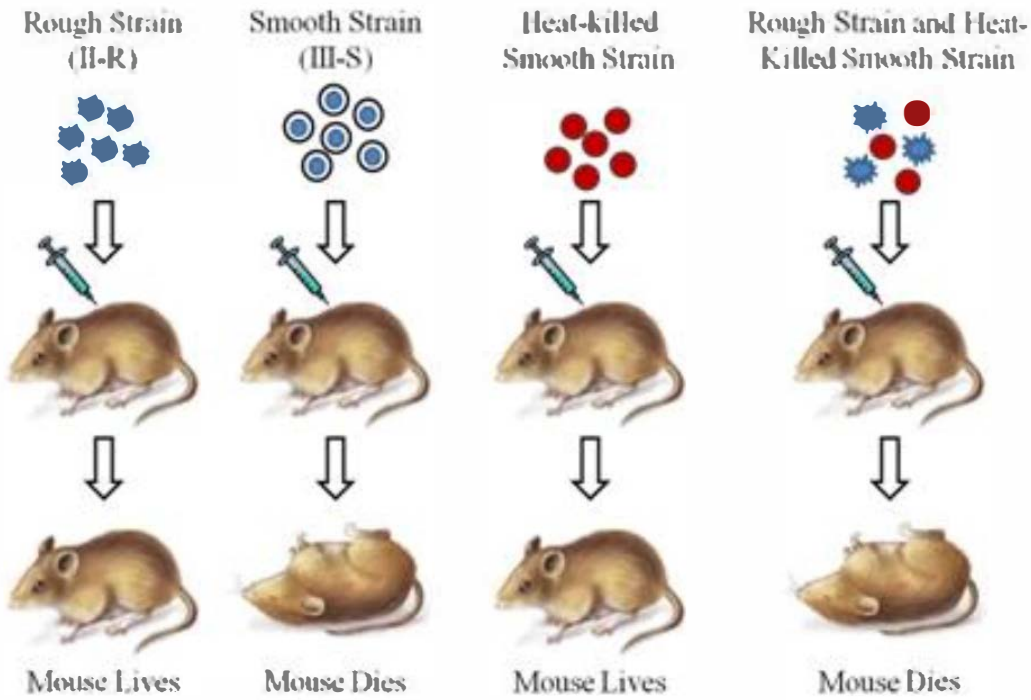
Patojen olmayan R ırkını üretilmiş ve fareye enjekte ettiğinde **fare**

canlı kalmaktadır.



Griffith, ısı ile S bakterilerini öldürüp fareye enjekte etmiş ve fareler **canlı** kalmıştır. Sonra, ısı ile öldürülen S bakterileriyle R bakterilerini karıştırıp fareye enjekte ettiğinde fareler **ölmüştür** (Şekil 14).

Griffith ısıyla ölen S bakterilerinden yüksek sıcaklık etkisiyle bozulmayan bir maddenin serbest kalarak R tipine ait hücrelere girdiğini yani **transforme** olacağını görmüştür (transformasyon). Ölen farelerden örnek alıp ekim yapmış ve S tipi bakterilerin olduğunu görmüştür. Ancak, transformasyona neden olan maddenin ne olduğunu açıklayamamıştır. Ancak bir öneri olarak transformasyon neden olan ana maddenin polisakkarit kapsülün bir kısmı yada kapsül sentezinde rol alan bir bileşik olabileceğini ileri sürmüştür.



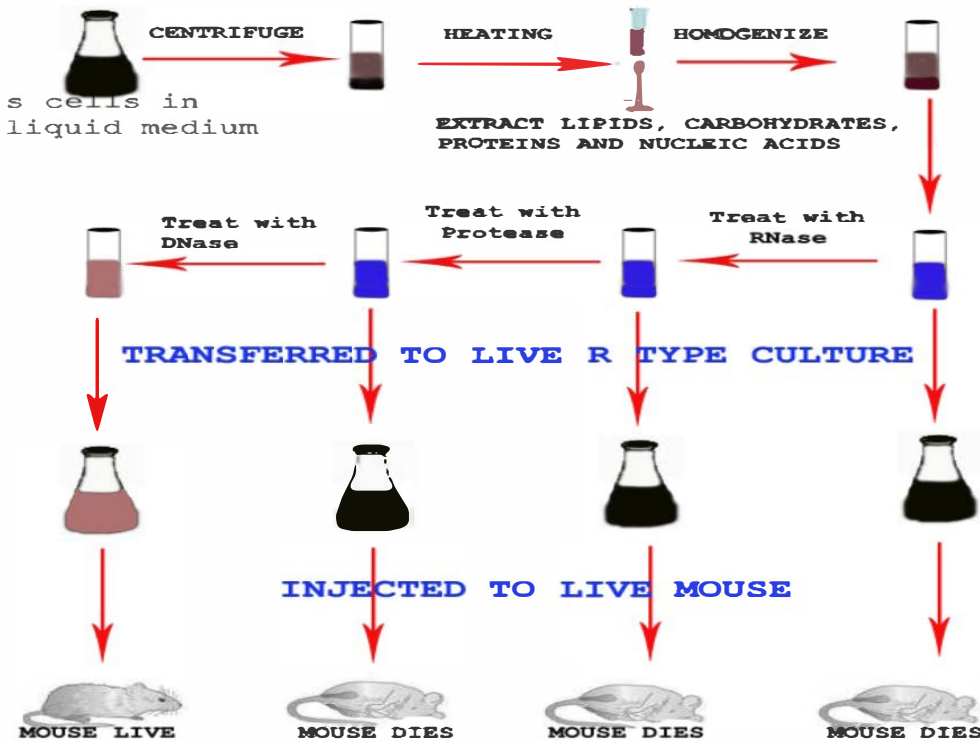
Şekil 14. Griffith'in Deneyi

(<http://greatexperimentsblog.blogspot.com.tr/2015/10/live-mouse-dead-lethal-bacteria-live.html>, 2015)

Daha sonra 1943'te 3 bilim adamı O.T. Avery, C.M. MacLeod ve M. McCarty Griffith'in deneyini ele alıp, ileri götürmüşlerdir (Şekil 15).

Amaç: Fareye ne geçmişti ki fare ölmüştü, bunu ortaya çıkarmak yani kalıtsal materyali bulmaktı.

Hastalık yapan S tipi bakterilerini ısı ile öldürmüş, parçalanmış bakteri içeriğini alıp 3 ayrı deney yapmışlardır. Bakteri içeriği proteaz (proteinleri parçalayan enzim), RNaz (RNA'yı parçalayan enzim) ve DNaz (DNA'yı parçalayan enzim) ile muamele edildikten sonra canlı R bakterileriyle karıştırılarak farelere enjekte edilip sonuca bakılmıştır. Sonuçta proteaz ve RNaz muamelesi edilmiş deneylerde farelerin **ÖLDÜĞÜNÜ**, sadece DNaz+R bakterisi ile muamele edilmiş deneyde farenin **CANLI** kaldığını göstermişlerdir. DNaz tarafından DNA molekülü parçalandığından dolayı hastalık etkeni olan kalıtsal bilgi R tipi bakterilere aktarılmamış ve onları S tipine çevirmediği için fare zature olmamış ve ölmemiş, canlı kalmıştır. Sonuç olarak; Transformasyon yapan maddeyi saf olarak elde etmişler ve bu molekülün DNA olduğunu kanıtlamışlardır (Şekil 15).



Şekil 15. Avery, MacLeod ve McCarty'nin Deneyi

(<http://biosiva.50webs.org/rep1.htm>, 2017)

Hershey ve Chase (1952) de bakteriyofaj T2 deneylerinde DNA'nın genetik materyal olduğunu ikinci kez ispatlamışlardır.

Kalıtsal bilgiyi taşıyan bir molekülün 3 önemli özelliği bulunması gerekir:

1. Molekül kendini eşleyebilmeli ve uzun yıllar boyunca nesilden nesile aktarılan kalıtsal bilgi değişmeden kalmalıdır.
2. Molekül kendini eşlerken çok nadirde olsa mutasyona izin vermeli
3. Bu molekül hücrede sentezlenen bütün proteinlerin sentezini denetleyebilmelidir.

1947 - 1953'te Erwin Chargaff ve arkadaşları türlerin DNA'larının baz kompozisyonunu incelemişler ve Chargaff kurallarını açıklamışlardır.

Chargaff Kuralı

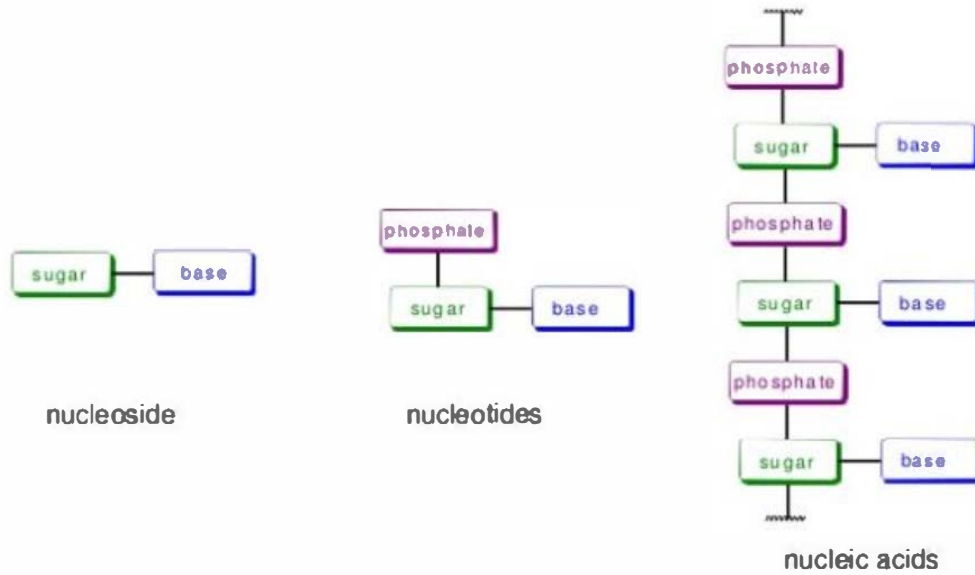
1. DNA'nın baz kapsamı türden türe değişiklik gösterir.
2. Çeşitli organlardan izole edilen DNA'daki baz kapsamı aynıdır.
3. Baz kapsamı o türün yaşı, beslenmesi ve çevre değiştirmesiyle değişmez, sabittir.
4. Herhangi bir türe ait DNA'daki Adenin bazlarının miktarı, Timin bazlarının miktarı ile orantılıdır. Guanin bazlarının miktarı da Sitozin bazlarının miktarı ile orantılıdır. Yani DNA moleküllerinde Adenin Timine veya Guaninin Sitozine oranı da-ima 1'e eşittir ($A/T=1$ ve $G/C=1$).
5. Pürinlerin toplamı pirimidinlerin toplamına eşittir ($A+G=T+C$), ancak $A + T$ %'si, $G + C$ %'sine eşit değildir ($A + T \% \neq G + C \%$)

İşte J.D. Watson ve F.Crick 1953'de bu bulguları değerlendirerek böyle özelliklere sahip DNA makromolekülünün sekonder yapısına ait bir model geliştirmişlerdir. Bilim adamları X-ışını kullanarak DNA'nın yapısını çözmüştür. DNA'nın birbirinin tamamlayıcısı olan çift sarmaldan (double helix) meydana geldiğini açıklamışlar ve 1962'de Nobel ödülü almışlar.

NÜKLEİK ASİTLERİN YAPISAL ÜNİTELERİ

Nükleik asitler 2 gruba ayrılır: DNA ve RNA. Bunların yapısını oluşturan üniteler ise (Şekil 16);

- Şekerler,
- Bazlar,
- Nükleozid,
- Nükleotid,
- Polinükleotid'dir.



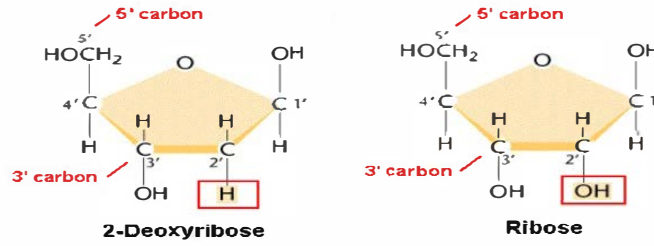
Şekil 16. Nükleik Asitlerin Yapısal Üniteleri

(<http://www.slideshare.net/sihamgritly/5-nucleotides-and-nucleic-acids-lecture>, 2013)

Şekerler

Pentozlar bir karbon atomunun heksozdan uzaklaştırılması ile oluşurlar. Kimyasal adlandırma gereği, bir nükleotid şeker halkasındaki karbon atomları 1', 2', 3', 4' ve 5' olarak adlandırılır ("1 üssü" vb. olarak okunur). Pentozlar, nükleik asitlerin ana omurgası boyunca yer alır ve deoksiriboz şekeri DNA'da, riboz şekeri RNA'da bulunur. Aradaki fark 2' no'lu C'na bağlı OH grubundaki oksijenin deoksiribozda olmamasıdır. Ribonükleotid redüktaz enzimi 5 karbonlu şeker halkasının 2' C'nundaki hidroksil (-OH) grubunu indirgeyerek ribozu deoksiriboza dönüştürmek-

tedir. Nükleik asitlerin doğada sentezlenmeleri sırasında büyüyen zincirin bir ucundaki şeker grubunun serbest bir 3' hidroksil (-OH) grubu varken, diğer ucundaki şekerin ise serbest bir 5'-OH grubu vardır. Bu iki uca, sırasıyla 3' ve 5' uçları denilmektedir (Şekil 17).



(Klug & Cummings 1997)

Şekil 17. Deoksiriboz ve Riboz Şekerinin Yapısı

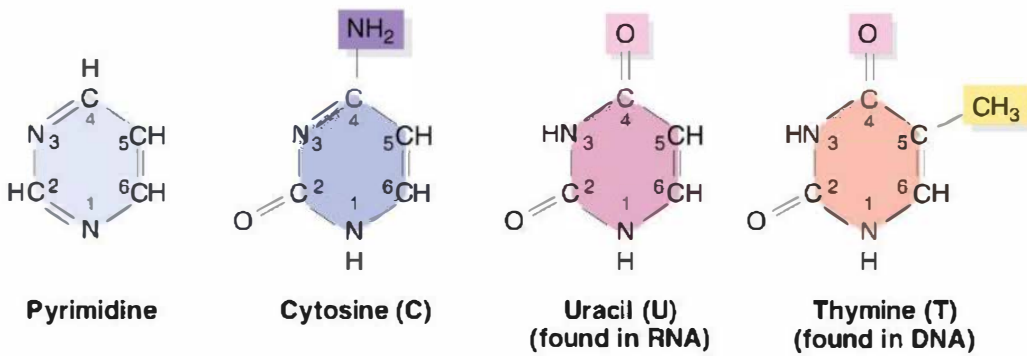
(https://www.mun.ca/biology/scarr/Ribose_sugar.html, 2014)

Bazlar

Azotlu bazlar iki çeşittir, bunlar Pirimidinler ve Pürinler'dir.

Pirimidinler, yapılarında 2 tane azot (N) bulunan ve 6 atomlu tek halka içeren altıgen bir yapıya sahip bileşiktir. Pirimidin bazları: Sitozin, Timin, Urasil'dir. C, T ve U şeklinde simgelenirler (Şekil 18).

- Sitozinde (C) ; 4.C'da NH_2 bulunur.
- Timinde (T) ; 5.C'da CH_3 bulunur.
- Urasilde (U) ; 2.C'a ve 4.C'a O bağlıdır.

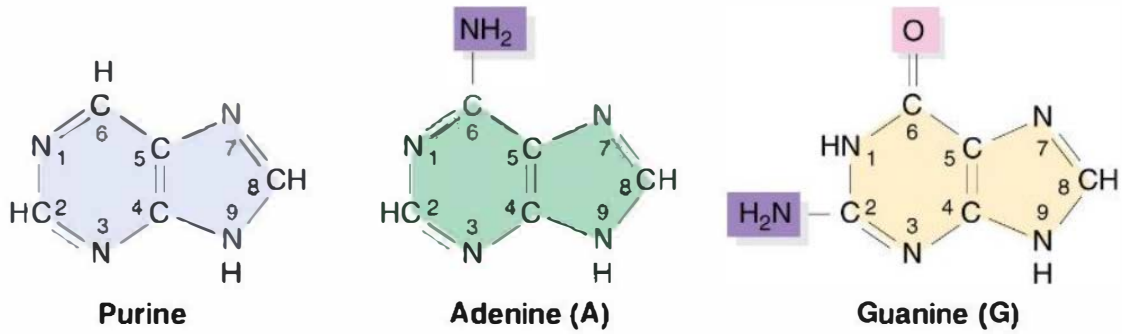


Şekil 18. Pirimidinlerin Yapısı

(https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_02-08.html, 2010)

Pürinler ise altıgen pirimidin halkasına 5'li bir imidazol halkasının bağlanmasıyla oluşur. 9 atomlu, iki halkalı'dır. Pürin bazları: Adenin, Guanin'dir. A ve G şeklinde simgelenirler (Şekil 19).

- Adeninde (A) ; 6.C'da NH_2 bulunur.
- Guaninde (G) ; 6.C'a O, 2.C'a NH_2 bağlıdır.



Şekil 19. Pürinlerin Yapısı

(https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_02-08.html, 2010)

Nükleozitler

Bir pürin veya pirimidin bazının riboz veya deoksiriboz şekerinin 1 no'lu C'una bağlanmasıyla oluşurlar. Bazların riboz şekerine bağlanmasıyla ribonükleozit, deoksiriboza bağlanmasıyla deoksiribonükleozit adını almaktadır.

Pirimidin nükleozitlerde şeker 1 no'lu C'undan, C, T, U bazlarının 1 no'lu azot (N)'a glikozidik bağla bağlanırken, pürin nükleozitlerinde şeker 1 no'lu C ile A, G'nin 9 no'lu azot (N)'una glikozidik bağlanır (Şekil 20).

Pürin nükleozitlerinin sonuna '-ozin', Pirimidin nükleozitlerinin sonuna '-idin' eki getirilir.

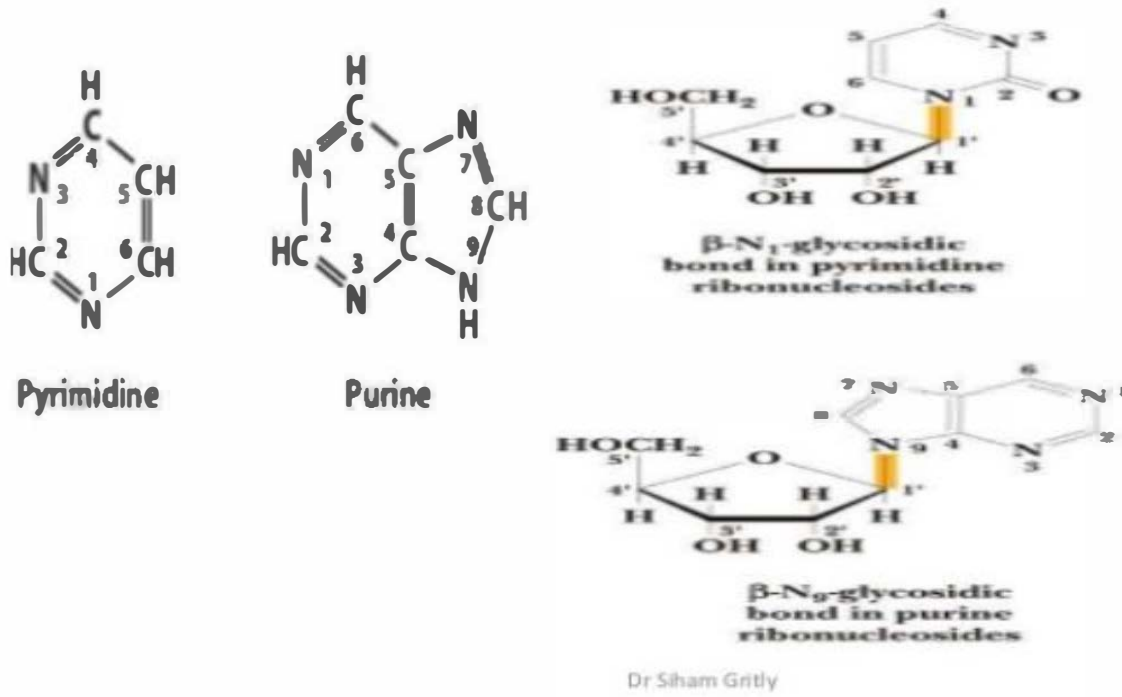
DNA'daki nükleozitler:

- deoksiadenozin (deoksiadenin nükleozit),
- deoksiguanozin, (deoksiguanozin nükleozit)

- deoksitidin, (deoksitidin nükleozit)
- timidin (timidin nükleozit) olarak isimlendirilir.

RNA'daki nükleozitler,

- adenzin (adenin nükleozit),
- guanozin (guanin nükleozit),
- sitidin (sitozin nükleozit),
- uridin (urasil nükleozit) olarak isimlendirilir.



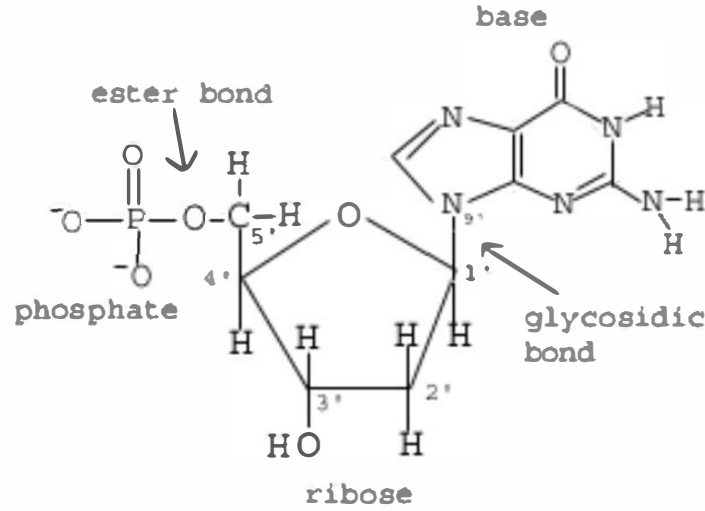
Şekil 20. Pirimizin ve Pürinin Şeker ile Glikozidik Bağlantısı ile Nükleozit Oluşumu

(<http://www.slideshare.net/sihamgritly/5-nucleotides-and-nucleic-acids-lecture>, 2016)

Nükleotitler

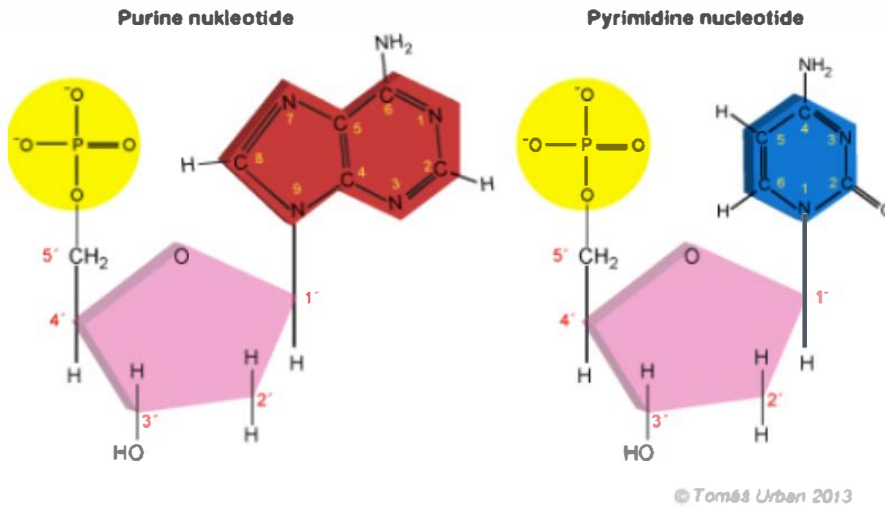
Nükleozitlerin fosfat esterleri olarak bilinir. Üç bileşenden meydana gelmiştir: bir azotlu baz, bir pentoz şekeri ve bir fosfat grubu (Şekil 21 ve 22).

Fosfat grubu, 5C'lu riboz şekerinin 2', 3' ve 5' no'lu C'larına bağlı OH ile ester bağ oluşturur. C-5'-fosfat yapısı biyolojik sistemlerde en yaygın olanıdır, DNA ve RNA'da bulunan yapıdır.



Şekil 21. Nükleotit'in Yapısı

(<http://www.sparknotes.com/biology/molecular/structureofnucleicacids/section1.rhtml>, 2016)



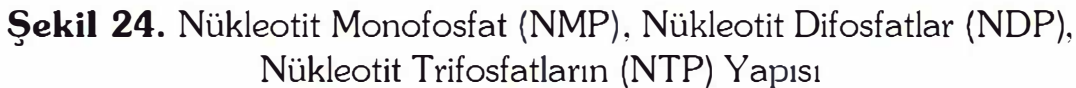
Şekil 22. Pürin ve Pirimidin Nükleotitler

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vse/print.php?page=296&typ=html, 2016)

Fosfat, 3' ve 5' ya da 2' ve 3' C'lara aynı anda bağlanarak hal-kasal fosfat türevleri oluşturur. En iyi örnek = cAMP'dir (Şekil 23).

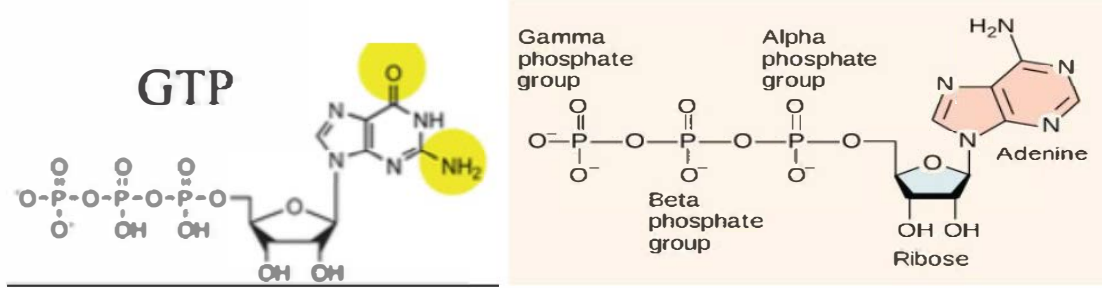


Nükleotitler, bir tane fosfat içerdikleri için nükleotit monofosfat (NMP) olarak da bilinmektedir. İki fosfatın eklenmesi ile nükleotit difosfatlar (NDP) ve 3 tane fosfatın eklenmesi ile nükleotit trifosfatlar (NTP) oluşmaktadır (Şekil 24). Trifosfatlar çok önemlidir, çünkü hücrede nükleik asit sentezinde öncü molekül olarak rol oynarlar. Diğer yandan, uçtaki fosfat grubunun çıkarılması ya da ilavesi ile büyük miktarda enerji oluşumu sağladığından adenozin trifosfat (ATP) ve guanozin trifosfat (GTP) hücrenin biyo enerjisinde çok önemlidir. Çift sarmalın omurgasını oluşturan fosfat grupları pH 7.0'de negatif yüklüdür ve bu nedenle de nötr pH'da DNA molekülü kuvvetli asidiktir. Onun için nükleik asit denilmektedir.



26

ATP ve GTP' nin yapısı (Şekil 25):

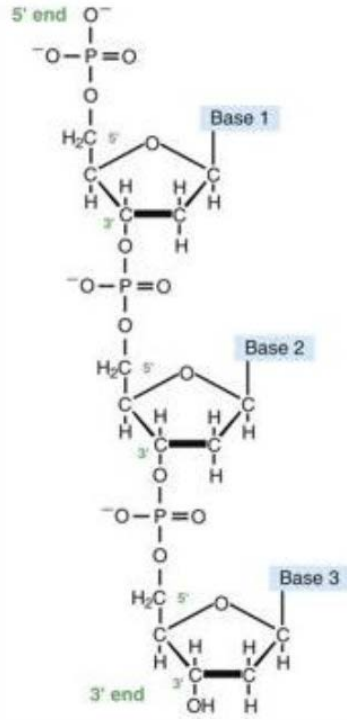


Şekil 25. ATP ve GTP' nin Yapısı

(<http://archive.cnx.org/contents/3098bc50-e285-499d-9ac3-11344235956b@1/cell-energy-glycolysis>, 2016)

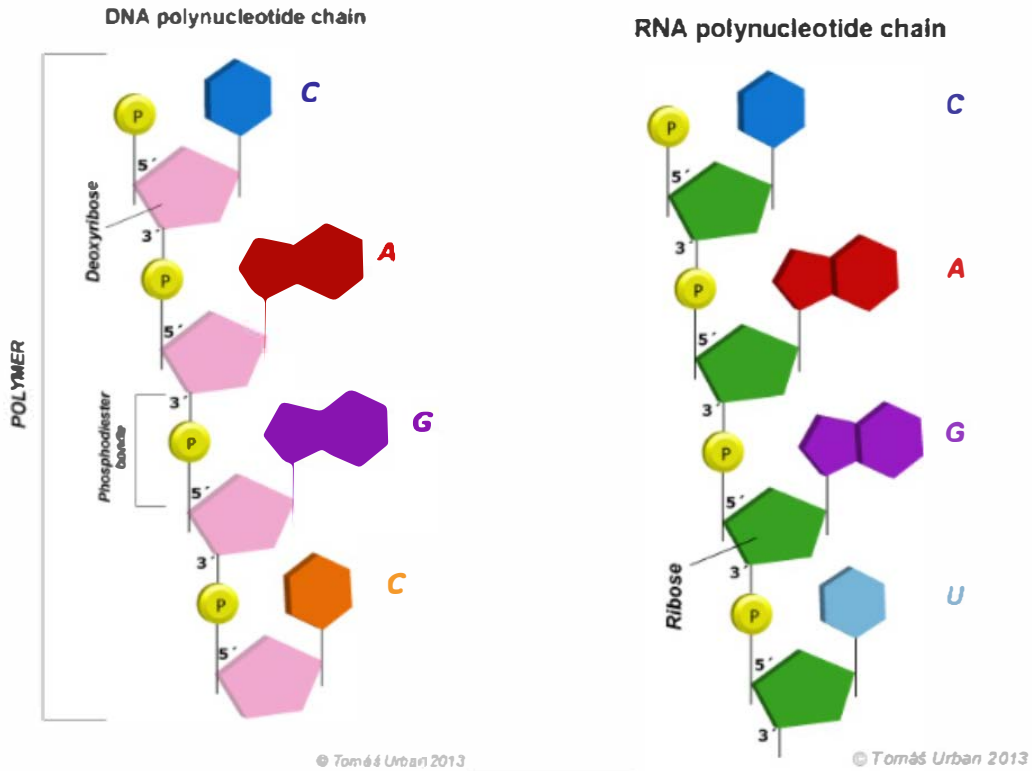
Polinükleotitler

Bir nükleotitdeki bir şekerin 5' C'unun OH'ı (hidroksil grubu) ile diğer nükleotitdeki şekerin 3'-OH arasında fosfodiester bağ oluşur. Fosforik asit her iki şekerdeki OH (alkol) grubu ile ester bağı yaptığından bağa fosfodiester bağıdır. Böylece 1 şeker ve 1 fosfatın devamlı bir şekilde devam etmesi ve arada fosfodiester bağının kurulmasıyla nükleik asitlerin ana omurgası olan polinükleotit oluşur (Şekil 26). DNA ve RNA'da polinükleotitler aynı tarzda dizilirler (Şekil 27). İki nükleotit birleşirse dinükleotit, 3 nükleotit birleşirse trinükleotit, 15-20 kadar nükleotit birleşirse oligonükleotit, zincirde daha çok (poli) nükleotit varsa polinükleotit olarak tanımlanmaktadır. DNA ve RNA yapısında serbest bir C-5' ucu ve serbest bir C-3' ucu bulunmaktadır (Şekil 27).



Şekil 26. Polinükleotit Zinciri

(<https://basicmedicalkey.com/human-genome-and-the-chromosomal-basis-of-heredity/>2016)



Şekil 27. DNA ve RNA Polinükleotit Zincirleri

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=296&typ=html, 2016)

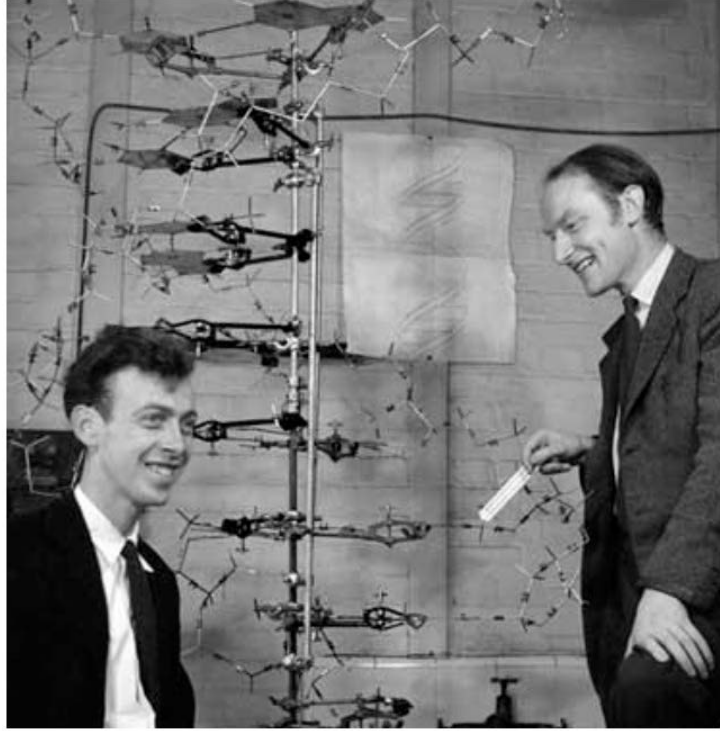
DNA (Deoksiribonükleik Asit)'nin YAPISI (WATSON-CRICK MODELİ)

Polinükleotit zincirleri genetik materyal olan DNA'yı oluşturmada nasıl bir düzenlemeye sahiptir sorusu uzun yıllar bilim adamlarınca araştırılmıştır. DNA'nın tek zincirden mi yoksa daha fazla zincirden mi oluştuğu konusu uzun yıllar çözülmeye çalışılmıştır (1940-1953). 1950-1953 yılları arasında Rosalind Franklin X-ışını kırınım analizi ile elde ettiği verilerden DNA'nın bir çeşit sarmal yapıda olduğunu, Linus Pauling ise DNA'nın 3 sarmaldan meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir. Bu öneriler tartışılırken 1953'de J.D. Watson ve F. Crick DNA'nın iki sarmaldan meydana geldiğini önermişlerdir. Bu iki bilim adamı Chargaff'ın kurallarını dikkate alarak DNA molekülünün sekonder yapısına ait bir model geliştirmişlerdir.

Watson-Crick (Şekil 28a) tarafından önerilen DNA çift sarmal modelinin (double helix modeli) (Şekil 28b) özellikleri şöyledir:

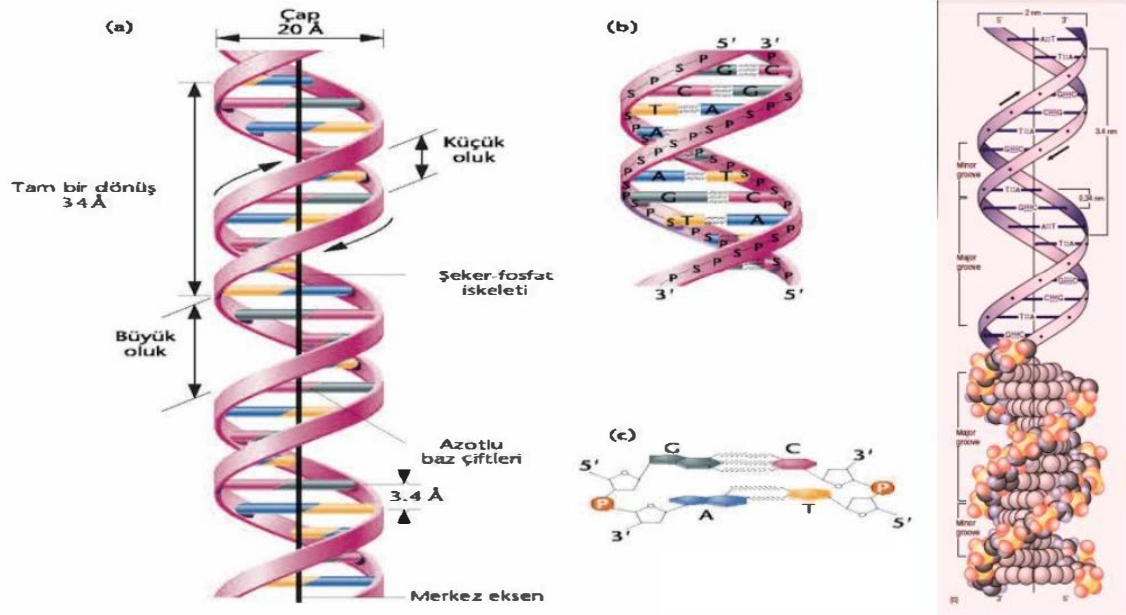
- DNA iki sarmal (zincirden) meydana gelmektedir. İki zincir birbirine zıttır (antiparalel). Çünkü bazlar arasında H bağlarının kurulması için bu gereklidir. Zincirlerden birinin 3' ucu ile diğerinin 5' ucu aynı tarafta bulunmaktadır.
- DNA'nın omurgasını oluşturan hidrofilik şeker ve negatif yüklü fosfat üniteleri çift sarmalın dışı bakan yüzündedir. Kendilerini saran su moleküllerine dönük durumdadır.
- Hidrofobik özelliğe sahip bazlar ise sarmalın iç tarafındadır. Ana eksene dikey olarak bulunmaktadır.
- Çift sarmalın çapı 20 Å dur.
- Birbirini takip eden bazlar 36° dönüş yaparak dizilmekte, 10 bazın arka arkaya gelmesi çift sarmalın 1 tam dönüş yapmasını sağlamaktadır.
- Komşu bazlar arasında ise $3,4 \text{ Å}$ uzaklık bulunur. Bazlar arasında H bağları mevcuttur. Bir tam dönüşte sarmalın boyu 34 Å uzamaktadır.

- İki polipeptid zinciri bir eksen etrafında kıvrılarak sağ el yapısını oluşturmaktadır. Yani zincir sağa dönerek kıvrılmaktadır (Sağ el formu, B- formu)
- Eksen üzerinde sıra ile geniş olan büyük oluklar ve dar olan küçük oluklar bulunmaktadır. Büyük ve küçük olukların olma nedeni ise, şekerler glikozidik bağlarla bazlara asimetrik olarak bağlanırlar. Bu durum baz çiftlerinin karşılıklı kenarlarında büyük ve küçük olukların oluşumuna neden olmaktadır. Dönüm (sarmal)'ler sırasında meydana gelen oluklar da eşit boyda değildir.



Şekil 28a. Watson ve Crick Önerdikleri DNA Modelini İncelerken

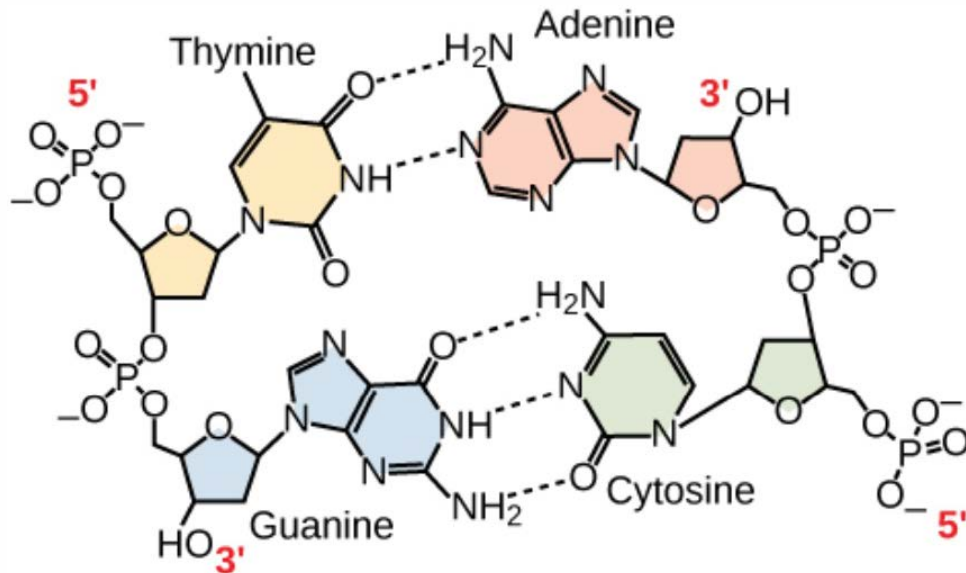
(https://learning.uonbi.ac.ke/courses/SZL311/scormPackages/path_2/19_watson_and_crick_model_of_dna_the_double_helix.html, 2016)



Şekil 28b. Watson-Crick DNA Modeli

(<http://advancedmathematicalresearch.blogspot.com.tr/2015/03/dna-genetic-materialstructure-of-dna.html>, 2016)

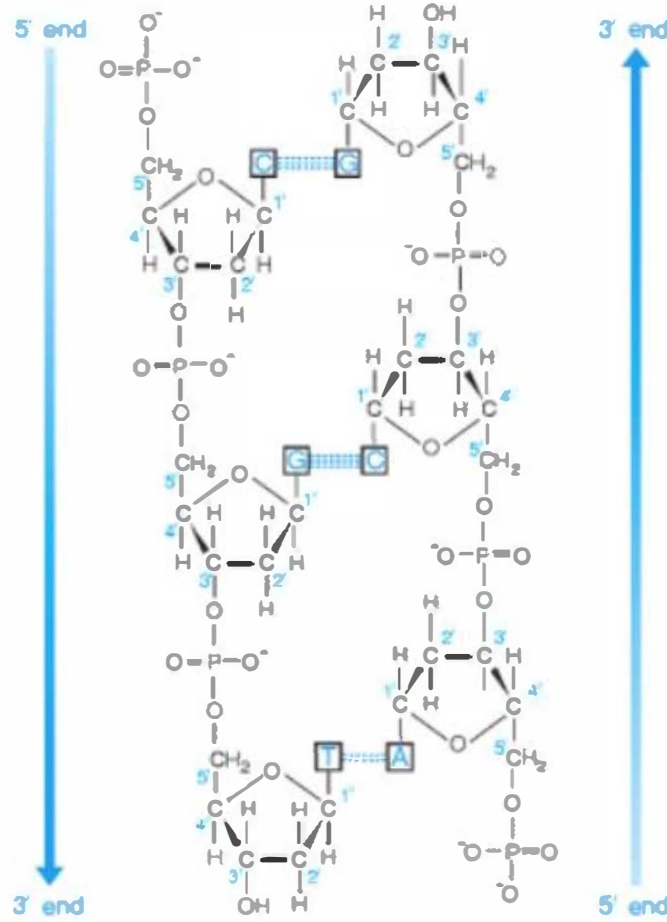
DNA'daki bazlar arasında hidrojen bağları kurulur. Timin Adenine 2 hidrojen bağı ile bağlanırken, Sitozin ise Guanine 3 hidrojen bağı ile bağlanmaktadır (Şekil 29).



Şekil 29. DNA'daki Bazlar Arasındaki Hidrojen bağları

(<https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/biological-macromolecules-3/nucleic-acids-57/the-dna-double-helix-307-11440/>, 2016)

Zincirdeki glikozidik bağların birbirine uzaklığı 10.85 Å (yaklaşık 11 Å)'dur. Böyle bir aralığa 2 pirimidin bazı yapı olarak ufak gelir ve aradaki mesafe H bağlarının kurulması için uygun değildir, 2 pürin bazı için ise pürinler yapı olarak büyük olduğundan aralığa büyük gelir ve H bağları yine kurulamaz. Bir pürin ve bir pirimidin bazının ise tam olarak aralığa uygunluk gösterdiği saptanmıştır. Şekil 30'da DNA çift zincirinin açık yapısı verilmiştir.



Şekil 30. DNA Çift Zincirinin Açık Yapısı

(<http://docs.neu.edu.tr/staff/mahmutcerkez.ergoren>, 2016)

DNA'nın FARKLI FORMLARI

DNA değişik formları izole edilmiştir. Watson ve Crick zamanında A- ve B-DNA formları bilinmekteydi. Yapılan çalışmalarda DNA'nın B formuna uygun olduğu ifade edilmiştir. A-DNA'nın yüksek tuz ya da

dehidrasyon (suyun uzaklaştırılması) ortamlarında ortaya çıkan bir yapılarının olduğu saptanmıştır, daha sonraları Z-DNA keşfedilmiştir (Şekil 31, Tablo 2).

Laboratuvar koşullarında DNA incelendiğinde farklı formlarının da olduğu saptanmıştır. C-,D-,E- ve diğerleri.

DNA formları:

A-DNA: Suyun az olduğu durumlarda oluşur. DNA-protein komplekslerinde gözlenen formdur. Sağ el, yüksek tuz ya da dehidrasyon koşullarında baskındır, tam bir dönüşte 11 baz çifti, çap 23 Å.

B-DNA: Normalde DNA'nın aldığı form olup, çoğunlukla hücre içinde bu formda bulunur. Sağ el, normal koşullarda, tam bir dönüşte 10 baz çifti, çap 20 Å (Watson-Crick modeli DNA).

Z-DNA: Canlı hücrelerde çok az miktarda bulunur. Yüksek (+) iyonlarının varlığında oluşur. Sol el, sadece Guanin ve Sitozin (C) içeriyor, tam bir dönüşte 12 baz çifti, çapı 18 Å. Zikzak (Zigzag) bir yapıya sahiptir ve bu yüzden Z ismi verilmiştir. Fonksiyonu tam olarak bilinmiyor.

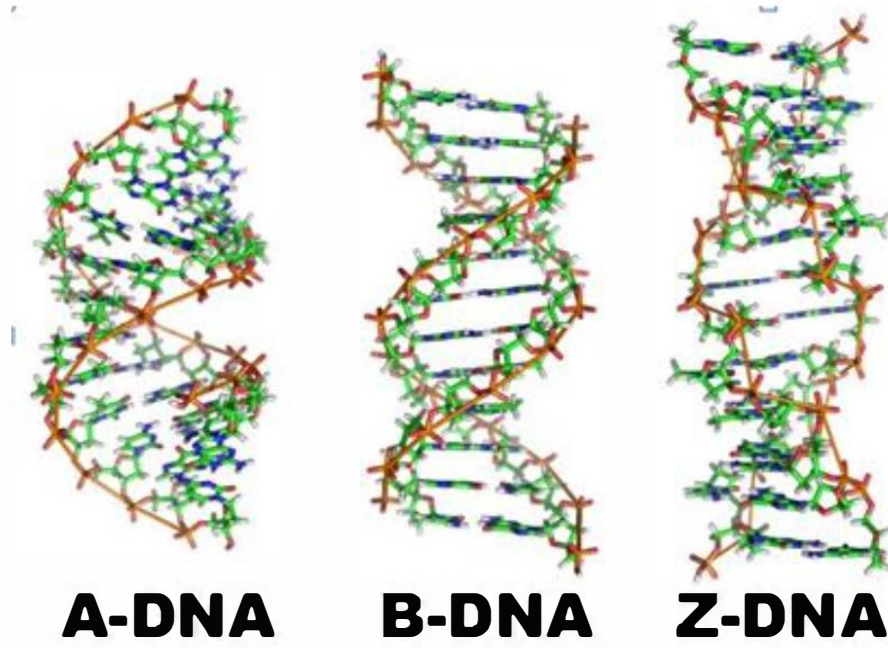
C-DNA: sağ el, dehidrasyon koşullarında, tam bir dönüşte 9.3 baz çifti, çap 19 Å.

D-DNA: sağ el, guanin bazı içermez, tam bir dönüşte 8 baz çifti.

E-DNA: sağ el, guanin bazı içermez, tam bir dönüşte 7.5 baz çifti.

P-DNA: DNA yapay şekilde uzatılırsa bu formu alır, fosfat grupları iç kısımda azotlu bazlar sarmalın dış yüzünde, tam bir dönüşte 2.62 baz çifti bulunur, yapı olarak ince ve uzundur.

Formlar içinde A-, B- ve Z- formları üç büyük form olarak bilinmektedir.

**Şekil 31.** DNA Formlarının Sarmal yapıları

(http://biologicalexceptions.blogspot.com.tr/2013/10/dna-is-as-easy-as-b-z.html, 2016)

Tablo 2. DNA Formlarının Özellikleri

Özellikleri	A formu	B formu (Watson-Crick Modeli)	Z formu
Heliks(Sarmal)Yapı	Sağ el	Sağ el	Sol el
Çap	2,6	2,0	1,8
Baz çifti/dönüş	11	10	12
Heliks yükselmesi	26 Å	34 Å	37 Å
Baz uzaklığı	2.3 Å	3.4 Å	3.8 Å
Büyük Oluk	Dar/Derin	Geniş/Derin	Dar/Derin
Küçük Oluk	Geniş/Yüzeysel	Dar/Derin	Dar/Derin
Şekil	Geniş	Orta	Uzun

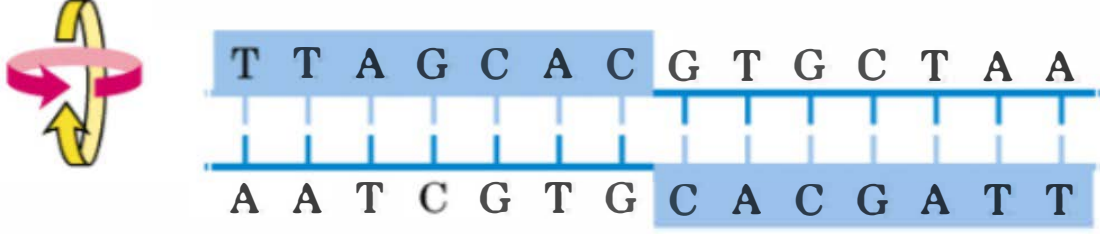
DNA'nın GENEL ÖZELLİKLERİ

- DNA'daki fosfat gruplarının pH'ı 4'tür. Bu değerin üzerindeki herhangi bir pH'da tamamen iyonize olmaktadır. Bu nedenle DNA asidik özelliğe sahiptir.
- Viskoz yapıdadır. DNA molekülü çözündüğü zaman kendi hacminin 10.00 katı kadar çözelti tutmaktadır.
- 260 nanometrede ölçülebilir.
- 80° – 90° de ısıtılırsa veya düşük – yüksek pH'a tutulursa çift sarmal açılır. Buna **DNA erimesi** denir.
- Çift sarmalın %50 sini tek sarmal haline getiren **erime sıcaklığı** denir (melting temperature ve T_m olarak gösterilir.)
- DNA'nın T_m 'sinin çok olması o DNA'da G ve C'in yüksek olduğunu gösterir. Çünkü G-C arasındaki 3 H bağı bulunur. Bunları kırmak için çok enerji gerekir.

Polinükleotidler arasındaki fosfodiester bağ kopmadan bazlar arasındaki H bağlarının kırılması ve 2 sarmalın birbirinden ayrılmasına **DNA denatürasyonu** denir. H bağlarının tekrar kurulması ile DNA çift sarmalı yeniden oluşturulur. Bu olaya DNA renatürasyonu denilmektedir.

Ökaryotik hücre DNA'sında polindromlar bulunur. **Polindrom:** tersten ve düzden okunduğunda aynı anlamı veren demektir (örneğin: Radar, Ey Edip Adanada Pide Ye) (Şekil 32). Polindromların büyük ihtimalle restriksiyon endonükleazlar için sinyal bölgelerini oluşturduğu ifade edilmektedir.

Palindrome



Şekil 32. DNA Üzerindeki Bir Palindromik Bölge

(http://www.siumed.edu/~bbartholomew/course_material/nucleic_acids.html, 2007)

DNA'nın YAPISAL FORMLARI

1. Düz (Lineer) DNA: Ökaryotik hücre kromozomlarında bazı faj ve virüslerde genetik materyalleri oluşturan sarmal DNA'nın iki ucu açık düz formudur (Şekil 33).



© CSLS/The University of Tokyo

Şekil 33. Düz (Lineer) DNA formu

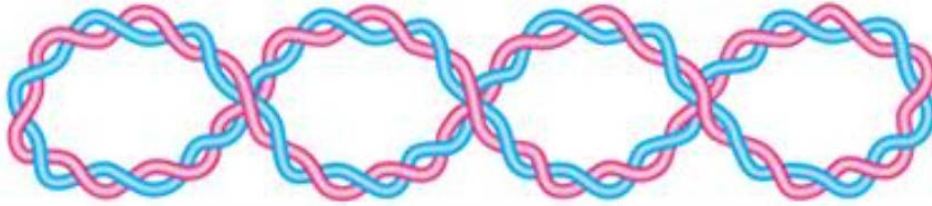
(http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/06_05.html, 2011)

2. Dairesel (Sirküler) DNA: Bakteriler, bazı fajlar, virüsler, ökaryotik mitokondri ve kloroplast ve plazmid DNA'larında çift iplikcikli sarmal dairesel yapıdadır (Şekil 34).



Şekil 34. Dairesel (Sirküler) DNA Formu
(http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/06_05.html, 2011)

3. Süpersarmal (Süper Helix) DNA formu: Plazmid ve virüslerde rastlanan bu yapı çift sarmal DNA'nın serbest ortamda kendi eksenini etrafında 360° ve birkaç kez dönmesinden kaynaklanır (Şekil 35).

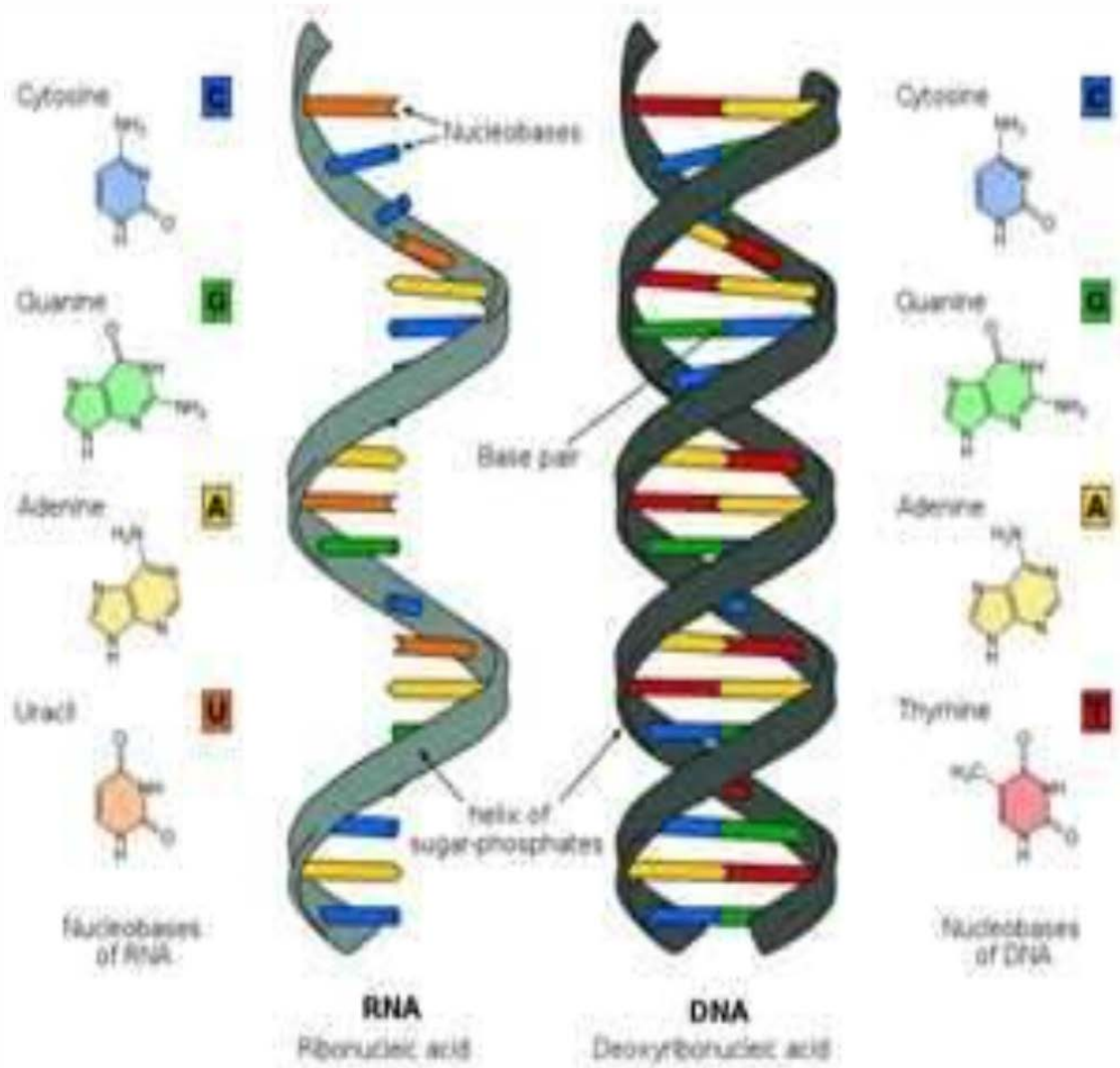


Şekil 35. Süpersarmal (Süper Helix) DNA Formu
(http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/active/06_05.html, 2011)

RNA (Ribonükleik asit)'nin YAPISI

Nükleik asitlerin diğeri ise RNA'dır. DNA'dan bazı farkları bulunmaktadır. Şeker olarak riboz şekeri vardır, Timin yerine Urasil bazı bulunmaktadır. RNA'nın yapısı kimyasal olarak DNA'ya benzer ancak, RNA tez zincirlidir (Şekil 36). Ancak, genetik materyali RNA olan bazı hayvan virüslerinde RNA ikili sarmal halindedir.

Genetik bilginin ifade edilmesinde üç hücrel RNA molekülü görev almaktadır. Ribozomal RNA (rRNA), haberci RNA (mRNA) ve taşıyıcı RNA (tRNA). Bu konuda detaylı bilgiler Translasyon kısmında verilecektir.

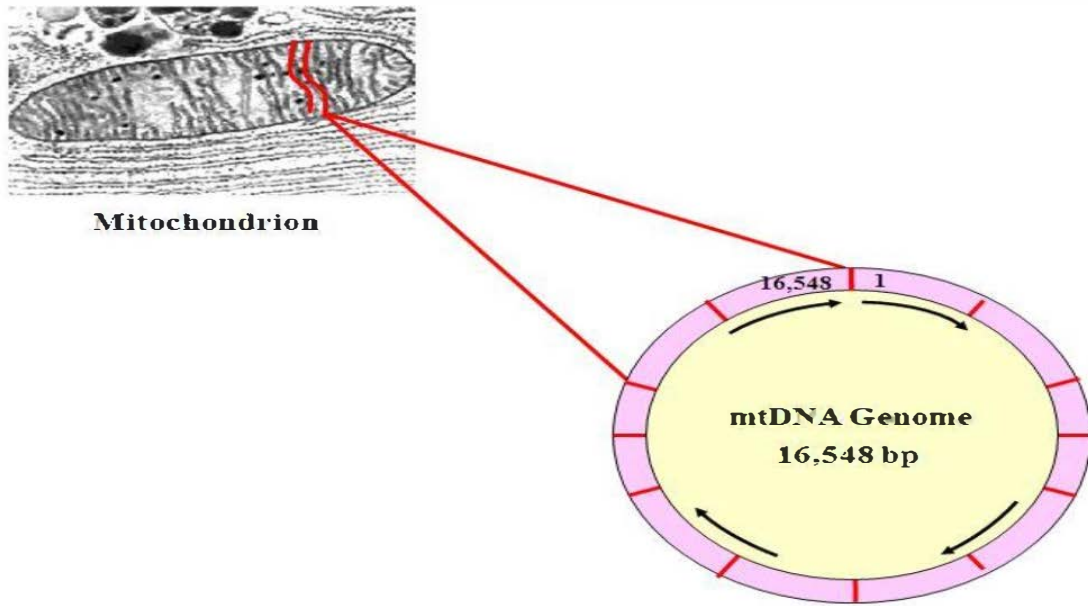


Şekil 36. RNA ve DNA Arasındaki Yapısal Farklılıklar
(www.pitt.edu/~super7/32011-33001/32771, 2008)

MİTOKONDRIAL DNA (mtDNA ya da mDNA)

Endosimbiotik teoriye göre mitokondri ilkel ökaryotik hücrenin içine α -proteobakterinin, kloroplast ise mavi-yeşil yosunun girmesi sonucu evrimleşerek oluşmuşlardır. Mitokondri hücre içinde ATP üretme işlemi olan hücresel solunumun merkezidir. Mitokondri hücrede bulunan ikinci büyük organel. İki zarla çevrilmiştir. Eritrosit, bakteri ve yeşil alglerde yok. Mitokondriler hücrenin enerji üretim merkezleridir. Kendi DNA ve ribozomlarına sahiptir ve dolayısıyla kendi proteinlerini kodlayıp üretebilir. MtDNA'sı bakterilerde olduğu gibi daireseldir (çembersel)

(Şekil 37). Trikarboksilik asit (TCA) döngüsü, yağ oksidasyonu ve ATP üretimi mitokondri içinde olan reaksiyonlardan bazılarıdır. Mitokondriler hücrenin enerji ihtiyacına göre hücre bölünmesinden bağımsız çoğalırlar. mtDNA'nın replikasyon ve transkripsiyonu nükleer DNA'dan bağımsızdır. Ancak replikasyon ve transkripsiyonda görev alan enzimler nükleer DNA tarafından üretilir. Mitokondri ve kloroplastların DNA taşıdığı 1960'lı yıllarda gösterilmiştir.



Şekil 37. Mitokondrial DNA Yapısı

(<https://identifiers.wordpress.com/2010/08/19/unknown-child-on-the-titanic-part-iii/>, 2010)

Mitokondriyal DNA (mtDNA)'nın özellikleri:

- mtDNA sirküler (çembersel, dairesel) yapıdaki çift zincirli DNA'dan oluşur, bakteri DNA'sına benzer. mtDNA 16.6 kb (kilobaz, kilo baz çifti = 1.000 baz çiftidir) içermektedir,
- Histon proteinleri bulunmaz, bu nedenle nasıl paketlenildiği henüz tam olarak bilinmemektedir,

- mtDNA'da 16S ve 12S olmak üzere 2 rRNA, 22 tRNA ve 13 mRNA (elektron transportu ve oksidatif fosforilasyonla ilgili proteinleri kodlar) olmak üzere toplam 37 gen bulunur,
- Memeli hücreleri mitoribozomları 55S dir. 35S büyük altbirim ve 25S küçük altbirimden oluşur,
- Replikasyon Orijini için tek bölgeyi içerir,
- Genler içinde intron bölgeleri bulunmaz,
- Nükleer DNA'ya kıyasla 5-10 kat daha yüksek mutasyon oranına sahiptir,
- UGA kodonu mitokondride triptofan kodlarken, nükleer DNA'da "stop" kodonudur,
- AGA/AGG mitokondride "stop" kodonu (nükleer kodonda stop kodonu olan UAA ve UAG) iken, nükleer DNA'da arginin kodonudur
- AUA mitokondride metionin kodlarken, nükleer DNA'da izolösin kodonudur,
- Kalıtım annedendir. Bir hücre bölünürken anne hücrenin mitokondrileri kardeş hücreler arasında rastgele bölünür.

KISIM 3

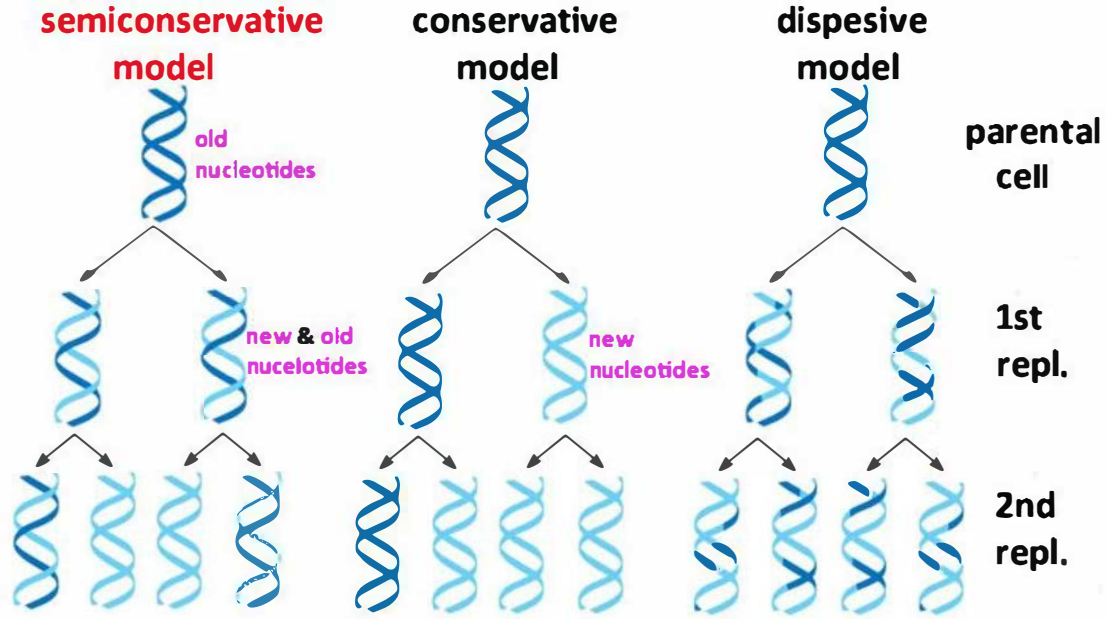
PROKARYOT ve ÖKARYOTLARDA DNA SENTEZİ (REPLİKASYON)

Replikasyon, DNA molekülünün kendi kendini eşlemesidir. Genetik bilgi ana hücreden yavru hücrelere DNA replikasyonu ile geçer. DNA çoğalması yani replikasyon her hücre bölünmesinde bir zorunluluktur. Replikasyon sonucunda hücredeki genetik materyal 2 katına çıkar. Hücrenin 2 yavru hücreye bölünmesiyle birlikte kalıtım maddesi de ikiye bölünür ve böylece kalıtım maddesinde bir denge sağlanmış olur. Replikasyonun nasıl olduğuna dair birçok görüşler ileri sürülmüştür, 3 model dikkate alınmıştır (Şekil 38). Bunlar:

1. Yarı Korunumlu DNA Replikasyonu (Semi Konservatif): Bu görüşe göre yeni oluşan DNA molekülünün bir zinciri orijinal DNA'dan gelmekte diğer zincir ise yeni sentezlenmiş polinükleotid zinciridir (Şekil 38).

2. Tam Korunumlu DNA Replikasyonu (Konservatif): Burada 2 yeni zincir ana zincirden oluşur ve sonra yeni zincirler bir araya gelirken, atasal zincirler tekrar birleşir ve orijinal sarmal bu şekilde korunur (Şekil 38).

3. Karışık(Parçalı) DNA Replikasyonu (Dispersif Replikasyon): Bu modelde atasal zincirler kopyalama esnasında kırılır ve kırılan DNA parçaları 2 yeni çift zincir içinde dağılır. Böylece her bir zincirde hem eski hem yeni DNA bulunur (Şekil 38).



Şekil 38. DNA Replikasyonu için İleri Sürülen 3 Model

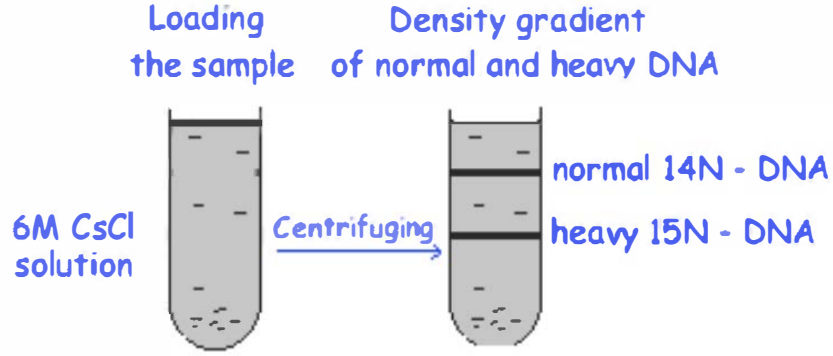
(http://jimmyspark-sbi4u.blogspot.com.tr/2011_10_01_archive.html, 2016)

DNA Sentezi Semikonservatiftir

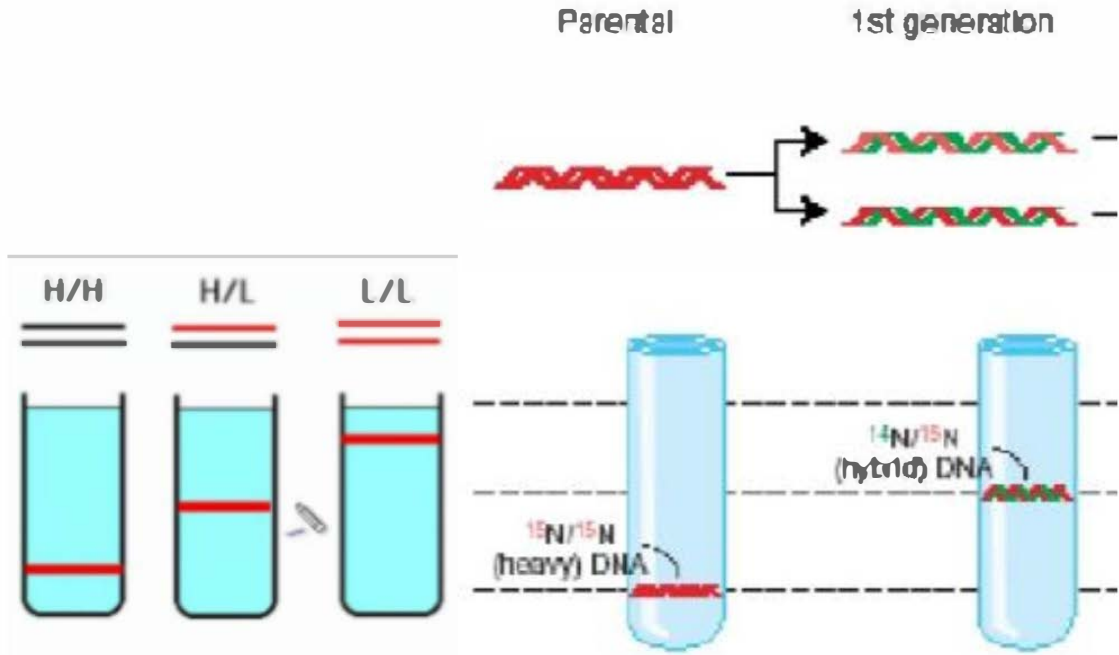
1957 yılında M.Meselson ve F.Stahl isimli iki bilim adamı bir deneyle DNA replikasyonunun yarı korunumlu (semi konservatif) olduğunu ispatlamışlardır. Bu bilim adamları ^{14}N yani normal azotlu ortamda ve ^{15}N ağır azot içeren ortamda *E.coli* hücrelerini üretmişler. Daha sonra DNA'yı ayrı ayrı izole etmişler. Birbirine karıştırdıktan sonra sezyum klorid çözeltisi içeren tüp içerisine koyarak yüksek devirde uzun süre çökelme (denge) sentrifüjü ile sentrifüj edilmiş ve iki DNA'nın birbirinden ayrıldığını görmüşlerdir. Normal DNA'da bulunan ^{14}N hafif olduğundan üstte, ^{15}N ağır olduğundan dolayı altta band oluşturmuştur (Şekil 39).

Bu araştırmacılar *E.coli* hücresine birkaç nesil boyunca ^{15}N ağır azot içeren NH_4Cl 'lü ortamda ve bu ağır azotun DNA'daki bazların içine girmesi sağlanmıştır. Böylece nesiller boyu sentezlenen DNA ağır azot ortamından alınıp, normal azot yani ^{14}N bulunan ortama alınmış ve hücrelerin 1 defa (1 nesil) bölünmesine izin verilmiştir. Bu ortamdaki *E.coli* hücrelerinden DNA'yı izole etmişler ve sezyum klorid sentrifüjlediklerin-

de hafif ve ağır DNA arasında hibrit bir DNA ($^{14}\text{N}/^{15}\text{N}$) olduğunu görmüşlerdir (Şekil 40).



Şekil 39. Normal ve Ağır Azotlu DNA'nın Yoğunluk Dönüşümü
(<http://www.rothamsted.ac.uk/notebook/messtal.htm>, 2012)



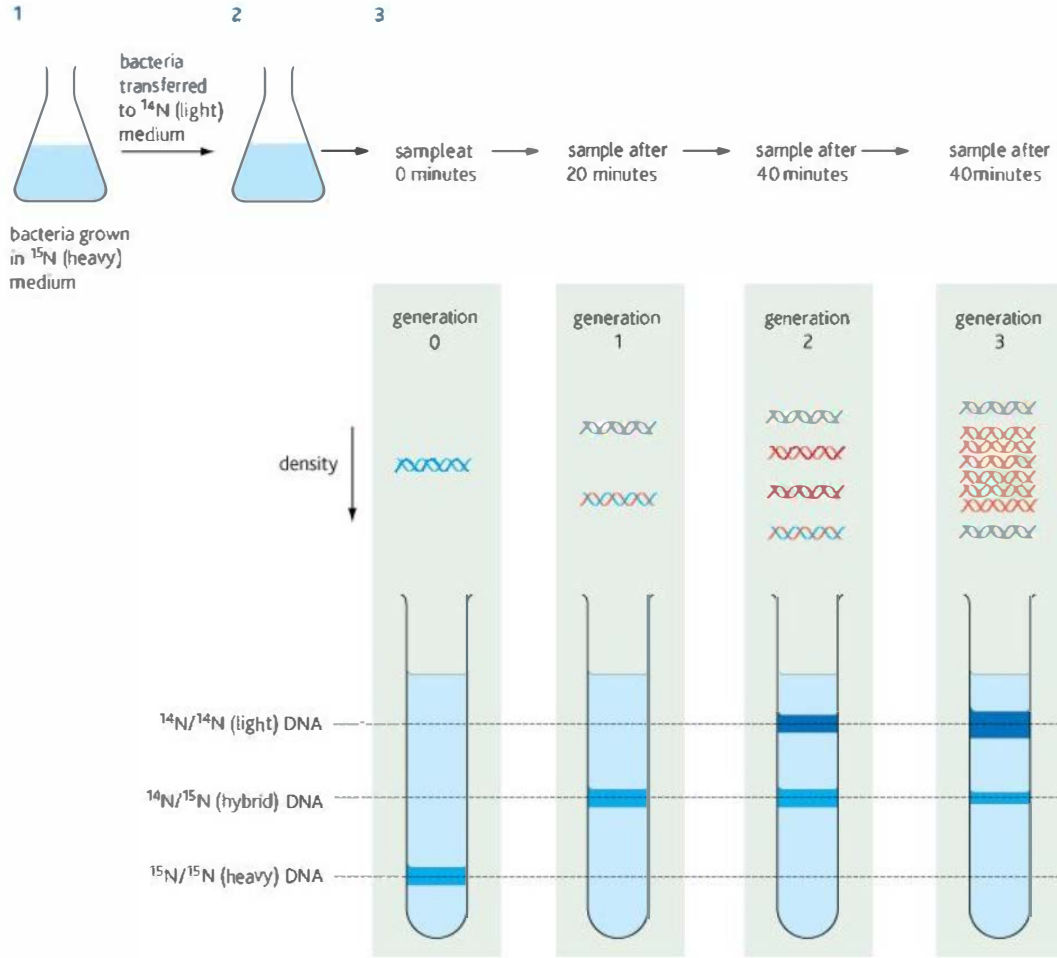
Şekil 40. Hibrit DNA

(<http://www.slideshare.net/iqbalfrestry/dna-replication-12727518>, 2017)

Daha sonra bir kaç kez ^{14}N 'lü ortamda bir kaç nesil boyunca üretmişler ve sonucu aynı görmüşlerdir. Bu iki bilim adamı 1. ve 2. nesildeki DNA'ların verdiği bantlara göre hücre bölünmesi sırasında

DNA'nın 1. sarmalının atasal DNA'dan geldiğini ve 2. sarmalın ise yeni sentezlendiğini ve DNA replikasyonunun yarı korunumlu (semi konser-vatif) olduğunu ispatlamışlardır (Şekil 41).

Meselson ve Stahl Deneyi:



Şekil 41. Meselson ve Stahl Deney Aşamaları

(<https://y12hb.wordpress.com/2013/03/27/dna-replication-the-semi-conservative-method/>, 2013)

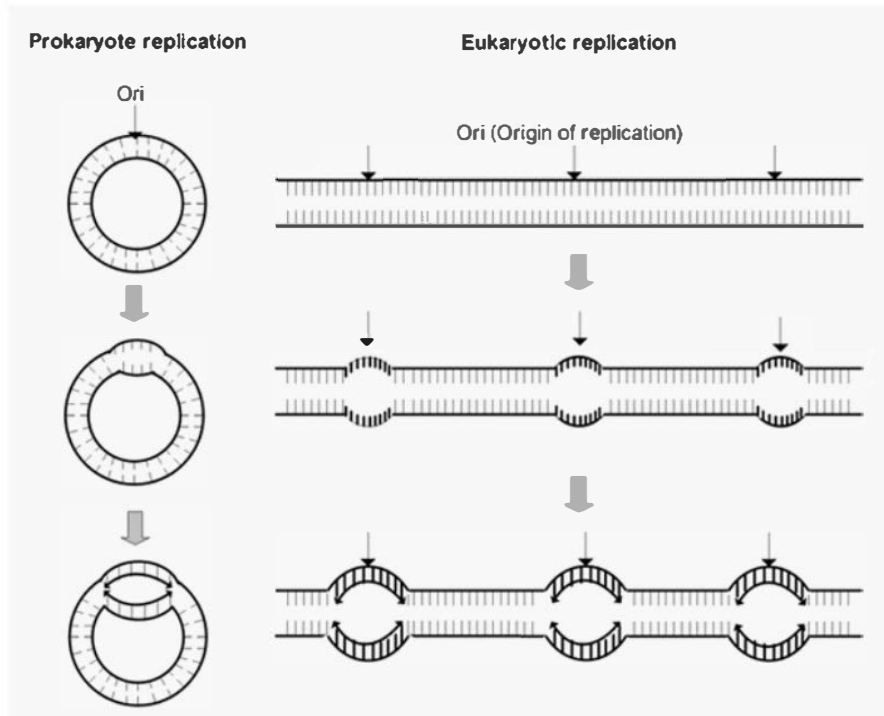
DNA REPLİKASYON ORİJİNLERİ

DNA biosentezine replikasyon (eşleme) denilmektedir. Genetik bilgiyi taşıyan DNA, bu bilgileri replikasyonla aktarabilmektedir. Replikasyon orijini replikasyonun başlangıç noktasıdır, AT baz çiftlerinin zengin olduğu bir bölgedir. Çünkü 2 H bağı olduğu için daha çabuk kırılır.

Bu bölgeye replikasyonu başlatıcı proteinler bağlanır. Bu proteinlerin başlangıç noktalarına bağlanması ile replikasyon başlamış olmaktadır.

DNA replikasyonun meydana geldiği genom birimine replikon denir. Replikon, bir başlangıç noktası (orijin) ve olayın sona erdiği bir bitiş noktası (terminus) içermektedir. Prokaryotlarda çembersel DNA'da bir başlangıç ve bir bitiş noktası yani prokaryotlarda tek bir orijin noktası (Şekil 42), ökaryotik hücrede ise çok sayıda başlangıç ve bitiş noktaları vardır (Çoklu replikasyon orijini; mayada 250-400, memelilerde 25.000'den fazla replikon) yani binlerce orijin noktası vardır (Şekil 42). *E.coli*'de orijin adı ori C (245 baz çifti uzunluğundadır)'dır, bir ökaryot olan mayada ise replikasyon orijinine ARS denilmektedir.

İnsan DNA'sı 2 metre uzunluğunda olduğundan tek orijin olsa idi replikasyon 2 ayda tamamlanırdı. Hücre ise 24 saatte bölünmekte ve DNA sentezinin yapıldığı S fazı ise 8 saat sürmektedir. Dolayısıyla DNA binlerce replikasyon orijininden başlayarak replikasyonunu 8 saatte tamamlamaktadır.



Şekil 42. Prokaryotik ve Ökaryotik Replikasyon Orijin Noktaları

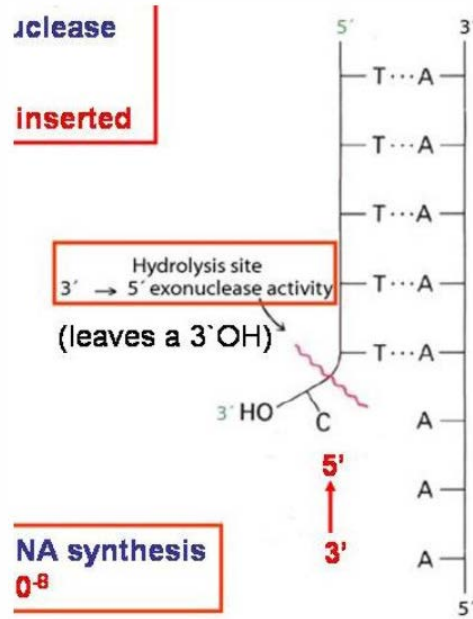
(<http://medicinembbs.blogspot.com.tr/2014/02/multiple-origins-of-replication-dna.html>, 2014)

REPLİKASYONDA GÖREV ALAN ENZİMLER

Prokaryotik DNA polimerazlar

1955 yılında A. Kornberg ve arkadaşları *E.coli*'de DNA sentezini yöneten enzimi bulmuşlardır ve buldukları enzime DNA polimeraz I adını vermişlerdir. Kısaca DNA pol I denir. Bu enzim aktif merkezinde çinko atomu (Zn^{+2}) içermekte ayrıca enzim aktivite gösterebilmek için magnezyum iyonlarına (Mg^{+2}) gerek duymakta. Enzim aktivitesi için bir primer bir de kalıp zincire gereksinim duyar. DNA pol I, dNTP fosfatları adım adım DNA zincirine katmaktadır, yani polimerizasyon olayını gerçekleştirmektedir. DNA sentezinde, sentezin yönü 5' den 3' e doğrudur (5'→3'). DNA polimeraz, polimerizasyon yanında zincirdeki yanlış bağlanmış baz çiftlerini tanımakta ve bu yanlışları düzeltme görevi de bulunmaktadır. Bunu iki şekilde yapmaktadır:

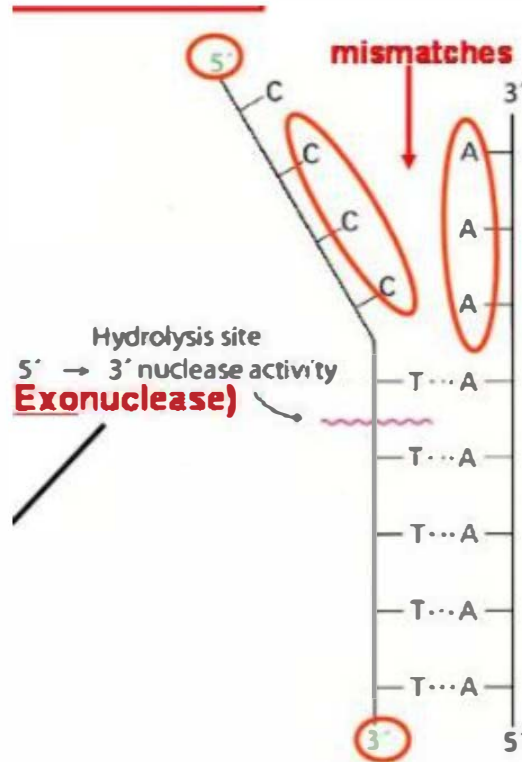
1. 3'→5' eksonükleaz aktivitesi: Hatalı baz var ise kırılacak bağ DNA'nın 3' ucunda tek sarmallı bölgede gerçekleşir. Hatalı baz çıkarılmakta ve aynı enzim polimeraz aktivitesi göstererek doğru olan bazı yerleştirmektedir (Şekil 43).



Şekil 43. 3'→5' Eksonükleaz Aktivitesi

(<http://cbc.arizona.edu/classes/bioc461/Chapter28Notes.pdf>, 2016)

2. 5'→3' eksonükleaz aktivitesi: Hatalı baz var ise kırılacak bağ DNA'nın 5' ucunda çift sarmalı bölgesinde gerçekleşmektedir. Hatalı baz çıkarılmakta ve aynı enzim polimeaz aktivitesi göstererek doğru olan bazı yerleştirmektedir (Şekil 44).



Şekil 44. 5'→3' Eksonükleaz Aktivitesi

(<http://cbc.arizona.edu/classes/bioc461/Chapter28Notes.pdf>, 2016)

DNA pol I'in keşfinden sonra farklı bilim adamlarınca DNA Pol II ve III keşfedilmiştir.

Prokaryotik DNA polimerazların genel karakteristik özellikleri tablo 3'de verilmiştir.

Tablo 3. Prokaryotik DNA polimerazların genel karakteristik özellikleri

Enzim	Polimerizasyon 5'→3'	5'→3' eksonük- leaz aktivitesi	3'→5' ekso- nükleaz aktivitesi	Dakikada DNA zincirine kattığı nükleotid sayısı
DNA Pol I	+	+	+	100 tane
DNA Pol II	+	-	+	30 tane
DNA Pol III (ana polimerizasyon enzimi)	+	-	+	9000 tane

+: Var, -: Yok

Ökaryotik DNA Polimerazlar

Ökaryotik DNA polimerazlar 5 tanedir. Bunlar alfa, beta, gama, delta, epsilon (α , β , γ , δ , ϵ)'dur. Bunlardan ilk 4'ü ökaryotik hücrelerdeki DNA sentezi ve tamirinden sorumludur, γ (gama) ise mitokondride bulunmakta ve mitokondrinin DNA sentezi ve tamirinden sorumludur (Tablo 4).

Tablo 4. Ökaryotik DNA polimerazların genel karakteristik özellikleri

Tipi	Yerleşim	Polimerizasyon 5'→3'	5'→3' eksonük- leaz aktivitesi	3'→5' eksonük- leaz aktivitesi	Görevi
α (alfa)	nükleus	+	-	-	sentezin başlama- sında
β (beta)	nükleus	+	-	-	DNA uzaması ve onarımında
γ (gama)	mitokondri	+	-	+	mtDNA sentezi ve onarımında
δ (delta)	nükleus	+	-	+	DNA sentezi için ana enzim
ϵ (epsilon)	nükleus	+	-	+	DNA sentezi ve onarımında

+: Var, -: Yok

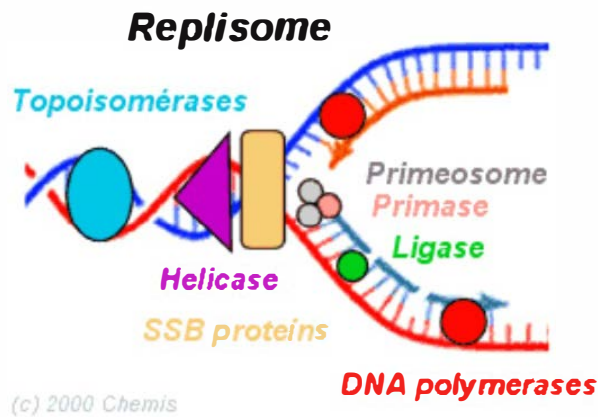
Prokaryotik Hücrelerde DNA Replikasyonu

DNA çift sarmalındaki 2 zincir birbirine antiparalel olarak uzamaktadır. DNA çift sarmalındaki her zincir yeni sentezlenen zinciri için kalıplık görevi yapmaktadır. Bütün DNA polimerazlar sentezi başlatmak için serbest bir 3'OH grubuna ihtiyaç duymaktadır. Yapılan çalışmalarda DNA sentezinin başlayabilmesi için RNA sentezinin esas olduğu anlaşılmıştır. Serbest 3'OH ihtiva eden RNA'nın DNA sentezi için primer olarak kullanıldığı anlaşılmıştır.

DNA Sentezi İçin Gerekli Komplementler (Bileşenler)

- 1-dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 2- DNA polimeraz enzimleri (DNA pol I, II ve III)
- 3- Kalıp DNA zinciri
- 4- Primer (RNA'dan sağlanacak)
- 5- Mg^{2+} (DNA polimeraz aktivitesi için gerekli metal iyonu)

Replikasyonda, DNA polimerazdan başka, herbirinin özel bir görevi olan, 20'den fazla protein gerekmektedir. Tümüne **DNA replikaz sistemi** veya **replizom** denir (Şekil 45).



Şekil 45. Replizom Sistemi

(<https://biotechkhan.wordpress.com/2014/10/10/the-replication-of-circular-dna-in-e-coli/>, 2014)

DNA sentezinde görev alan önemli proteinler

Topoizomerazlar (DNA-giraz): DNA topoizomerazlar replikasyon çatallındaki çözülmeyle çatallın önünde DNA çift sarmaldaki süper kıvrımların açılması-çözülmesinde iş görürler yani süper sarmal yapıyı ortadan kaldırmaktadırlar. Çift sarmalın açılması ile oluşan topolojik gerilim topoizomeraz II (DNA giraz) tarafından dengelenir.

Helikaz (Rep proteini): Bu protein DNA çift sarmalındaki H bağlarını kırıp ikili sarmalın açılmasını sağlar. ATP helikaz aktivitesi için gerekli enerji kaynağı olarak kullanılır.

ssDNA proteini (single-stranded binding proteins=tek zincire bağlanan proteinler): Bu protein açılan tek zincirlerin tekrar baz çifti yapıp birleşmesini önlemek için açılan kısımlara bağlanmaktadır. DNA molekülünün şeker-fosfat omurgası ve bazlarla elektrostatik etkileşimler kurarlar.

Primaz (RNA polimeraz'ın bir tipi): DNA sentezinin başlayabilmesi için gerekli olan kısa RNA primerlerini (RNA öncül molekül) sentezleyen enzimdir.

DNA pol III: Esas replikasyon enzimidir. RNA primerini kullanarak yeni DNA zincirini sentezler. DNA Pol III büyük bir protein kompleksinden oluşan bir holoenzimdir ve ilerleme yeteneği yüksektir.

DNA pol I: RNA primerlerini uzaklaştırır, primerin uzaklaştırırken oluşan boşlukların doldurulmasında görevlidir. İlerleme yeteneği yüksek değildir.

DNA pol II: U.V hasarı nedeniyle oluşan mutasyonların tamirinde görev yapmaktadır.

DNA ligaz: DNA zincirinde, zincirdeki 5' fosfat grubu ile zincirin 3' hidroksil grubu(OH) arasındaki fosfodiester bağının oluşmasını sağlamaktadır. Okazaki fragmentlerini de birleştiren enzimdir.

Replikasyon Mekanizması

Hem prokaryotik hemde ökaryotik hücrelerde replikasyonun temel mekanizmaları aynıdır:

- Replikasyon başlangıç nokta/noktalarının tayini
- DNA çift ipliğinin açılması
- Replikasyon çatalının oluşması

Replikasyon orijinden başlanarak 2 ters istikamete doğru DNA'nın çift sarmalından her birinin tamamlayıcısı ayrı ayrı sentezlenmektedir. Replikasyon çatalı oluşmaya başlayınca proteinler ayrılır. Replikasyon çatalı ise DNA üzerinde replikasyonun olduğu noktada sarmala ait zincirlerin açılmasıyla ortaya çıkan bölgedir.

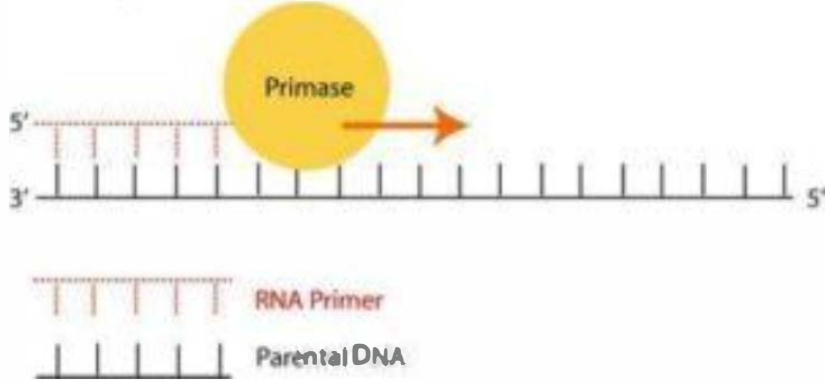
Replikasyon çatalı, replikasyonun meydana geldiği birbirinden ayrılmış kalıp iplikler ile henüz replikasyon geçirmeyen DNA ikili sarmalının bağlantı bölgesine replikasyon çatalı denilmektedir.

Replikasyon çatalındaki çözülmeyle çatalın önünde DNA çift sarmaldaki süper kıvrımların açılması-çözülmesinde yani süper sarmal yapıyı ortadan kaldırılması için replizom yapısına topoizomerazlar katılır. Helikaz enzimi DNA çift sarmalındaki H bağlarını kırıp ikili sarmalın açılmasını sağlar. Açılan zincirlerin tekrar baz çifti yapıp birleşmesini önlemek için ssDNA proteini (single-stranded binding proteins=tek zincire bağlanan proteinler) açılan kısımlara bağlanmaktadır.

DNA sentezinin başlayabilmesi için gerekli olan kısa RNA primeri **primaz** enzimi tarafından sentezlenir. Bu enzim 10-12 nükleotidlik kısa RNA zinciri sentezler ve bu RNA, DNA pol III için kalıp olarak kullanılır (Şekil 46). Çünkü DNA pol III aktivitesi için serbest bir 3'OH grubuna gerek duyar. Bu 3'OH grubu da RNA'dan sağlanır. RNA'nın serbest 3'OH grubu DNA sentezinin başlamasını sağlar. DNA pol III enzimi kalıp zincire uygun olarak nükleotitleri yeni zincire ekler. DNA pol III serbest 3'OH grubu ile dNTP (deoksi Nükleotid Tri Fosfat; dATP, dCTP, dGTP, dTTP)'ın 5' fosfat grubu arasında fosfodiester bağının oluşumunu katalizler (Şekil 47). Bunun için gerekli enerji trifosfattaki 2 P'tan sağlanır

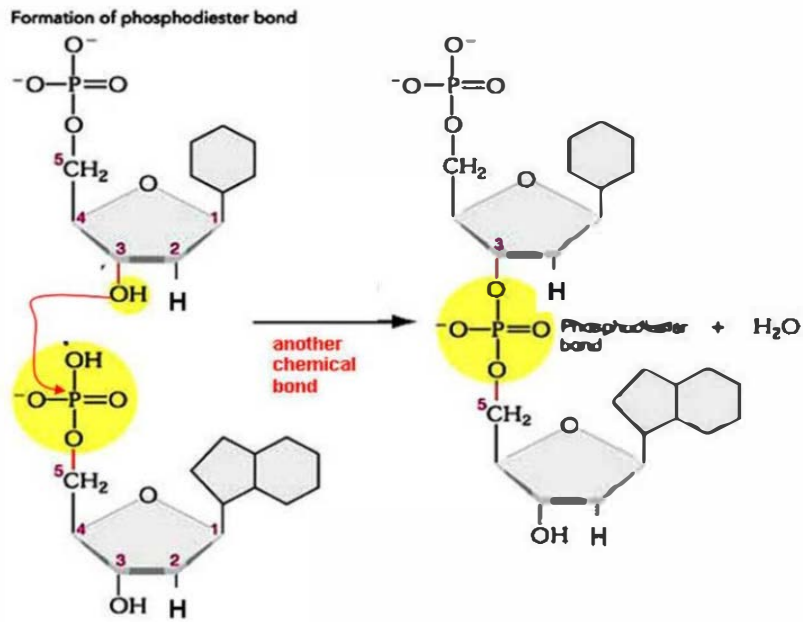
(Şekil 48a). DNA-RNA hibrit kısım DNA pol I enzimi tarafından koparılır. Meydana gelen boşluklar aynı enzim tarafından doldurulur. Ligaz aynı zincirdeki 3'OH ucu ile zincirdeki 5' P ucu arasında fosfodiester bağı kurar ve zincir kapatılmış olur (Şekil 48b).

DNA Synthesis Requires a RNA Primer



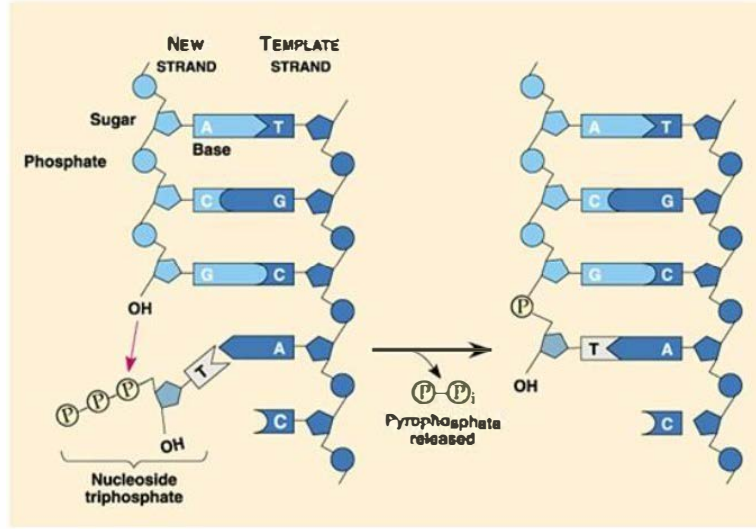
Şekil 46. DNA Sentezi bir RNA Primeri Gerektirir

(<http://www.biologynoteshelp.com/ssbpdna-ligase-dna-polymerase/>, 2017)

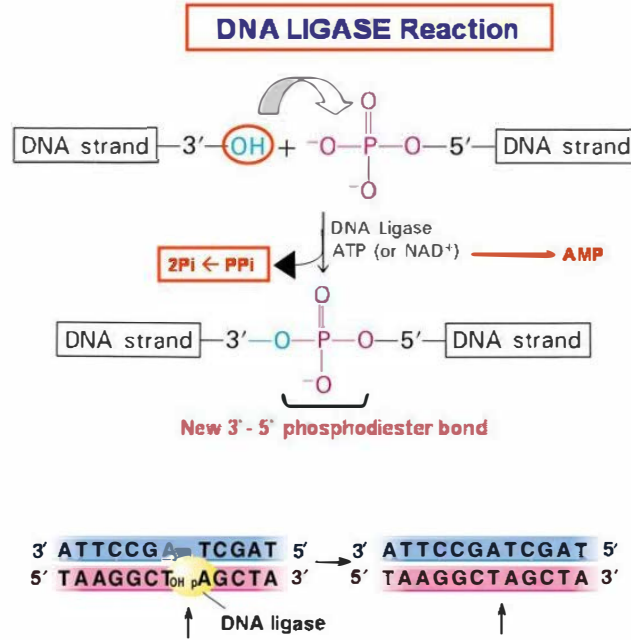


Şekil 47. Fosfodiester Bağının Oluşumu

(<https://www.flickr.com/photos/93472866@N07/8500366658>, 2013)



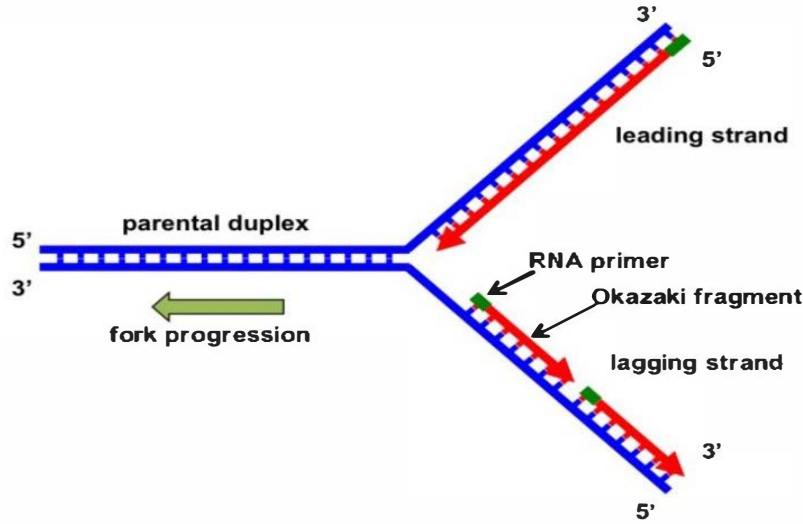
Şekil 48a. Nükleotit Trifosfatların (NTP) Yeni Zincire Katılması
(<http://slideplayer.com/slide/768356/>, 2017)



Şekil 48b. DNA Ligaz Reaksiyonu ve Zincirin Kapatılması
(<https://biology.stackexchange.com/questions/14590/dna-ligase-mechanism>, 2014)
(<https://www.slideshare.net/Shababmeheub/dna-replication-56622894>, 2016)

Replikasyon DNA boyunca her iki yönde meydana gelir ve zincirlerin her ikisi aynı zamanda replike olurlar. DNA iki sarmal (zincirden)

meydana gelmektedir. İki zincir birbirine zıttır (antiparalel). DNA zincirlerinden biri $5' \rightarrow 3'$, diğeri ise $3' \rightarrow 5'$ yönündedir. $3' \rightarrow 5'$ yönündeki zincirin kalıp olarak kullanılması ile yeni sentezlenen zincirin yönü $5' \rightarrow 3'$ olur ve sentez kesintisizdir ve bu zincire lider zincir adı (leading strand) verilmektedir (Şekil 49). Diğer DNA zincirinin yönü ise $5' \rightarrow 3'$ 'dir ve sentezin yönü de $5' \rightarrow 3'$ olduğu için bu durum 1968 yılında Reiji Okazaki ve Tsuneko Okazaki adlı Japon bilim insanları tarafından açıklanmıştır. Zincirde küçük RNA-DNA hibrit polimer parçacıkları bulmuşlar ve bunlara Okazaki parçacıkları (fragmentleri) adını vermiştir. Bu zincirde de sentez aynı şekilde devam etmekte ancak gecikme olduğu için bu zincire de geciken-kesintili zincir (lagging strand) denilmektedir (Şekil 49). DNA ligaz enzimi Okazaki fragmentlerini birleştirir ve sentez bu zincirde de $5' \rightarrow 3'$ yönüne doğru tamamlanmaktadır.



Şekil 49. Replikasyon Çatalı Oluşumu ve Replikasyonun İşleyişi

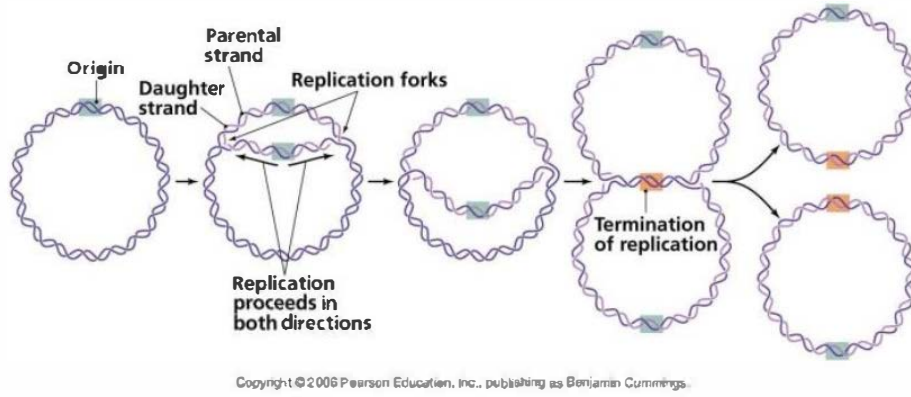
(https://www.researchgate.net/figure/236228957_fig1_The-replication-fork-Leading-strand-synthesis-proceeds-continuously-in-the-5%27-to-3%27, 2017)

Özetle, replikasyon 3 basamakta meydana gelen bir olaydır.

- Başlama: Orijin bölgesinde replikasyon çatalının oluşması
- Uzama: İkili sarmal açılarak kalıp zincire uygun yeni zincir sentezlenir

- Sonlanma: Terminus bölgesinde zincir sentezi tamamlanır

Şekil 50'de bakterideki replikasyon başlangıcı ve sonlanmasını görmektedir.

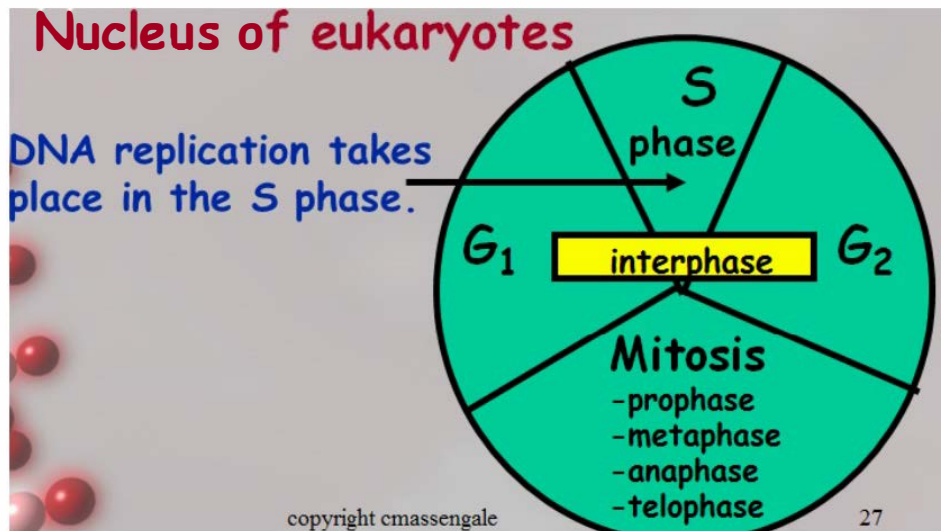


Şekil 50. Bakteriyel DNA Replikasyonu

(<http://pulpbits.net/4-dna-replication-animation/a-bacterial-dna-replication/2006>)

Ökaryotik Hücrelerde Replikasyon

Ökaryotik hücrelerde DNA hücre nükleusunda hücre döngüsünün S (sentez) fazında sentezlenmektedir (Şekil 51).



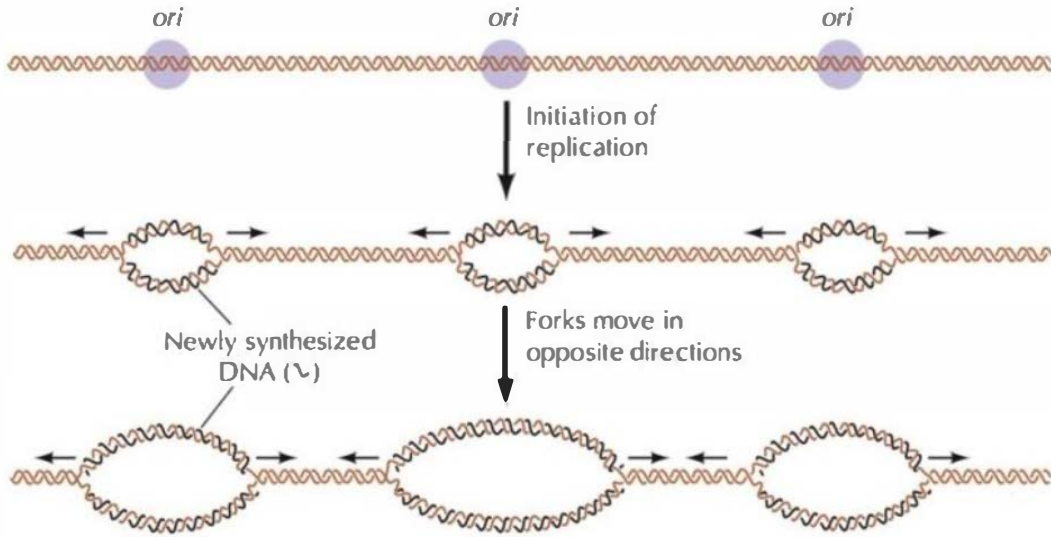
Şekil 51. Ökaryotlarda Nükleusta Replikasyon

(www.biologyjunction.com/DNA%20replication1.ppt, 2017)

Ökaryotlarda replikasyon çok karmaşıktır. Çünkü hücrelerde pek çok kromozom vardır ve her bir kromozomda binlerce orijinden DNA sentezi aynı anda başlamaktadır. Ancak ökaryotik hücrede DNA sentezinin ana basamakları tam olarak bilinmemektedir. DNA polimerazların olduğu, DNA ligazın olduğu ve Okazaki parçacıklarının olduğu ancak bunların boyunun prokaryotlarınkinden kısa olduğu bilinmektedir. Yine buralarda sentez RNA primerlerinden başlamaktadır.

Ökaryotlarda da replikasyon 3 basamakta meydana gelen bir olaydır (Şekil 52).

- Başlama: Orijin bölgesinde replikasyon çatallının oluşması
- Uzama: İkili sarmal açılarak kalıp zincire uygun yeni zincir sentezlenir
- Sonlanma: Terminus bölgesinde zincir sentezi tamamlanır



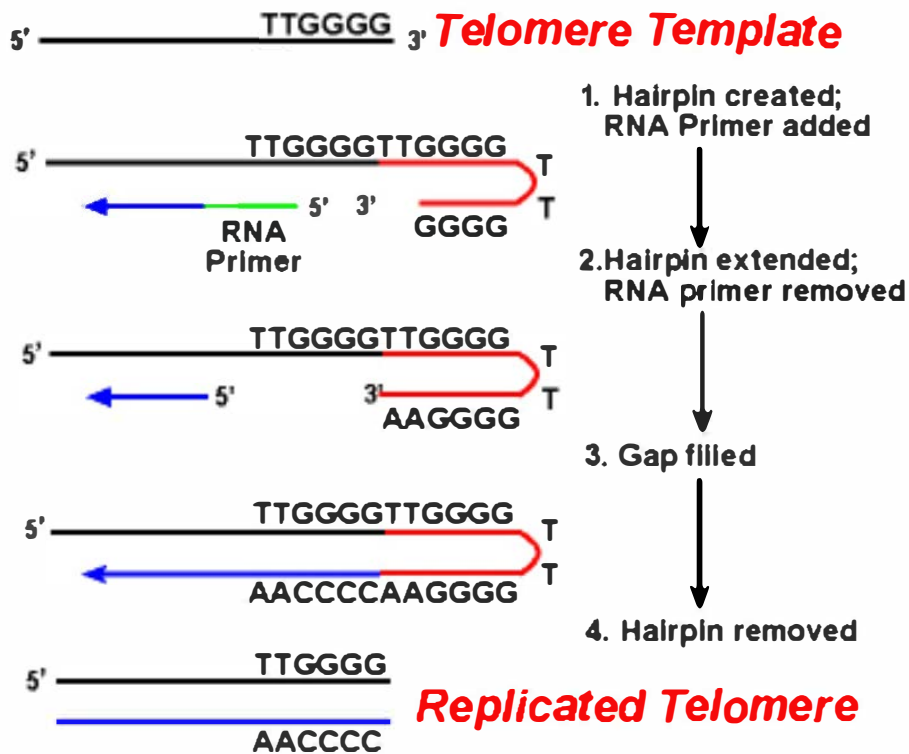
Şekil 52. Ökaryotlarda Replikasyon Binlerce Başlangıç Noktasında (Orijin) başlamaktadır

(http://faculty.samford.edu/~djohns/2/44962w/405/_04dnareplication.html, 2006)

Lineer (Düz) Dna'larda Replikasyon Uç Problemi

Kesintili zincirde RNA primeri uzaklaştırıldığında kromozom ucunda serbest bir 3'OH grubunu sağlayacak bir kalıp zincir olmadığından sentez yapılamamaktadır. Kromozomun telomer bölgesi ökaryotik kromozomların uçlarında bulunan ve herhangi bir kodlama yapmayan bölgeleridir, kromozomu nükleazlara karşı korumaktadır. Kromozom uçlarının birleşmesini önler. Kromozom telomer bölgelerinde her replikasyonda boyu kısalır. Boyun kısalmasını önleyen ise **Telomeraz** enzimidir.

Telomerlerin çoğu 5'-TTGGG-3' dizi ile sonlanmaktadır. Telomeraz her replikasyonda telomerlerin boyunun kısalmasını önlemek için TTGGG tekrar dizilerini kromozomların ucuna eklemektedir. Bu diziler saç tokası şeklinde kıvrılır ve karşı karşıya gelen Guaninler (G) arasında Hidrojen bağı kurulmaktadır. Bu durumda da 3'-OH grubu elde edilir. DNA pol I enzimi bu grubu kullanarak oluşan boşluğu doldurmaktadır. Daha sonra saç tokası kırılır ve DNA kaybı önlenmiş olur (Şekil 53).



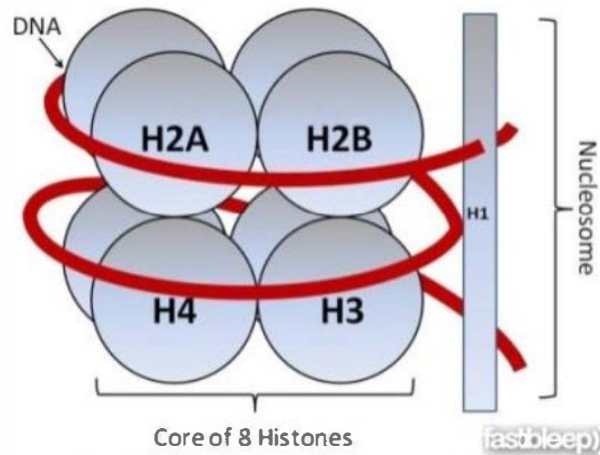
Şekil 53. Düz DNA'da Uç Probleminin Çözümü

(<https://www.nslsu.edu/pubweb/~mcclean/plsc431/eukarychrom/eukary3.htm>, 1997)

HİSTONLAR

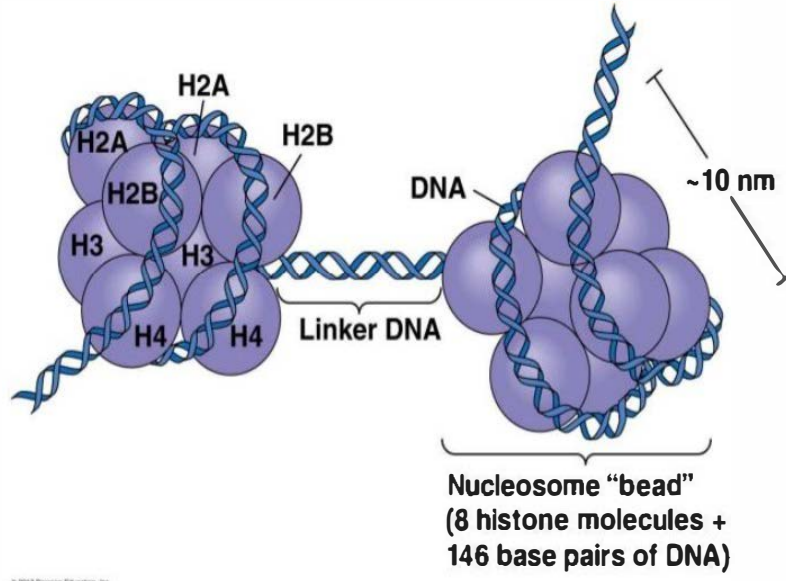
Küçük boydaki bazik proteinlerdir ve DNA'nın asitliğini nötr hale getirmektedir. Bu proteinler orjin ve lizin bakımından zengindir. Çift sarmalı DNA üzerinde bulunan negatifliklerle birleşip, DNA-histon kompleksini oluştururlar. Histonlar, H1 (H5 de denir), H2A, H2B, H3, H4 ve arkeal **histonlar** olmak üzere 6 tiptir.

1974'te R.Kornber 146 veya 200 baz çiftinden meydana gelmiş olan kromatinin çift sarmalı bir DNA ile H_{2A}, H_{2B}, H₃ ve H₄ histonlarının ikiye monomerinin bir araya gelmesiyle oluşan oktomer(8'li) yapının tekrarından olduğunu önermişlerdir. Kromatin boyunca tekrar eden bu ünitelere **nükleozom** denilmektedir (Şekil 54a). İki nükleozom arasında H₁ histonu bulunmakta ve buna 20-50 nükleotidden oluşan çift sarmalı düz bir DNA zinciri bulunmaktadır. Bu düz zincir kromatinin kolaylıkla eğilip bükülmesini sağlar. Kromatin boyunca boncuk tanesi gibi dizilen nükleozomlar ökaryotik hücrede DNA zincirinin boyunun kısalmasını ve iyi paketlenmesini sağlar (Şekil 54b). DNA molekülü oktomer (nükleozom) etrafında iki sefer dolanmaktadır ve DNA molekülünün boyu kısalmaktadır. Nükleozomlar helikal bir yapı oluşturmakta ve DNA boyu ikinci defa 40 misli kısalmaktadır. Helikal yapı luplar yapmakta, bu durum DNA molekülünün kondanase olmasını sağlar ve paketlenen DNA nükleusa sığacak hale gelmektedir (Şekil 54c).



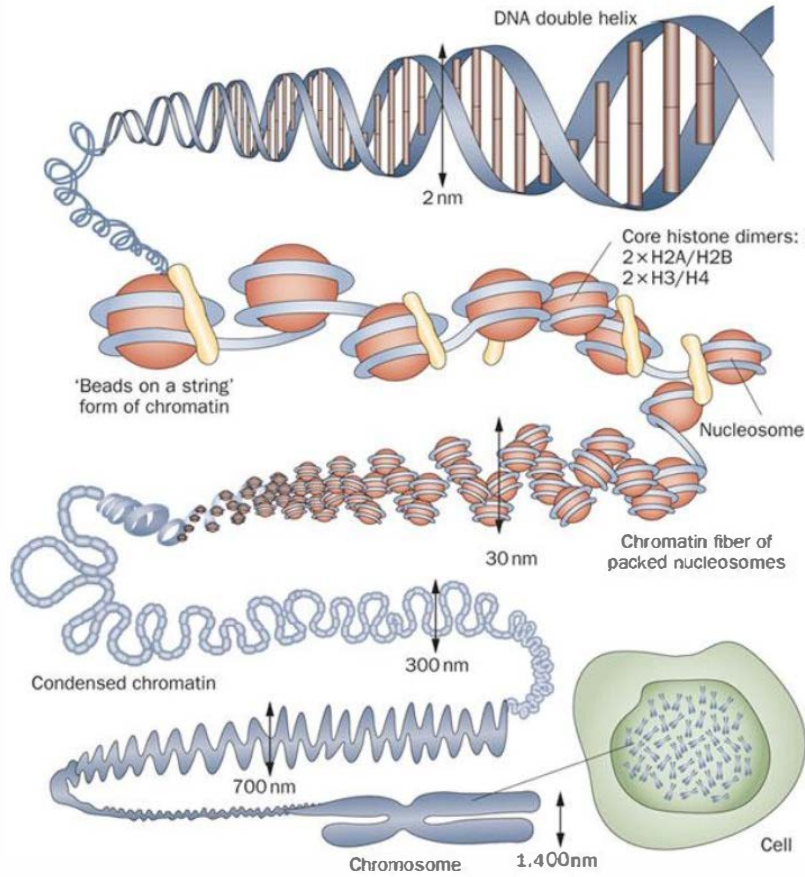
Şekil 54a. Nükleozom Yapısı

(<https://www.fastbleep.com/biology-notes/40/1191>, 2017)



Şekil 54b. DNA Paketlenmesinde Histonların Rolü

(<https://www.slideshare.net/jannatiftikhar/role-of-histone-in-dna-packaging>, 2013)

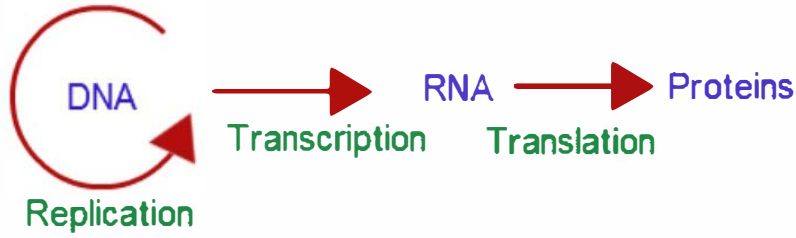


Şekil 54c. DNA'nın Paketlenerek Kromozom Yapısını Oluşturması

(<http://www.ryzhakov.co.uk/immortality-what-we-know-and-what-we-dont>/2012)

VİRÜSLERDE NÜKLEİK ASİTLER

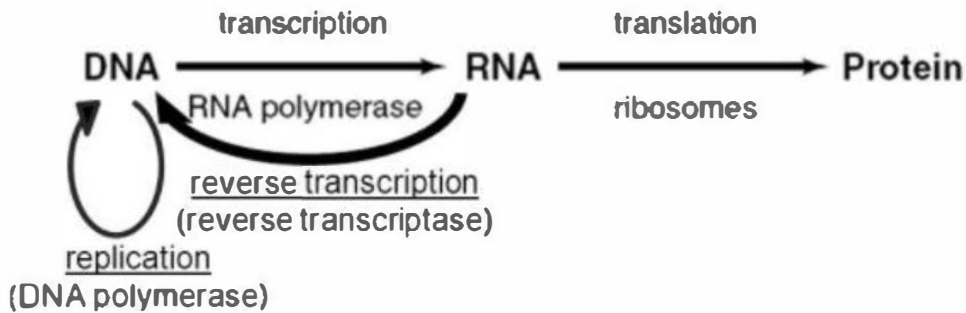
Bütün canlılarda DNA genetik materyaldir ve 1958 yılında Francis Crick hücre içindeki genetik bilginin DNA'dan RNA'ya ve RNA'dan da proteine doğru olduğunu ifade ederek bu olaya **santral dogma** adını vermiştir (Şekil 55). DNA santral dogma:



Şekil 55. Genetik Materyali DNA Olan Organizmalarda Santral Dogma İşleyişi

(<http://biology.tutorvista.com/cell/central-dogma.html>, 2017)

Daha sonraları yapılan araştırmalarda bazı virüslerde genetik materyalin RNA olduğu ortaya çıkmıştır. Böyle virüslere **retrovirüs** denir. Retrovirüsler, Retroviridae virüs ailesine ait olan bütün virüslerdir ve RNA genomu taşıyan zafı virüslerdir. Retroviruslarında, genomik RNA'nın taşıdığı revers transkriptaz enzimi (RNA'ya bağımlı DNA polimeraz) viral RNA'yı çift iplikcikli proviral DNA'ya (pro virus DNA) çevirir (Şekil 56). Reverse Transkriptaz, ters transkripsiyon yapan bir enzimdir, buradaki reverse: ters, Transkript: transkripsiyon demektir ve -az enzim ekidir yani ters transkriptaz anlamındadır. Olgun virus da yaklaşık 10 reverse transkriptaz kopyası mevcuttur ve bunlar pol geni tarafından kodlanmaktadır.



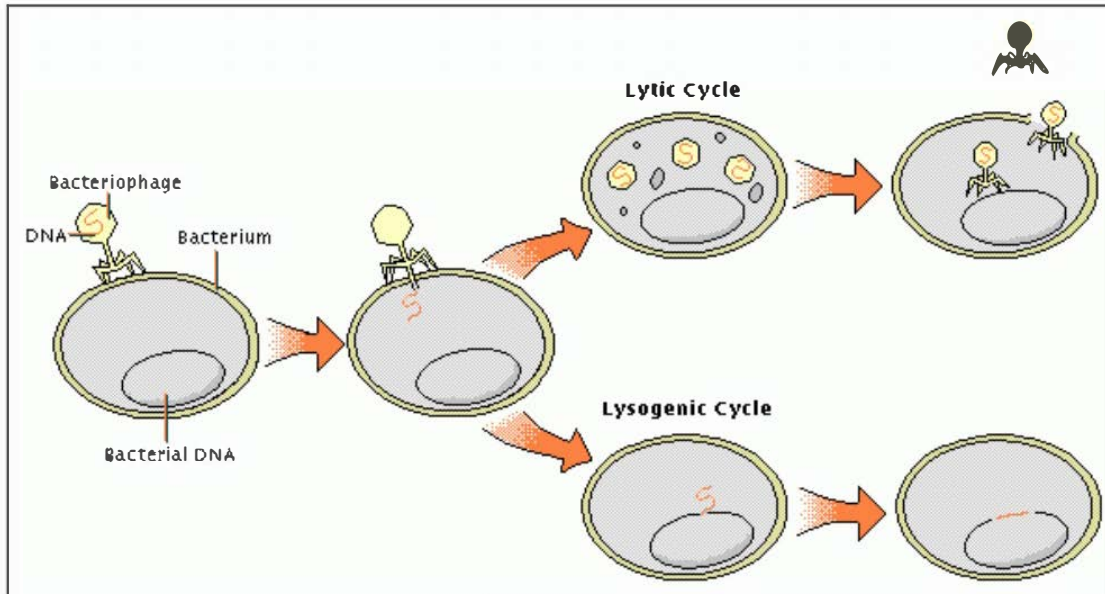
Şekil 56. Genetik Materyali RNA olan Retroviruslerde Santral Dogma İşleyişi

(<http://slideplayer.com/slide/6991190/>, 2017)

1915–1917’de F.Twort ve F.d’Iterelle adlı iki bilim adamı bakterilerin, bazı virüsler tarafından lizis edildiğini (parçalandığını) görmüştür. Bu virüslere bakteri yiyen anlamına gelen bakteriyofaj (faj) adı verilmiş. Fajlar konağa girince 3 yol takip etmektedir. Bunlar;

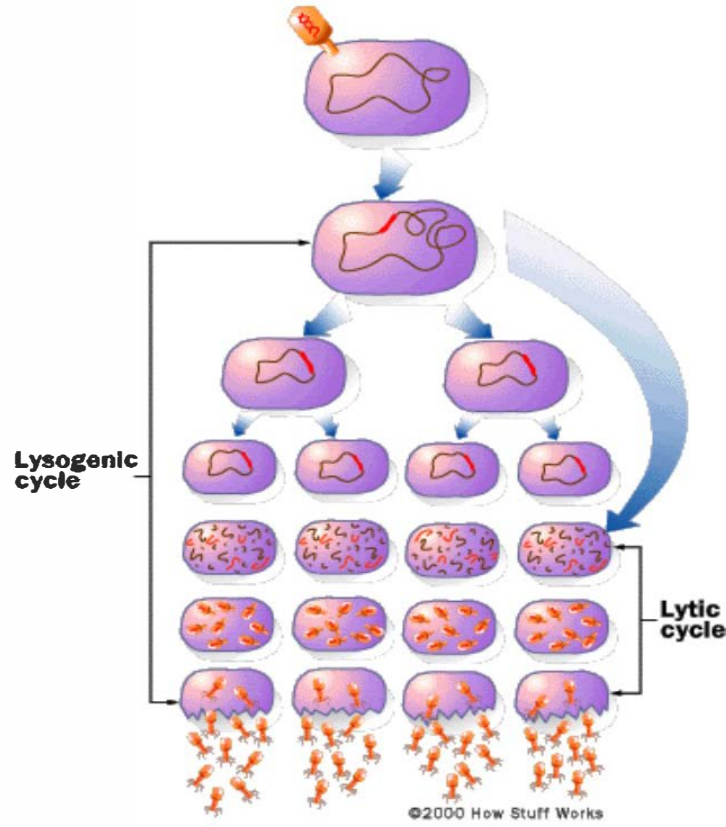
1. Litik Yol: Bu yolda fajlar konakçı bakterilere absorbe (yapışma) olduktan sonra genetik materyallerine hücreleri enjekte ederler. Faj DNA-RNA’sı konağın tüm olanaklarını kullanarak kendini replike eder ve konakta fajlar oluşur. Bunlar hücreyi patlatır ve dışarı çıkar. Buna litik yol denir (Şekil 57).

2. Lizogenik Yol: Fajlar konakçıya girince kendi DNA’sı bakteri genomuna katılır. Bu olaya insersiyon (içeri girme), bu tür fajlara da ılımlı fajlar denilir. ılımlı fajın konakçı genomuna katılmış formuna **pro-faj** denir (Şekil 57). Profajlar, mutejenik ajanlar veya olumsuz çevre koşullarında bakteri genomundan ayrılıp litik yola girer (Şekil 58).



Şekil 57. Fajların Konak Hücredeki Litik ve Lizogenik Yolları

(<https://blogs.unimelb.edu.au/sciencecommunication/2010/11/07/viruses-used-for-good-gene-therapy/>, 2010)



Şekil 58. Faj Genomunun Lizogenik Yoldan Litik Yola Geçişleri
(<http://science.howstuffworks.com/life/cellular-microscopic/virus-human4.htm>, 2017)

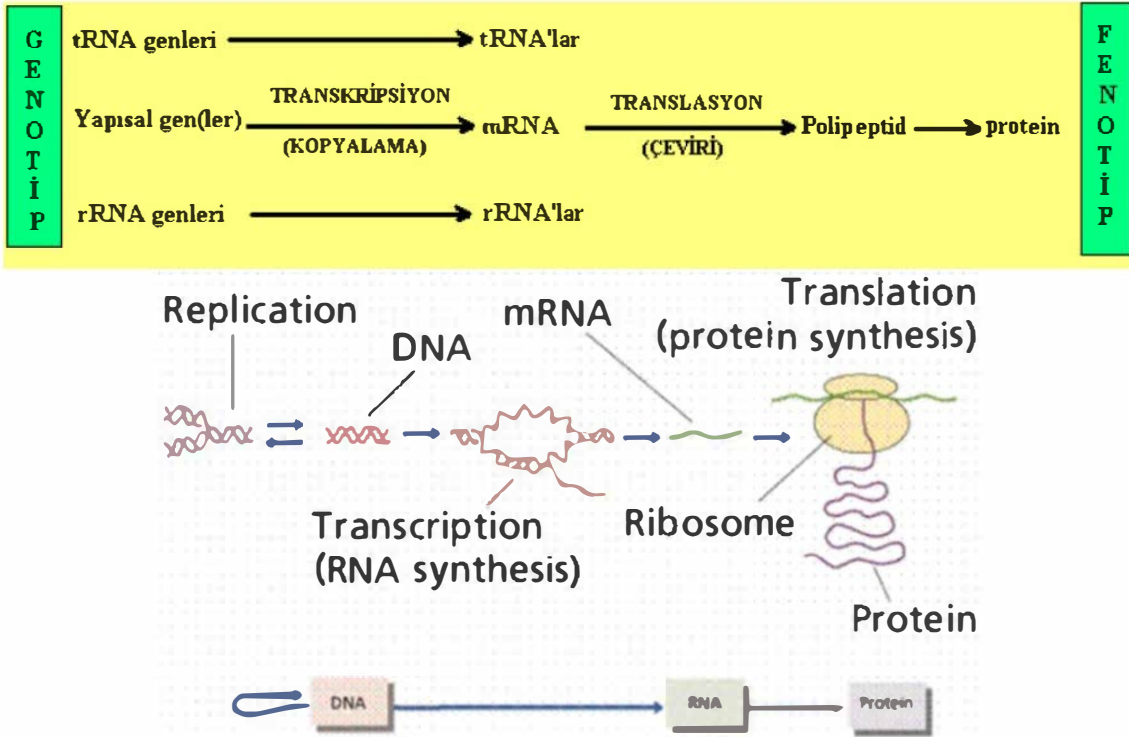
3. Non-litik Yol: Faj bakteriye enjekte edildikten sonra replikasyonu gerçekleştirir. Çok sayıda faj, bakterinin lizise neden almaksızın membranlardan geçerek dış ortama çıkar. Konakçının beslenmesi ve çoğalmasında bozulma olmaz, hücrenin gelişmesi ve bölünmesi yavaşlar.

KISIM 4

PROKARYOT ve ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON

ÖKARYOTLARDA RNA İŞLENMESİ (RNA PROCESSING)

Transkripsiyon, DNA'daki bilginin RNA'ya aktarılmasıdır. Transkripsiyon yoluyla mRNA, tRNA, rRNA ve enzimatik özelliğe sahip RNA molekülleri de sentezlenmektedir. Transkripsiyonda RNA polimeraz enzimi görev yapmaktadır. Genetik bilginin fenotipteki ifadesi transkripsiyon sonrası oluşan mRNA'nın translasyon ile proteine çevrilmesi ile gerçekleşmektedir (Şekil 59).



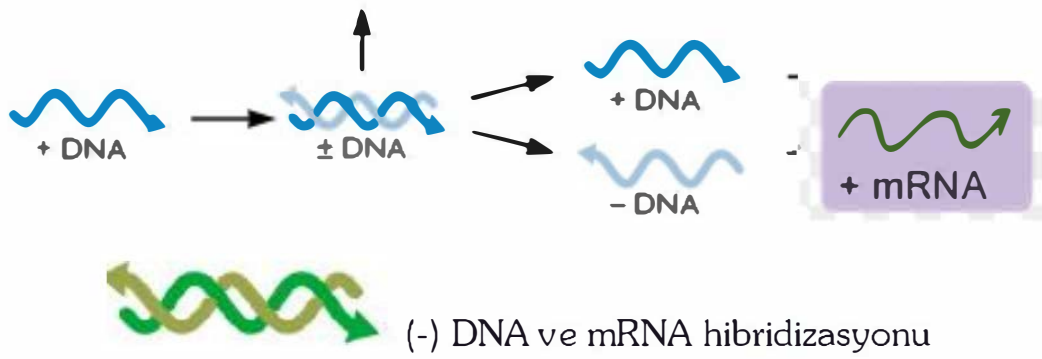
Şekil 59. Gen Anlatımı

(<http://slideplayer.biz.tr/slide/2921381/>, 2017)
(www.pitt.edu/~super7/32011-33001/32771.ppt, 2017)

Transkripsiyon mekanizması DNA replikasyonuna benzerdir. Ancak iki önemli fark vardır;

- Transkripsiyonda replikasyona göre oldukça küçük bir molekül üretilir.
- Transkripsiyonda DNA'nın sadece bir ipliği kopyalanır.

DNA'nın yalnız bir zinciri RNA sentezi için kalıplık görevi yapmaktadır. Bu olayın çözümü uzun yıllar almıştır. QX174 fajı ile enfekte edilen *E.coli* hücresi üzerinde yapılan çalışmalarla bu kanıtlanmıştır. *E.coli*'yi enfekte eden fajın tek sarmallı DNA'sı () buna (+)DNA denilmektedir ve bu DNA hücre içerisine girince kendi komplementini yapmaktadır. Buna da () (-)DNA denilmektedir (Şekil 60). Böyle çift sarmallı DNA'ya **replikatif form(RF)** adı verilmektedir. Daha sonra ortama ^{32}P işaretli Uridin bazı ilave edilmekte ve bu radyoaktif yapıların mRNA'nın yapısına girmesi sağlanır. Daha sonra bu mRNA izole edilir. Aynı zamanda replikatif formdaki (+) ve (-) DNA'lar ile ayrı ayrı hibridizasyonu sağlanır. Sonuçta radyoaktif işaretli mRNA'nın yalnızca (-) DNA ile hibridizasyon yaptığı görülmüştür (Şekil 60). Böylece DNA çift zincirinden yalnız bir tanesinin RNA sentezi için kalıplık görevi yaptığı bulunmuştur.

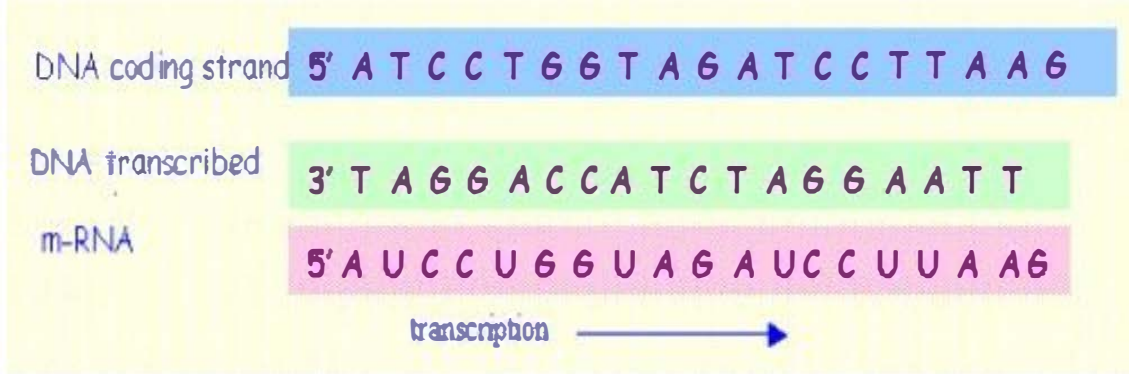


Şekil 60. DNA'nın Tek Zincirinin RNA'ya Kalıplık Yaptığı Deney

Transkripsiyon işleyişi (Şekil 61);

Coding strand: kalıp olmayan zincir, yeni sentezlenen RNA'ya özdeş olan DNA dizisi

Tempate strand: Kalıp zincir



Şekil 61. Transkripsiyon işleyişi

(<http://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/23-transcribe-following-sequence-dna-located-coding-strand-5-acgtacatt-3-5-acguacauu-3-q17693055>, 2017)

PROKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON

RNA'ya kalıplık yapan DNA iplikçığı kalıp iplik olarak adlandırılır. Diğer iplik ise kalıp olmayan iplik olarak bilinir. Sentezlenen RNA'nın nükleotit dizisi (baz dizisi) kalıp olmayan iplikteki nükleotitlerin (bazların) doğrudan kopyasıdır (timin yerini urasil almıştır). Kalıp DNA zinciri 3'→5' yönünde okunarak RNA sentezi gerçekleşir. Dolayısıyla, **RNA sentez yönü 5'→3'** 'dür.

RNA Polimeraz Enzimi (RNA pol)

RNA pol DNA'yı kalıp olarak kullanarak RNA sentezleyen bir enzimdir. *E.coli*'de bütün genler 2α (alfa), β (beta), β' (beta üssü) ve ω (omega) alt ünitelerini içeren tek bir RNA pol enzimi tarafından transkribe edilir (Şekil 62). Bu 5 alt ünitelerden oluşan enzim çekirdek enzim (core enzim) olarak adlandırılır ve inaktiftir. σ (sigma) alt birimi core enzime bağlanır ve 6 birimden oluşan holoenzim yani tam enzim oluşturur ve bu durumda aktiftir. Holoenzimin RNA sentezini başlatabilmesi için DNA üzerinde uygun bir bölgeyi yani promotor'u tanıması gereklidir. Transkripsiyon başladıktan sonra σ alt birimi ayrılır, geriye kalan kısım çekirdek

enzim olarak adlandırılır ve bu çekirdek enzim tek başına RNA zincirinin uzamasını sağlar.

RNA pol enziminin alt birimlerinin görevleri;

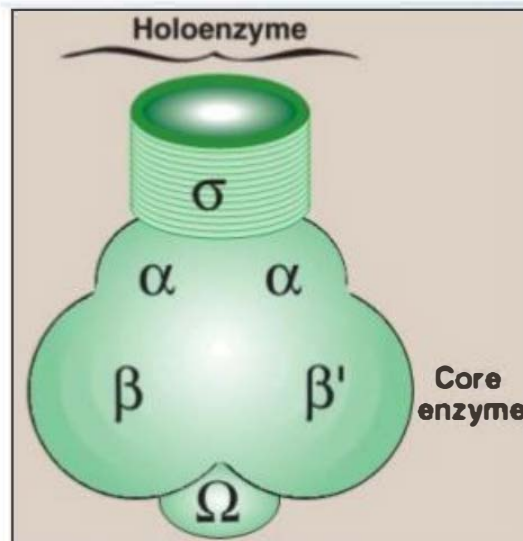
2alfa (2α): Kopyalanacak DNA'yı belirler. İki α alt biriminin biraraya gelmesiyle oluşmaktadır. Bu altbirimlerin karboksil uç bölgesi promotore bağlanırken, amino uç bölgesi polimerazın geri kalan kısmına

Beta (β): RNA'yı sentezler (polimerizasyonu katalizler).

Beta' (β'): DNA kalıbının açılması ve tekrar sarılmasında görev yapmaktadır.

Omega (ω): RNA pol altbirimlerinin biraraya gelmesini sağlar. RNA polimerazı koruyucu göreve sahiptir.

Sigma faktör (σ): RNA pol enziminin promotore bağlanmasını sağlar.



İşş Choudhary Friday, December 19, 2014

Şekil 62. RNA Polimeraz Enziminin Yapısı

(<https://www.slideshare.net/RajeshChaudhary10/transcription-42870819>, 2014)

RNA polimerazın RNA'yı sentezleyebilmesi için ortamda bulunması gereken bileşenler;

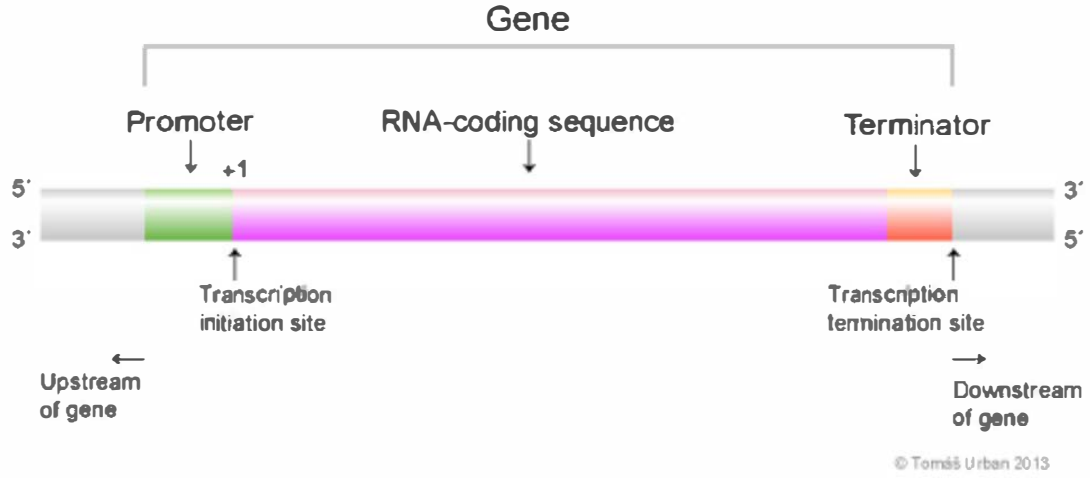
- Kalıp çift sarmallı DNA (Tek sarmallı kullanılır)
- Ribonükleotid trifosfatlar (rNTP): ATP, GTP, CTP, UTP
- Magnezyum (Mg^{+2}) veya mangan (Mn^{+2}) iyonları, enzimin aktivitesi için gereklidir.

RNA pol nükleaz aktivitesinden yoksundur. Bu nedenle bu enzim sentezlenen RNA'daki yanlışlıkları tanıyarak onları düzeltemez. RNA zincirindeki hatalar hücre tarafından tolere edilir. Çünkü bir genden birden fazla mRNA sentezlenir.

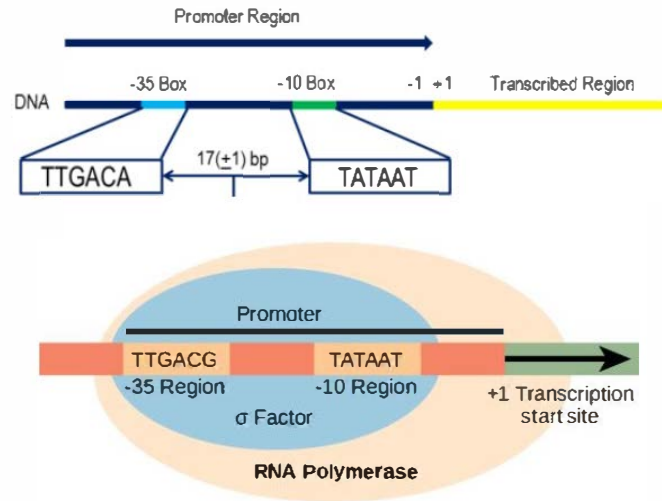
E.coli bakterisi gibi prokaryotlarda RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleşen gen transkripsiyonu 3 aşamada gerçekleşir, Bunlar;

1. Başlama
2. Uzama
3. Sonlanma

1. Transkripsiyon Başlaması: RNA pol DNA ile bağlantılar oluşturabilen büyük bir proteindir. RNA pol ilk önce DNA üzerinde uygun bölgeyi tanımak zorundadır. DNA üzerinde RNA pol'ün bağlandığı bu özel dizilere sahip bölgelere **promotor** denir (Şekil 63a ve 63b). Promotorlar RNA pol'ün bağlanması ve transkripsiyonun başlaması için korunmuş diziler içerir. Prokaryotik promotorlar da transkripsiyonun başlama noktasının birisi yaklaşık 10 baz diğeri ise yaklaşık 35 baz sol tarafta bulunan (upstream) olmak üzere 6 bazdan oluşan oldukça iyi korunmuş 2 önemli bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler -10 ve -35 olarak adlandırılır. -10 bölgesi **pribnow kutusu** (TATA kutusu) olarak da bilinir. Geleneksel olarak kalıp DNA'dan RNA'ya transkribe edilen ilk baz +1 olarak numaralandırılır ve burası transkripsiyon başlama noktası olarak kabul edilir. Transkripsiyon başlaması noktadan önce transkribe edilmeyen bölgelere (-) numara verilir (Şekil 63b).



Şekil 63a. Prokaryotlarda Kodlama Yapan Genin Yapısı
(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vse/print.php?page=307&typ=html, 2017)

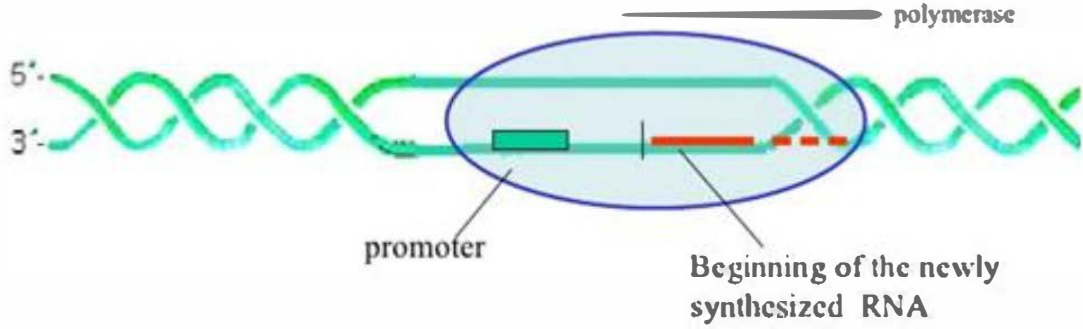


Şekil 63b. Promotorun Bölgesi ve RNA Polimerazın Promotor Bölgesine Bağlanması

(<https://www.oxfordgenetics.com/SiteContent/TeamResources/bacterial-promoter-information>, 2016)

(<http://www.onlinebiologynotes.com/transcription-in-prokaryotes/>, 2017)

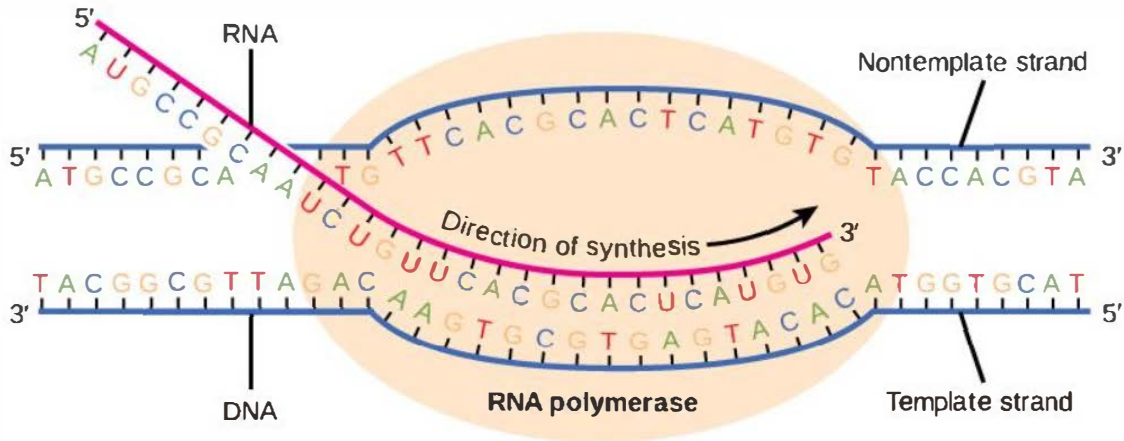
RNA pol enzimi transkripsiyonun başlaması için primere gereksinim duymaz ve promotora bağlandığında transkripsiyon işlemi doğrudan başlar. RNA pol enziminin bağlanması DNA iplikçığının açılmasına ve transkripsiyon kabarcığının oluşmasına neden olur. Yaklaşık 17 bazlık bir bölge açılır (Şekil 64).



Şekil 64. Transkripsiyonun Başlaması

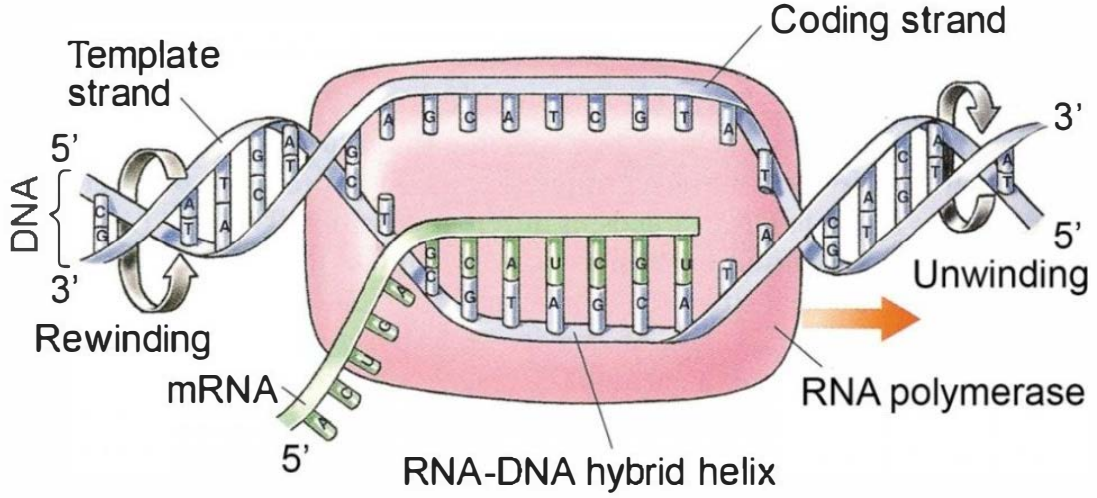
(<https://www.slideshare.net/MUBOSScz/transcription-dna>, 2011)

2. Zincir Uzaması: Sigma faktörü transkripsiyon başladığında RNA pol'den ayrılır. Geriye kalan çekirdek enzim kalıp DNA boyunca ilerleyerek RNA zincirine ribonükleotid ilavesiyle uzatır (Şekil 65a). RNA pol ilerledikçe DNA sarmalını bölgesel olarak açar ve DNA ipliklerini birbirinden ayırır ve kalıp DNA'yı kullanarak RNA sentezine devam eder. Enzimin geçtiği yerlerde sarmal tekrar kapanır (Şekil 65b). RNA pol enzimi *E.coli* de bu işleme saniyede 40 nükleotid ekleyerek yapar. RNA sentezi 5'→3' yönündedir.



Şekil 65a. Transkripsiyonun Uzaması

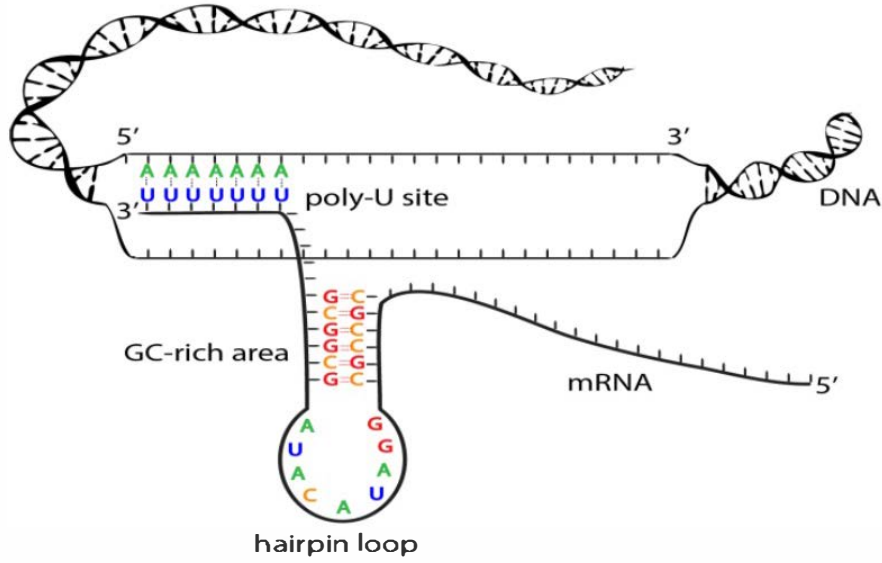
(<https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/prokaryotic-transcription/>, 2017)



Şekil 65b. Transkripsiyonun Uzaması Sırasında DNA zincirinin Açılması ve Kapanması

(<http://keyword.suggest.org/gallery/729472.html>, 2017)

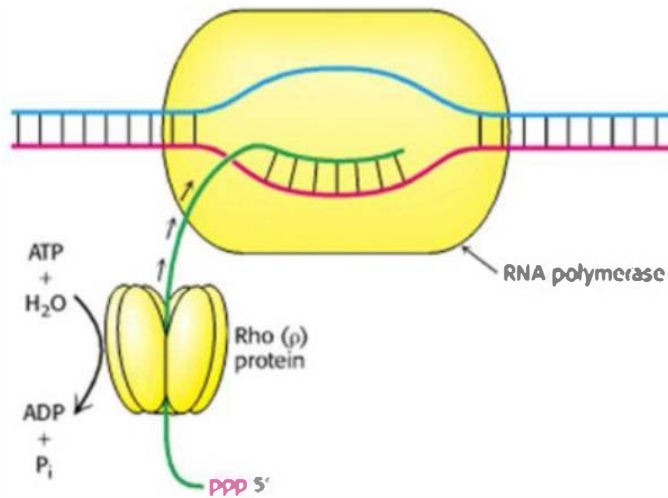
3. Transkripsiyon Sonlanması: Prokaryotlarda RNA zincirinin uzaması RNA pol'ün sonlandırma dizisine (dur sinyali) rastlamasına kadar devam eder. DNA üzerindeki sonlandırma sinyallerinin en yaygını Adenin (A) ve Timince (T) zengin dizisinin takip ettiği Guanin (G) ve Sitozince (C) zengin edilir. Böyle G ve C'ce zengin dizileri içeren DNA bölgesinden sentezlenen RNA'daki G, C bazları kendi arasında eşleşerek RNA'nın saç tokası adı verilen bir yapının oluşturmasına neden olurlar. Bu saç tokası yapısı RNA pol için fiziksel bir stres yaratır, transkripsiyon burada yavaşlar ve durur (Şekil 66).



Şekil 66. Transkripsiyon Saç Tokası Yapısı ile Sonlanması

(https://adapaproject.org/bbk_temp/tikiindex.php?page=Leaf%3A+How+do+cells+terminate+the+process+of+transcription%3F, 2016)

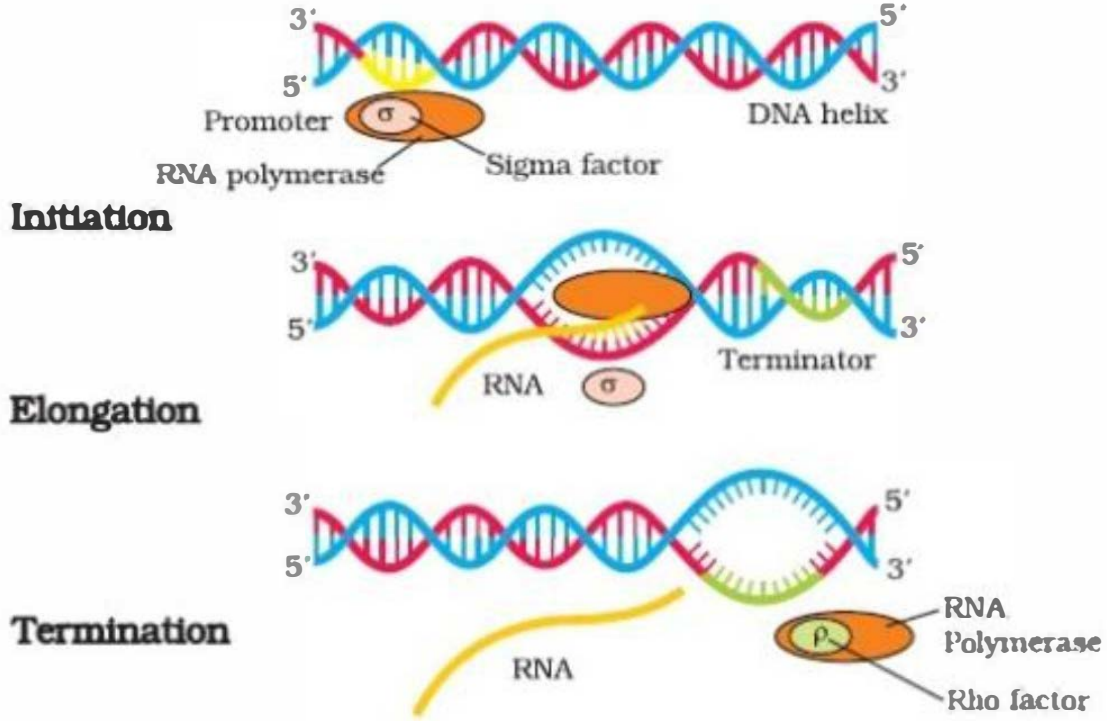
Ancak bütün sonlandırma bölgeleri saç tokası yapısı oluşturmayabilir. Bu durumda RNA sentezinin sonlanması **sonlanma faktörü (rho)** adı verilen spesifik bir protein faktörüne bağlıdır (Şekil 67). Rho faktörü hekzamerik bir proteindir ve sonlanma bölgesinde tek zincirli RNA'ya bağlanarak kalıp DNA'dan ayrılmasını stimüle etmektedir.



Şekil 67. Transkripsiyonun rho Faktörü ile Sonlanması

(<https://biology.stackexchange.com/questions/54470/how-does-rho-dependent-termination-occur>, 2017)

Prokaryotlarda transkripsiyon basamakları şekille özetlenirse (Şekil 68);



Şekil 68. Prokaryotlarda Transkripsiyon Basamakları

(<https://sodiumfactor.wordpress.com/2016/06/22/transcription-dna-to-mrna/>, 2016)

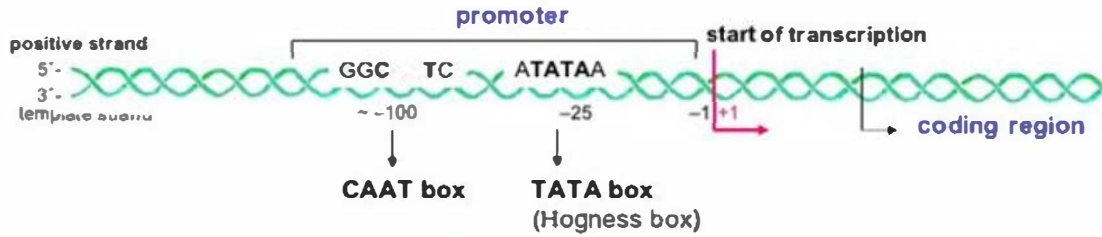
ÖKARYOTLARDA TRANSKRİPSİYON

Ökaryotik ve prokaryotik transkripsiyon mekanizmaları genel yönleriyle birbirine benzerdir. Ancak ökaryotlarda daha karmaşıktır. Ökaryotlarda RNA sentezi farklı RNA pol enzimleri tarafından katalizlenir (Tablo 5).

Tablo 5. Ökaryotlarda RNA Polimeraz Enzimleri

Enzim	Sentezlediği RNA tipi	Bulunduğu yer
RNA Polimeraz I	rRNA	Çekirdekçik
RNA Polimeraz II	mRNA, snRNA	Nükleoplazma (çekirdek sitoplazması)
RNA Polimeraz III	tRNA, 5S rRNA, snRNA	Nükleoplazma
Mitokondri RNA Polimeraz	RNA	Mitokondri

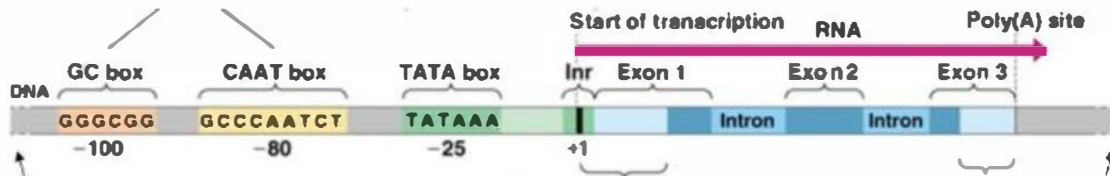
Ökaryotik gen yapısı: DNA üzerinde promotor bölgesinde 'cis element' olarak adlandırılan spesifik kontrol dizileri bulunur (Şekil 69a). Ökaryotlarda polimeraz II'nin etkin bir biçimde transkripsiyonu başlatmasına yardımcı olan en az 3 tane 'cis element' bulunur. Bunlar, TATA, CAAT ve GC kutusudur (Şekil 69a ve b). RNA'ya çevrilecek yapısal gen'de Ekzon (anlamlı baz dizisi) ve İntron (anlamsız baz dizi) bulunmaktadır (Şekil 69 b).



Şekil 69a. Ökaryotik Promotor Bölgesi

(<https://www.slideshare.net/MUBOSScz/transcription-dna>, 2011)

TATA Kutusu (Hognes Kutusu): A ve T'lerden oluşmaktadır, transkripsiyonun başlama noktasından -25 ya da -30 nükleotit çifti yukarıda bulunur. Görevi sarmalın çözülmesini kolaylaştırarak transkripsiyonun başlama noktasını belirlemektir (Şekil 69b).



Şekil 69b. Ökaryotik Gen Yapısı

(<http://slideplayer.com/slide/5750865/>, 2017)

CAAT Kutusu: GGCCAATCT dizilerini içermektedir, promotorun içinde, transkripsiyonun başlama noktasının -80 nükleotit yukarısında yer almaktadır. Görevi, TATA kutusu ile beraber promotorun (RNA polimeraz II'nin bağlandığı bölge) verimli çalışmasını sağlamaktır (Şekil 69b).

GC kutusu: GGGCGG dizilerinden oluşmaktadır. Transkripsiyonun başlama noktasının -80 ya da -100 nükleotit yukarısında yer almaktadır. Görevi SP1 transkripsiyon faktörünü bağlamaktır. GC kutusu daha çok devamlı olarak transkripsiyonu gerekli konstitütif (sürekli) genlerde yer alır (Şekil 69b).

Ökaryotlarda gen transkripsiyonu 3 basamakta gerçekleşmektedir. Bunlar;

1. Başlama
2. Uzama
3. Sonlanma

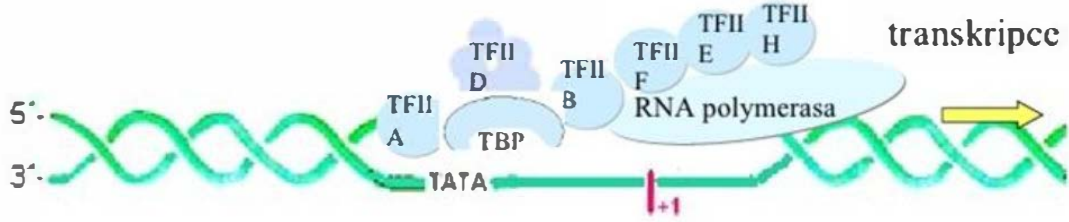
1. Transkripsiyonun Başlaması: Ökaryotlardaki tüm mRNA'ların transkripsiyonundan sorumlu RNA pol II transkripsiyonu kendi başına promotordan transkripsiyonu başlatamaz. RNA pol II'nin transkripsiyonu başlatmasına yardımcı olan DNA üzerinde 'cis-elemen' olarak adlandırılan spesifik kontrol dizileri bulunur. Ökaryotlarda polimeraz II'nin etkin bir biçimde transkripsiyonu başlatmasına yardımcı olan en az 3 tane 'cis element' bulunur. Bunlar, TATA, CAAT ve GC kutusudur.

CAAT ve GC kutuları transkripsiyon faktörlerini kendilerine bağlarlar ve daha çok enhansır (kuvvetlendirici) olarak rol oynarlar. Enhansırlar, DNA üzerine yerleşmiş transkripsiyon hızını arttıran diğer cis-elementlerdir.

Transkripsiyonun başlaması için RNA pol II Genel Transkripsiyon Faktörleri (GTF) adı verilen proteinlerin yardımına ihtiyaç duyar. Transkripsiyon faktörleri olmadan RNA pol II promotora bağlanmaz ve transkripsiyonu başlatamaz. Transkripsiyon faktörleri genel olarak TFII olarak ifade ediliyor, bunlarda TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF, TFIIH..... diye isimlendirilmektedir.

Transkripsiyonun başlamasındaki ilk olay TFIID protein kompleksinin TATA kutusuna bağlanmasıdır. TFIID 10 alt birime sahiptir ve

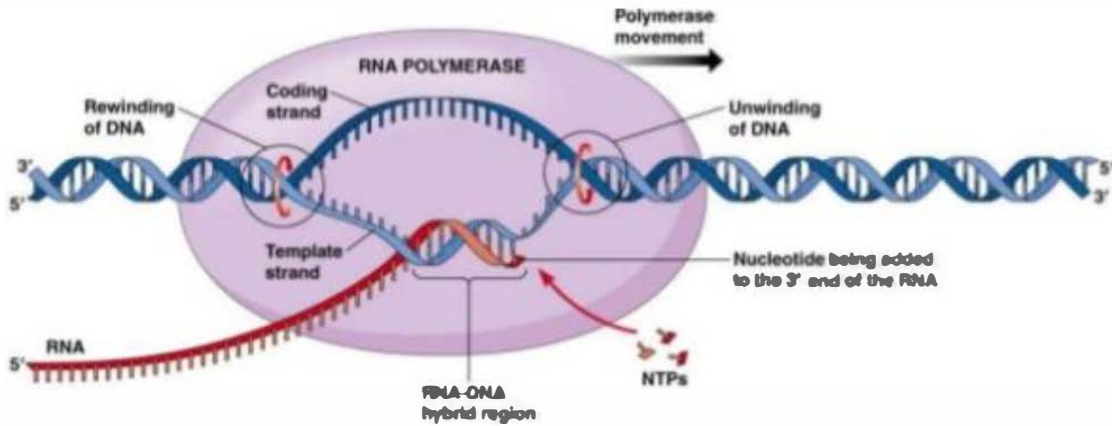
bu alt birimlerden biri TATA-bağlanma proteini (TBP= TATA-box binding protein) olarak adlandırılır. TFIID bağlandıktan sonra en az 7 farklı TFII, TFIID'ye bağlanarak RNA pol'ün promotora bağlanmasını kolaylaştırır. Daha sonra transkripsiyon başlama kompleksi oluşturulur (Şekil 70).



Şekil 70. Transkripsiyon Faktörlerinin ve RNA Pol II Enziminin Promotor Bölgeye bağlanarak Başlama Kompleksi Oluşturmaları

(<https://www.slideshare.net/MUBOSScz/transcription-dna2011>)

2. Zincir Uzaması: Zincirin uzamasında bağlanan nükleotidin 5' fosfat grubu ile RNA zincirindeki 3' hidroksil grubu arasında bir fosfodiester bağı oluşur. Sentez sırasında ortamdaki nükleotid trifosfatlar (NTPler) zincire eklenerek geçici bir DNA-RNA ikilisi oluşur ama sonra RNA DNA'dan ayrılır ve DNA tekrar kapanıp normal çift sarmallı haline geri döner (Şekil 71). RNA zincirinin uzaması sonlanma gerçekleşene kadar bu şekilde devam eder.



Şekil 71. RNA Zincirinin Uzaması

(<https://www.slideshare.net/tanvipatluri/eukaryotic-transcription, 2017>)

3. Sonlanma: RNA polimeraz II genin son kısmında bulunan sonlandırma dizelerini (sonlandırma bölgesi) tanır ve enzim kompleksi kararsız hale gelmekte bu durumda enzim ayrılmakta, oluşan RNA DNA'dan salınmaktadır. Sentezlenen RNA mRNA ise öncül mRNA (pre-mRNA) olarak isimlendirilir. Ökaryotik sonlandırma hakkında henüz detaylı bilgi mevcut değildir.

Prokaryotlardaki durumun aksine ökaryotik öncül mRNA olgun mRNA haline gelmek için RNA yapısal olarak işlenmektedir.

ÖKARYOTLARDA RNA İŞLENMESİ (RNA Processing)

Transkripsiyon sonucu mRNA, tRNA, rRNA gibi çeşitle tipte RNA molekülleri üretilir. Prokaryotik mRNA dışındaki bütün RNA moleküllerinin fonksiyonel olabilmesi için transkripsiyon sonrası işlenmesi gerekir. Ökaryotlarda mRNA, RNA pol II enzimi tarafından **heteronükleolar RNA** (hnRNA) adı verilen bir öncül mRNA'ya çevrilmektedir. RNA işlenmesi öncül RNA'nın olgun RNA'ya dönüştürülmesi işlemidir. Bu işlem sırasıyla;

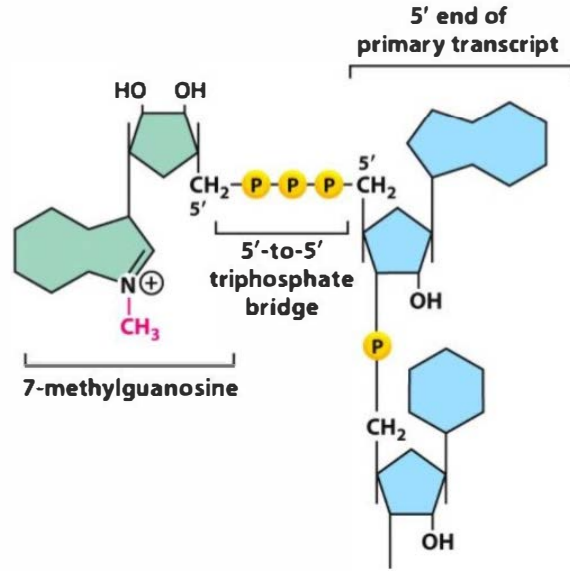
1. mRNA'ya şapka (cap) yapısının takılması
2. Poliadenilasyon
3. RNA splay (Kesip-çıkartma) olaylarını kapsamaktadır.

1. mRNA'ya başlık yapısının ilave edilmesi

Öncül mRNA sentezinden hemen sonra mRNA'nın 5' ucuna 7-metil guanosa takılmasıdır. Bu yapı şapka (cap: kepek yapısı) ya da başlık olarak ifade edilir (Şekil 72). Bu yapı;

- Öncül mRNA'nın 5' ucunun ribonükleazlara karşı korunmasını sağlamaktadır. RNA'yı parçalanmaktan korur.
- Bu yapının olgun mRNA'ların çekirdek zarından hücre sitoplazmasına geçişinde rol oynadığı düşünülmektedir.

- Bu yapı olgun mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını sağladığı düşünülmektedir. Translasyonun başlaması için gereklidir.



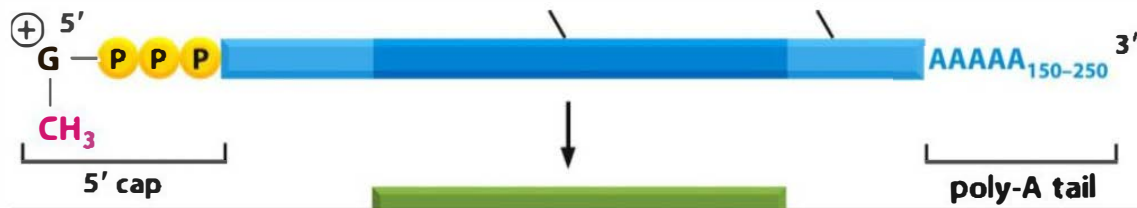
Şekil 72. mRNA'ya Başlık Yapısının İlave Edilmesi

(http://oregonstate.edu/instruction/bi314/fall11/figure_07_16b.jpg, 2010)

Ökaryotik mRNA'ya başlık takılırken; prokaryotik mRNA, ökaryotik RNA ve tRNA'lar başlıksızdır.

2. Poliadenilasyon

Öncül mRNA'nın 5' ucuna başlık yapısı takıldıktan sonra 3' ucunda yaklaşık 150 ve 250 adenin içeren bir poli A kuyruğu takılır (Şekil 73). Bu kuyruk mRNA'nın 3' ucuna ribonükleazlara karşı korumaktadır ve böylece mRNA kararlı hale gelmektedir.

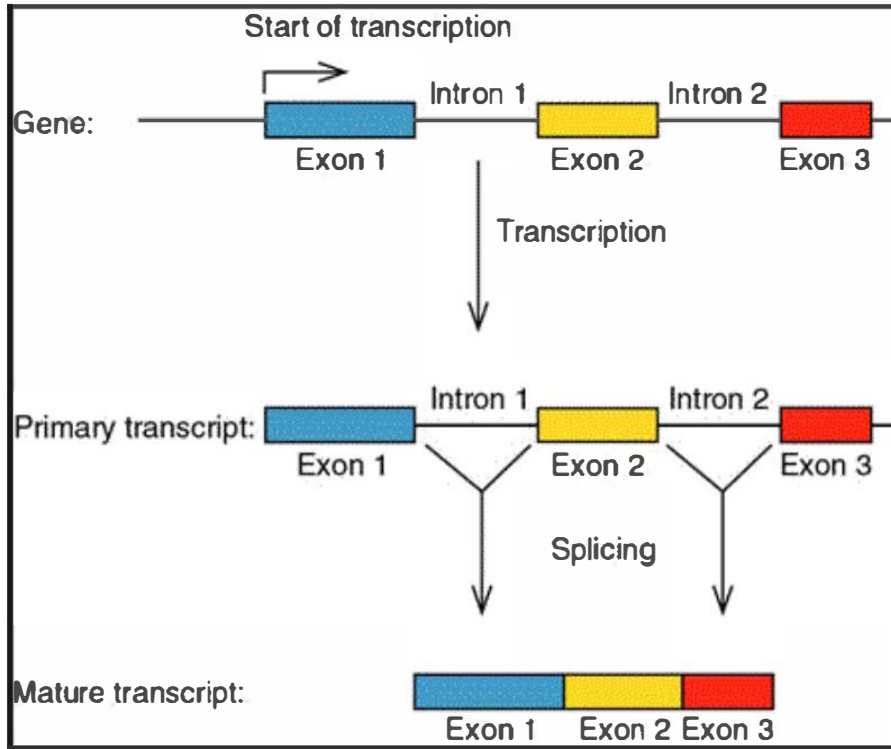


Şekil 73. Poliadenilasyon

(http://oregonstate.edu/instruction/bi314/fall11/figure_07_16b.jpg, 2010)

3. RNA splaying (Kesip-çıkartma)

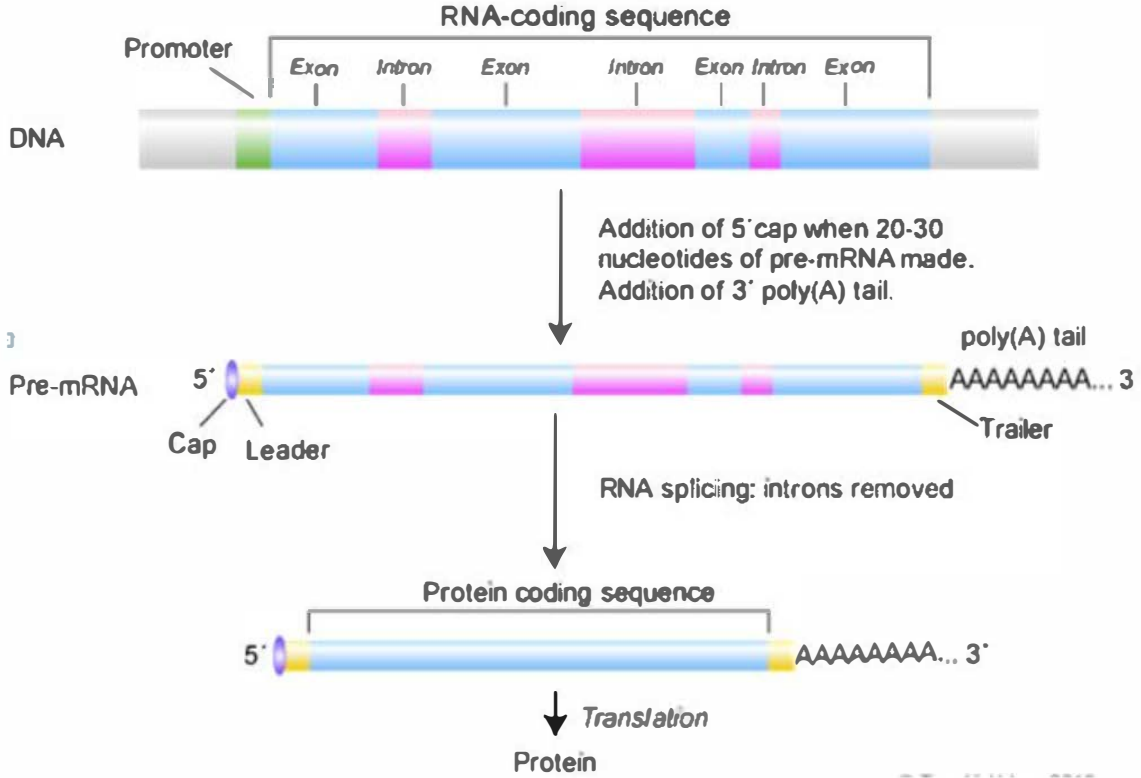
RNA işlenmesinde başlık ve poli A kuyruğunun takılmasından sonraki basamak intronların çıkarılması ve ekzonların birleştirilmesidir (Şekil 74). Bu işlem **RNA splaying (splicing)** olarak adlandırılır. Ökaryotik genlerin birçoğu kodlama yapmayan anlamsız baz dizilerine **intron**, kodlama yapan anlamlı baz dizilerine ise **ekzon** denir. Bu tip ekzon ve intron içeren genlere **parçalı genler (mozaik=split genler)** denir. İtronlar özellikle yapısal genlerde bulunur. Gelişmiş hayvan ve bitkilerde bulunan bir özelliktir. Histon, interferon genleri ve bazı memeli virüs genlerinde intron bulunmaz. tRNA genlerinde çok, rRNA genlerinde azdır.



Şekil 74. İtronların Çıkarılıp Ekzonların Birleştirilmesi

(<http://faculty.uca.edu/johnc/rnaprot1440.htm>, 2017)

Öncül mRNA'nın olgun mRNA haline getirilmesi ile mRNA sitoplazmada ribozomlarda proteine çevrilmektedir (Şekil 75).



Şekil 75. Öncül mRNA'nın Olgun mRNA Haline Getirilmesi
(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/files/26/1183.png, 2013)

İntronların Uzaklaşma Mekanizmaları

Split genlerin bulunuşu RNA'dan intronların çıkarılması ve ekzonların birleştirilmesi mekanizmalarının aydınlatmasını sağlamıştır. Splayz mekanizmalarına göre intronlar 2 kısımda incelenmektedir.

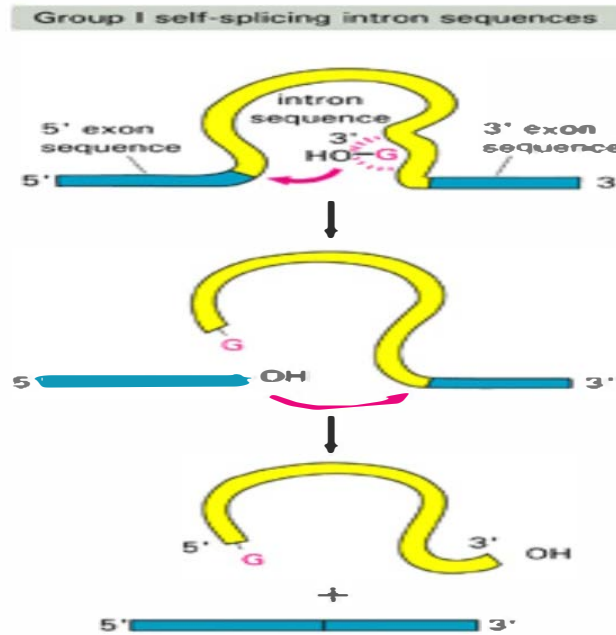
1. Grup I İntronların Çıkarılması

İntronun kendisi çıkarılması için gerekli enzimatik aktivitenin kaynağıdır. 1982'de Thomas Cech ve arkadaşları kendi splayzlarını yapabilen RNA'ların otokatalitik özelliğe sahip olduğunu ifade etmişlerdir ve bunlara **ribozim** adını vermişlerdir. Kendiliğinden kesip-çıkartma (self-splicing) olarak bilinen bu işlemde 2 olay olur (Şekil 76).

- 1- Grup I intronlar bir guanin nükleotid kofaktöre ihtiyaç duymaktadır. Bu enerji kaynağı olarak kullanılmaz. Ortamda bu-

lunan GTP, GDP veya GMP'de kofaktör olarak rol alan Guanozinin 3'-OH grubu intronun 5'-ucundaki bir nükleotide aktarılır. Buradaki fosfodiester bağı kırılır ve G- ve nükleotid arasında olağan dışı bir fosfodiester bağı (5'-2') oluşur.

- 2- 5'ekzonun serbest kalan 3-OH grubu, 3' kırpılma yerindeki fosfodiester bağına atak yaparak onu keser ve intron bir ke-ment şeklinde serbest kalır. Ekzonlar birleşerek olgun mRNA oluşturulur.



Şekil 76. Kendiliğinden Kesip-Çıkartma (Self-Splicing) İşlemleri
(<http://chemistry.umeche.maine.edu/CHY431/Genome2a.html>, 2015)

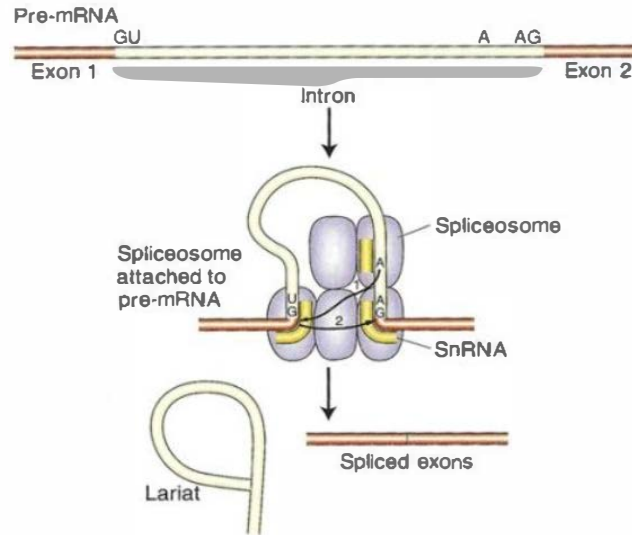
2. Grup II İtronların Çıkarılması

Bu tip intronların çıkarılması oldukça karmaşıktır. Çünkü intronlar çok uzundur ve sayıları fazladır. Bu tip intronların çoğunda 5' ucunda GU ile başlar AG dizisiyle son bulur. İtronlarda bulunan bu diziler kesip çıkartma için gerekli olan özgül molekülleri bu bölgeye çekerler. Splaysom olarak adlandırılan böyle bir molekül kompleksi maya ve insan hücrelerinde rastlanmıştır. Splaysomun özgül molekülü snRNA(küçük

nükleer RNA)'dır. Bu RNA'lar proteinlerle kompleks yaparak snRNPs (küçük nükleer ribonükleoproteinler) oluşturur.

snRNA üridin bakımından zengindir. Üridin birden U6'ya kadar isimlendirilmiştir. snRNP'lerin bazıları intronun 5' ucuna, bazıları 3' ucuna bağlanır ve **kement** yapısını oluşturur ve oluşan bu kement yapı uzaklaştırılır. Daha sonra snRNP'lerin bazı bileşenleri 2 ekzonu birleştirilir. Bu kement yapıya **lariat** da denir (Şekil 77).

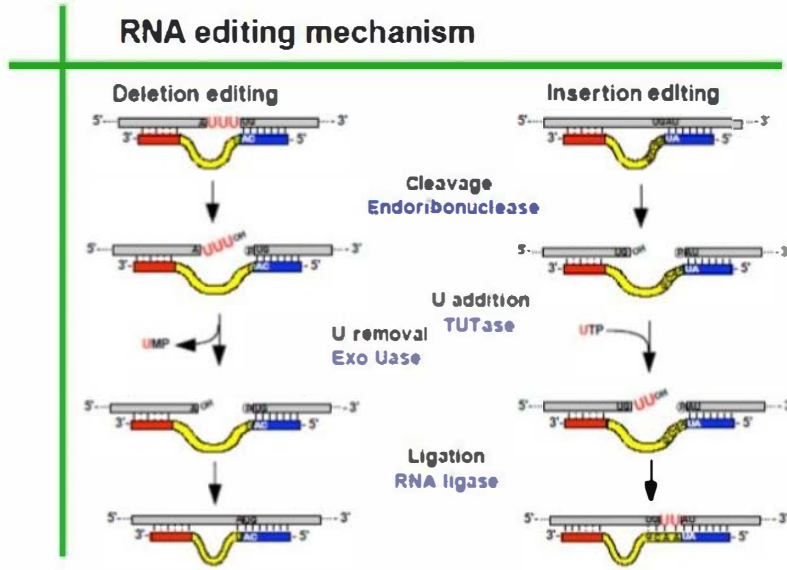
Spliceosome removes introns



Şekil 77. Spliceosom Aracılığı İle İntronların Uzaklaştırılması
(<http://www.discoveryandinnovation.com/BIOL202/notes/lecture12.html>, 2013)

RNA'nın DÜZENLENMESİ (RNA Editing)

RNA'nın düzenlenmesi, bir mRNA molekülündeki nükleotid dizisinin RNA splayzing dışındaki diğer mekanizmalar tarafından değiştirildiği çeşitli reaksiyonlara verilen addır. Omurgasız hayvanlarda daha sık görülür. Bitkilerdeki kloroplast ve mitokondrilerde görülen bir işlemdir. Bu işlemde mRNA'daki mevcut bazlar ile başka RNA bazları yer değiştirebilir, tamamen çıkarılabilirler veya ilave nükleotidler eklenebilir (Şekil 78).



Şekil 78. RNA Düzenlenme Mekanizması

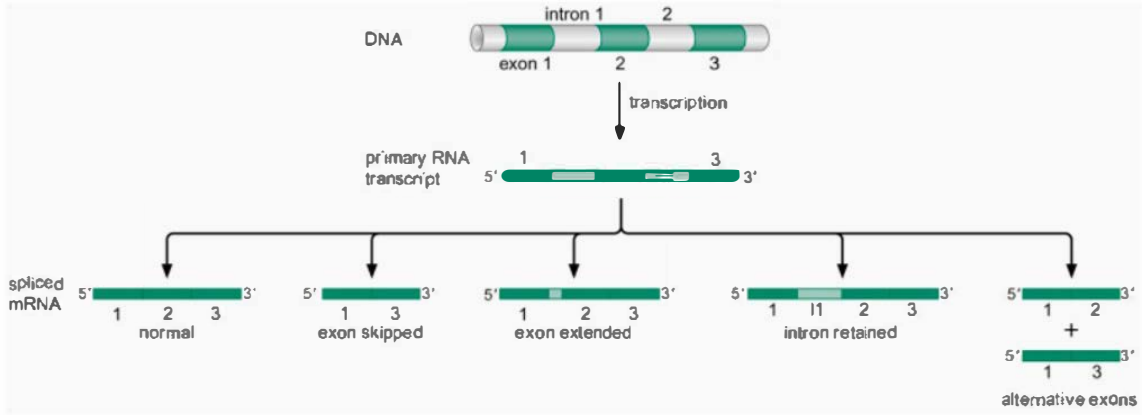
(<https://www.slideshare.net/arjithshome/rna-editing-48644831>, 2017)

ALTERNATİF (Seçenekli-Farklı) SPLAYSİNG

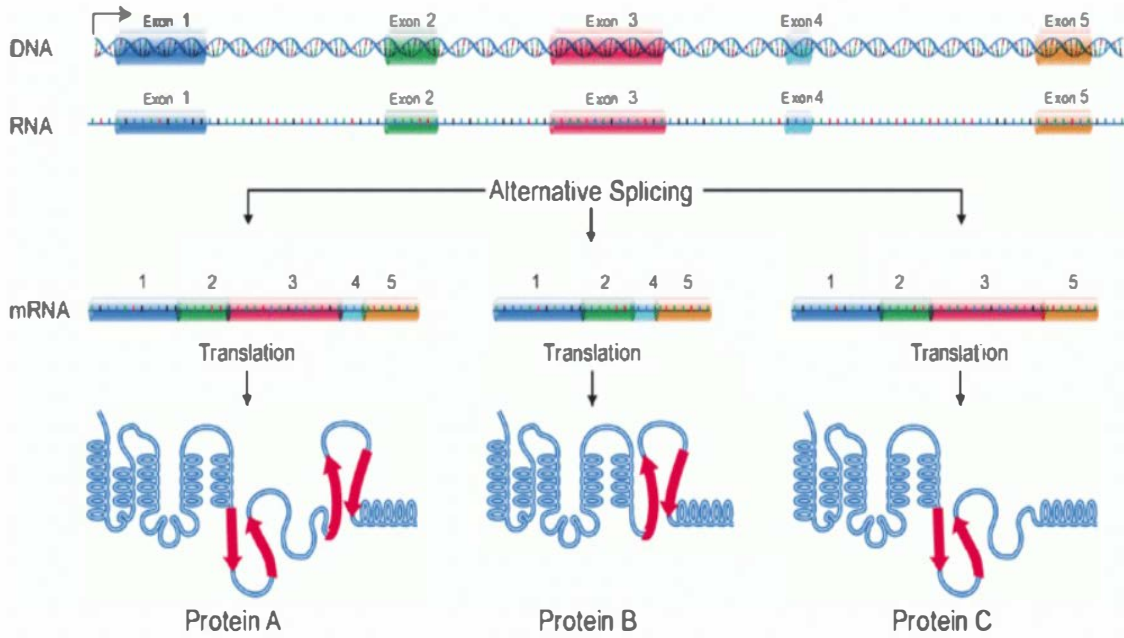
İnsan genom projesinde yaklaşık 30.000 genden yaklaşık 100.000 protein olduğu ifade edilmiştir. Bu durum bir genin birden fazla proteinin sentezinden sorumlu olması gereğini ortaya çıkarmıştır. Bilim insanları tek bir genin bir bölgesinden intronların uzaklaştırılması ile başka proteinlerin elde edileceğini ifade etmişlerdir.

Alternatif splicing: Bir öncü mRNA'nın ekzonlarının farklı kombinasyonlarda kırılması ve tek bir mRNA'dan iki veya daha fazla sayıda farklı olgun mRNA oluşturan bir süreç olduğu ifade edilmiştir (Şekil 79a). Splaysing'in alternatif yolağı ile aynı mRNA'dan farklı protein sentezlenmesine yol açan bir mekanizma bulunmaktadır. Bu yolla farklı mRNA'lar meydana gelir ve sonuçta da aynı transkriptten farklı proteinler oluşur. Yani aynı genden transkripte edilen mRNA alternatif splaysing ile kırılır ve meydana gelen farklı mRNA'lardan birçok protein sentezlenebilir. Bir genden elde edilen büyük bir polipeptid 2 ya da daha fazla proteine bölünebilir (Şekil 79b). Bu splaysing ile farklı dokular-

da farklı proteinler oluşur. Aynı transkript kasta, beyinde hücreler tarafından farklı proteinler oluşturur. Ancak, alternatif splicing mekanizması halen tam olarak açıklanmamıştır.



Şekil 79a. Alternatif Splicing Farklı Olgun mRNA Oluşturulması
(<https://www.slideshare.net/SyedRaza49/post-transcription>, 2017)



Şekil 79b. Farklı mRNA'lerden Birçok Protein Sentezlenebilir
(<http://jonlieffm.com/blog/vast-complexity-of-chromatin-3d-shapes>, 2011)

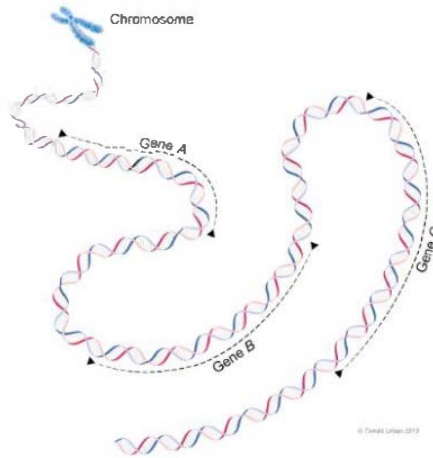
KISIM 5

PROKARYOTLARDA GENLERİN YAPI ve İŞLEYİŞİ

TRANSKRİPSİYONUN KONTROLÜ

1940'ta G.Beadle ve E.Tatum bir gen- bir enzim hipotezini ileri sürerek bir enzimin sentezini kodlayan genetik materyal parçasına gen adını vermişlerdir. Fakat daha sonraları genlerin sentezlediği proteinlerin hepsinin enzim olmadığı anlaşılmıştır. Bunun üzerine bir gen- bir protein hipotezi ileri sürülmüştür. Bazı proteinlerin bir tek polipeptit zincirinden meydana gelmediği ve her polipeptidin farklı genler tarafından sentezlendiği anlaşılmıştır. Örneğin; hemoglobin molekülü 2α , 2β zincirinden meydana gelmektedir. Bu zincirlerin 2 farklı genden sentezlendiği görülmüştür. Yine bazı genlerin RNA ürünlerinin tRNA ve rRNA olarak sentezlendiği ve RNA halinde kaldıkları belirlenmiştir.

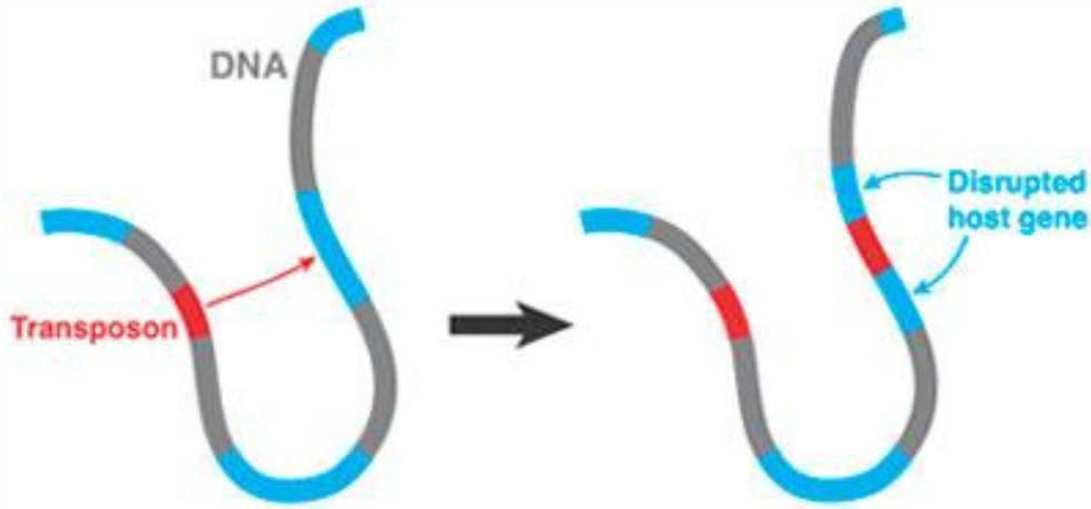
Gen: DNA üzerinde belirli bir baz dizisi uzunluğundan meydana gelmiş bir polipeptit zincirinin veya RNA zincirinin sentezinden sorumlu ve bu sentezleri düzenleyen bir regülatör (düzenleyici) ve bir operatör (kontrol bölgesi) bölge ihtiva eden DNA parçasıdır.



Şekil 80. Gen yapıları

(http://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vse/print.php?page=296&typ=html, 2016)

Bir kromozom üzerinde çok sayıda gen bulunur. *E.coli*'de 5 bin kadar gen bulunduğu tahmin edilmektedir. Genetik ve biyokimyasal deliller prokaryotik ve ökaryotik hücre kromozomlarında bulunan bir genin veya genlerin orijinali olarak bulunduğu yerleri terk edip başka bir gen bölgesine girdiğini göstermiştir. Böyle hareketli genetik elementlere '**transpozonlar**' denir (Şekil 81a). Transpozonlarda bir hareketli gen bölgesi ve birde bu hareketli genin 2 ucunda inversiyonu sağlayan bir baz dizisi bulunmaktadır. Hareketli genin 2 ucunda inversiyonu sağlayan baz dizisine '**inversiyon sekansı (dizisi)**' denir ve '**IS**' olarak gösterilir. Transpozonları kabul eden DNA'ya 'alıcı DNA' denir.

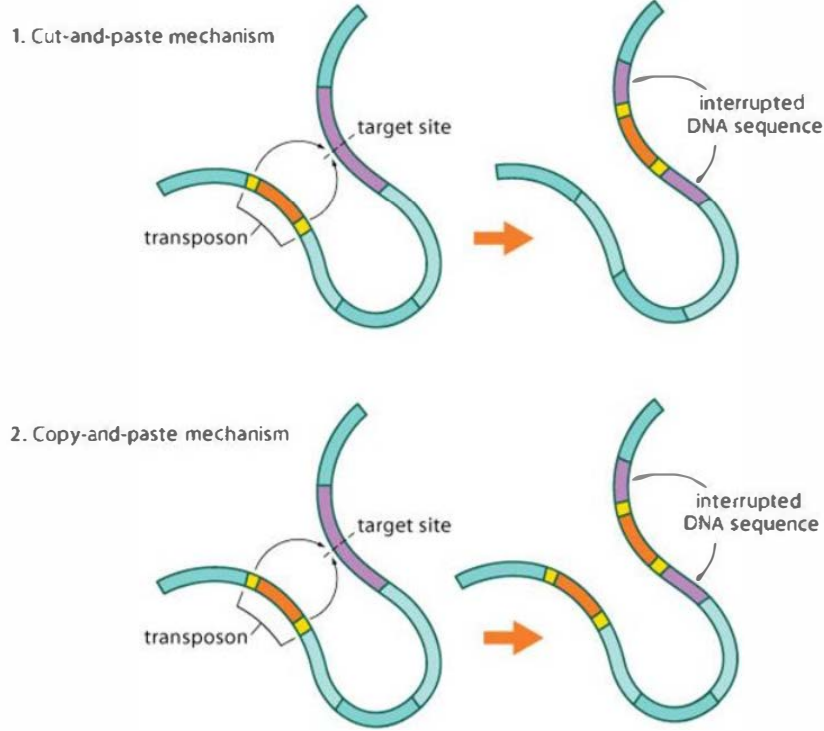


Şekil 81a. Hareketli Genetik Elementlere 'Transpozonlar'

(<https://www.ucsf.edu/news/2013/02/13535/gene-invaders-are-stymied-cells-genome-defense>, 2013)

İki tip transpozisyon metodu vardır, birincisi kes ve yapıştır mekanizması ile diğeri ise kopyala ve yapıştır mekanizması ile bir yerden başka bir yere hareket edebilirler (Şekil 81b).

Two methods of transposition:



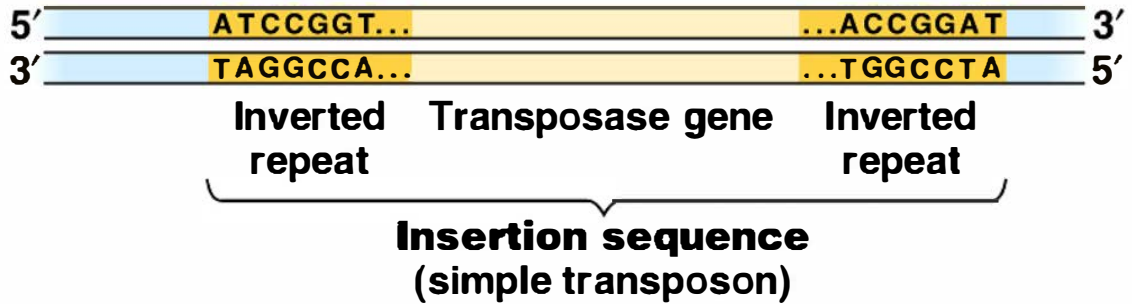
Şekil 81b. Transpozisyonun iki metodu

(<https://www.memorangapp.com/flashcards/108019/Immunology+-+Block+1/>, 2017)

2 çeşit transpozon vardır;

1. Basit Transpozonlar: IS olarak gösterilir. Oldukça kısadır ve uzunluğu 2 bin baz çiftini geçmez (Şekil 82).

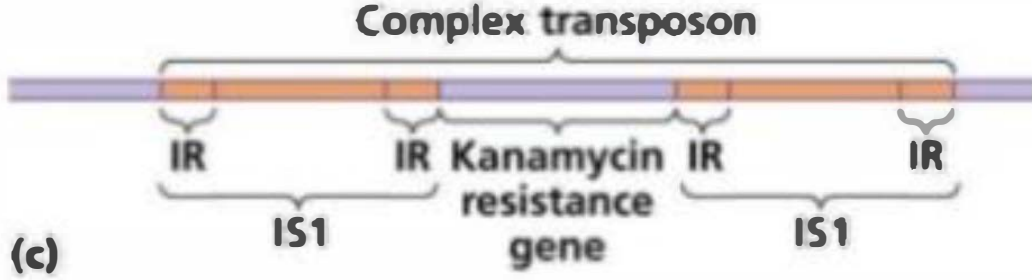
DNA



Şekil 82. Basit Transpozonlar

(<http://www.bio.utexas.edu/faculty/sjasper/bio212/microbial.html>, 2017)

2. Kompleks Transpozonlar: Bazen IS sekansları yer değiştirirken işlevi olmayan yanlarında bulunan genleride taşırlar. Bu büyük parçalara ‘transpoz’ denmekte ve ‘Tn’ olarak gösterilmektedir (Şekil 83).



Şekil 83. Kompleks Transpozonlar

(https://www.slideshare.net/Mona_Alatureikan/microbial-genetics-lectures-1920-and-21, 2017)

PROKARYOTİK HÜCRELERDE PROTEİN SENTEZİNİN DÜZENLENMESİ

Bakteri hücrelerinde bazı enzimlerin molekül sayısı şarlar ne olursa olsun hemen hemen eşittir. Örneğin, glikolitik yolda yer alan enzimlerin miktarı yaklaşık hep aynıdır. Aktivitesi ve molekül sayısı pek fazla değişmeyen bu enzimlere ‘**konstitütif enzimler** (sürekli)’ denir. Yaklaşık % 75 gen konstitütiftir. Diğer bir grup enzimin molekül sayısı koşullara göre değişiklik gösterir ve bu enzimler normal koşullarda hücrede az miktarda bulunur.

Bakteri tek bir C kaynağı olarak glikoz yerine başka bir besin maddesi kullanacak olursa bu maddeyi yıkacak enzimlerin miktarı hızlıca artacaktır. İşte bu olaya ‘**indüksiyon**’ (kelime anlamı: herhangi bir olayı başlatmak), miktarı artan enzimlere de ‘**indüklenebilen enzim**’ denir. Bakterilerden enzim indüksiyonunun tersi durumda söz konusudur. Bir maddenin sentezinden sorumlu enzimlerin, bu maddenin ortama ilavesiyle o enzimin sentezinin azalması olayına ‘**represyon**’ (kelime anlamı: baskılanma) bu tür enzimlere de ‘**represe edilebilen enzim**’ denir.

OPERON HİPOTEZİ

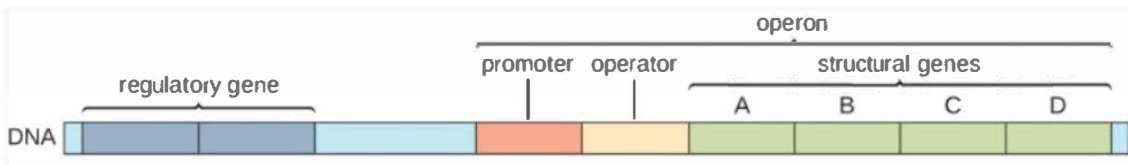
Enzim indüksiyonu ve enzim respresyonu arasındaki moleküler ve genetik ilişki 1961'de F.Jacop ve J.Monod tarafından açıklanmıştır. Bu bilim insanları prokaryotlarda protein sentezinin genetik kontrolü için operon hipotezini önermişlerdir.

Operon: Operatörün kontrolünde bulunan ve çok sayıda genin ifadesini düzenleyen sistemdir.

Laktoz (Lac) Operonu

Operon hipotezinde en yoğun olarak çalışılan ve an fazla bilgiye sahip olunanı *E.coli*'de bulunan Laktoz operonu (Lac operonu)'dur. Bu iki bilim adamı protein sentezinin kontrolü için önerdikleri operon hipotezinde 3 gen bölgesi vardır (Şekil 84). Bunlar;

- 1. Regülatör (regulatory: düzenleyici) Gen (I geni):** Represör denen(baskılayıcı) bir protein sentezler. Bu protein operatöre bağlanarak transkripsiyonu baskılar bu genin kendine ait promotoru vardır.
- 2. Operatör (operator, kontrol) Gen:** Yapısal genlerin fonksiyonunu denetler.
- 3. Yapısal Genler (structural genes):** mRNA'yı oluşturur.



Şekil 84. Operon Sistemi

(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/gene-regulation-operon-theory/>, 2017)

Uyarılabilen ve baskılanabilen operon sistemlerinde negatif ve pozitif kontroller bulunur.

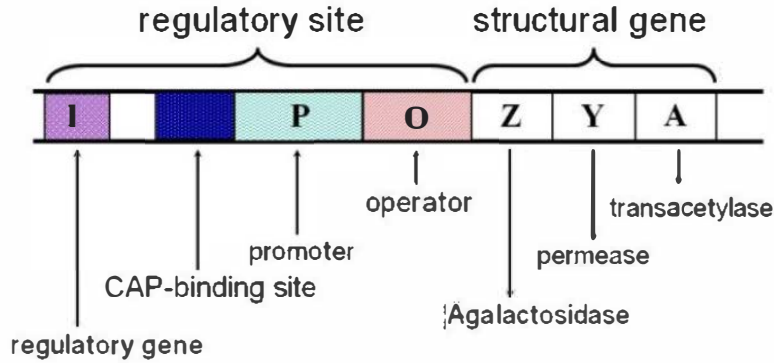
Gen Transkripsiyonunun Negatif Kontrolü

Lac operonunun yapısına bakıldığında; Regülatör gen, CAP-bağlama alanı, RNA pol enziminin bağlandığı Promotor bölgesi, Operatör bölgesi ve 3 yapısal genden oluşmaktadır (Şekil 85).

Yapısal genler Z, Y ve A sembolleriyle gösterilmektedir.

- Z geninden β -galaktosidaz sentezlenir ve bu enzim laktozu Glukoz +Galaktoz'a ya da laktozu allolaktoza parçalamakta,
- Y geninden sentezlenen Permeaz enzimi sentezlenir ve bu enzim laktozun hücre içine alınmasını sağlar,
- A geninden Transasetilaz enzimi sentezlenir ve bu enzim hücredeki diğer galaktozid şekerlerini asetiller (Laktoz metabolizması sonucu açığa çıkan atıkların uzaklaştırılması).

Structure of *lac* operon



Şekil 85. Lac Operonun Yapısı

(<http://slideplayer.com/slide/9240109/>, 2017)

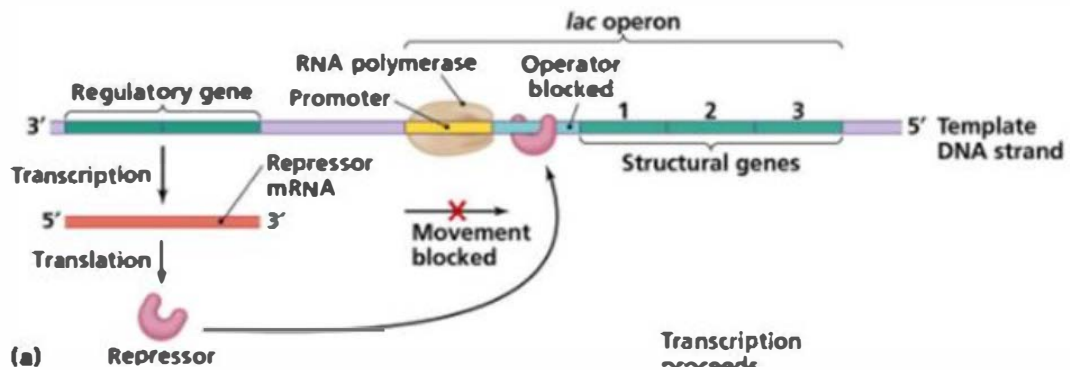
Bir disakkarit olan laktoz kimyasal olarak β -galaktosid olarak adlandırılır ve *E.coli* tarafından bir karbon kaynağı ve enerji olarak kullanılır. Bunun için laktozun glukoz ve galaktoza parçalanması gerekir. Bu işlemi yapan enzimin adı β -galaktosidaz (laktaz)'dır. Bu enzim ayrıca Laktozu allo laktoza çevirir. Bakteri üreme ortamında enerji kaynağı olarak bulunan laktozu kullanabilmesi için ortamda β -galaktosidaz, permeaz ve transasetilaz enziminin bulunması gereklidir. Bu enzimler DNA üzerinde

ilgili yapısal genlerden transkribe edilmektedir. Regülatör gen bölgesinin yapısal genlerin transkripsiyonunu denetleme kapasitesinde olduğu ileri sürülmüştür. Regülatör genin (I) ürünü olan proteine 'represör protein' denir ve 'R' ile gösterilir. Bu protein aktif bir proteindir. Aktif olan represör protein DNA üzerinde operatör denen bölgeye anahtar-kilit mekanizmasıyla bağlanır. Bunun bağlanması RNA pol enziminin kendi bağlanma bölgesi olan promotora bağlanmasını engeller ve yapısal genler transkribe edilemez.

Eğer ortamda indüktör yani indükleyici molekül varsa represör proteinin DNA'ya bağlanması söz konusu değildir. Çünkü indüktör represöre bağlanarak onu inaktif hale getirir. İnaktif represör operatöre bağlanamaz, RNA pol enzimi kendi bağlanma bölgesine bağlanır ve transkripsiyon devam eder. Transkripsiyonun yalnızca represörün operatör bölgeye bağlanmadığı zaman gerçekleştiği için **negatif kontrol** söz konusudur.

Ortamda laktoz varlığına veya yokluğuna göre ilgili yapısal genler transkribe olmakta ya da olmamaktadır.

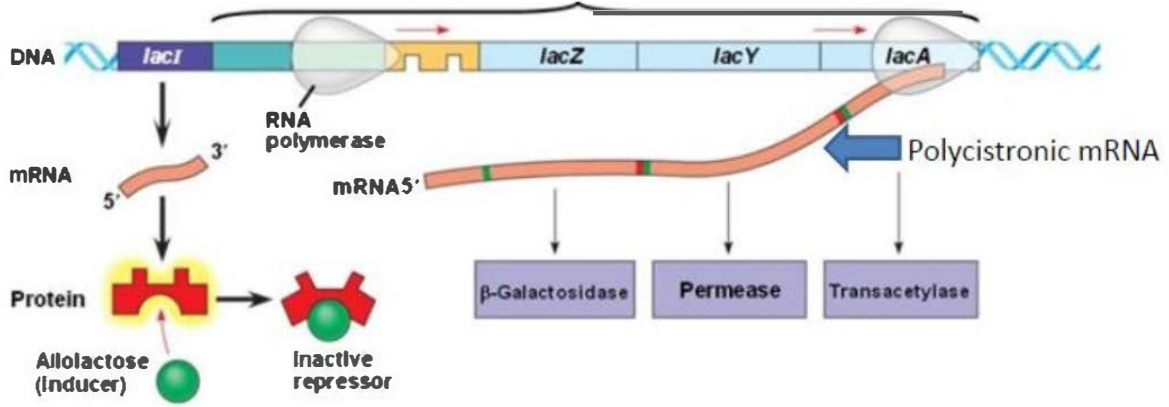
Ortamda laktoz yok ise aktif durumda olan represör protein operatöre bağlanarak transkripsiyonu önler. Çünkü operatör bloklanmış ve RNA pol enzimi promotore bağlanmış olsa bile ilerleyememekte ve yapısal genler transkribe edilmemektedir (Şekil 86). **Transkripsiyon YOK.**



Şekil 86. Laktoz Yokluğunda Operonun İşleyişi

(<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/regulation.html>, Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2006)

Ortamda laktoz var ise bir indükleyici molekül olan allolaktoz represöre bağlanarak onu yapısal değişikliğe uğratar ve onu inaktif hale getirir. Bu durumda represör operatöre bağlanamaz, RNA pol enzimi promotore bağlanarak yapısal genleri transkribe etmektedir (Şekil 87). **Transkripsiyon VAR.**



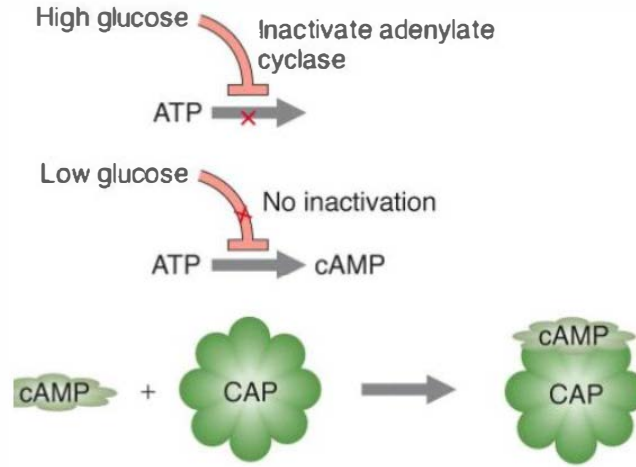
Şekil 87. Laktoz Varlığında Operonun İşleyişi

(<http://slideplayer.com/slide/4736188/>, 2017)

Gen Transkripsiyonunun Pozitif Kontrolü

Hücre laktoz ve glukoz içeren bir ortamda bulursa, Lac operon ve diğer bazı operonların glukoz varlığında baskılanma gibi önemli bir özelliği vardır. Bu durum glukozun diğer şekerlere göre tercihli olarak katabolize edildiğini gösterir. Hücre ortamda glukoz varsa önce glukozdan yararlanmayı tercih etmektedir.

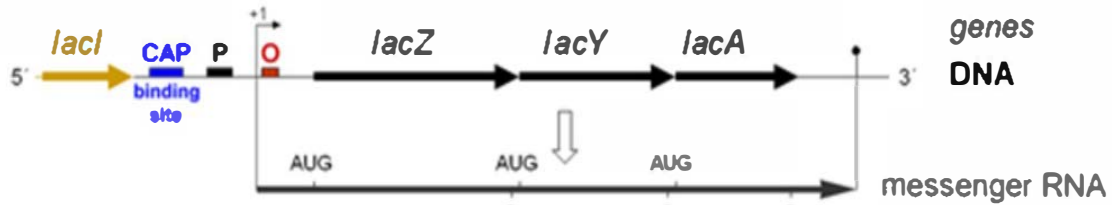
Ortamdaki glukoz durumuna göre hücre içinde cAMP oluşturulur. Adenilat siklaz enzimi ATP'den cAMP'yi oluşturmaktadır. Ortamda yüksek miktarda glukoz var ise bu adenilat siklaz enzimi inaktifte olmakta ve cAMP oluşturulmamaktadır. Düşük glukoz varlığında enzim ATP'den cAMP'yi oluşturur. cAMP ortamda bulunan 'katabolit aktivatör protein (CAP)' ile kompleks yapmaktadır (Şekil 88a). Dolayısıyla, bir aktivatör molekül promotor bölgesinde RNA pol enzimi ile etkileşir ve transkripsiyonu başlatığından dolayı bu olaya **pozitif kontrol** denilmektedir.



Şekil 88a. Yüksek ve Düşük Glukoz Varlığında cAMP oluşumu ve CAP'la Kompleks Yapması

(http://www.mun.ca/biology/scarr/bio4241_chapter13.htm, 2007)

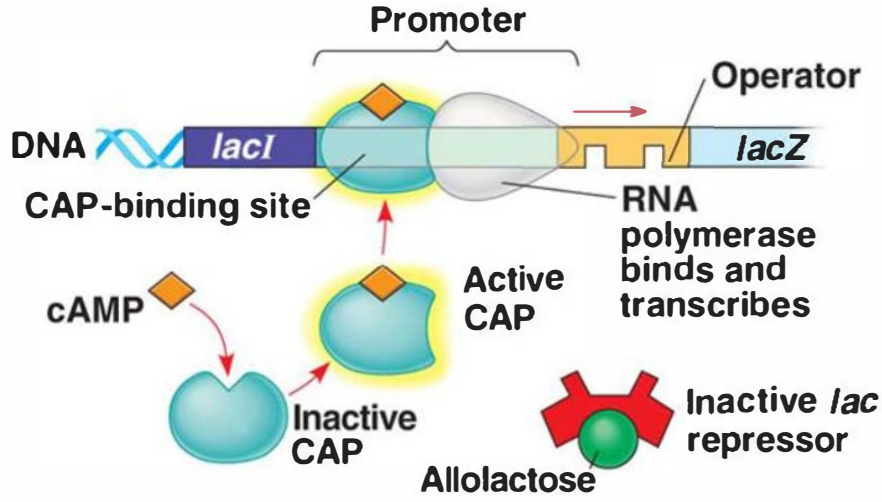
cAMP+CAP kompleksi gen üzerindeki CAP bağlanma alanına bağlanır (Şekil 88b).



Şekil 88b. Gen Üzerindeki CAP bağlanma Alanı

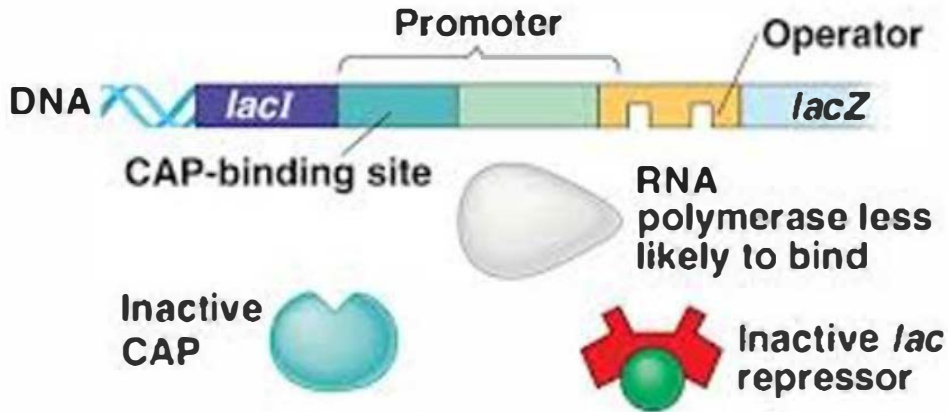
(<http://nptel.ac.in/courses/102103015/module7/lec5/3.html>, 2017)

Laktoz tek C (karbon) kaynağı olarak ortama ilave edildiğinde hücrede adenilat siklaz denenen enzim miktarı artar. Bu enzim ATP'den cAMP'yi oluşturur. cAMP ortamda bulunan 'katabolit aktivatör protein (CAP)' ile kompleks yapmaktadır. Bu kompleks daha sonra promotorun CAP bölgesine bağlanır. Bu bağlanma RNA pol enziminin kendi bağlanma bölgesine yani promotora bağlanmasını uyarır. Promotora bağlanan RNA pol enzimi yapısal genleri transkribe eder (Şekil 89). **Transkripsiyon VAR.**



Şekil 89. Laktoz var, Glukoz az veya olmadığı (cAMP seviyesi yüksek) Durumda Gen İşleyişi
(<http://nptel.ac.in/courses/102103015/module7/lec5/3.html>, 2017)

Glukoz tek C (karbon) kaynağı olarak ortama ilave edildiğinde cAMP'nin miktarı düşüktür. Çünkü, glukoz adenilat siklaz enzimini engelleyerek, ATP'den cAMP oluşumunu engeller ve hücre içinde cAMP düzeyi düşük kalır. cAMP düzeyi düşük olduğu için CAP'la kompleks oluşturamadığından CAP bölgesine bağlanamaz. Bu durumda RNA pol enzimi promotore bağlanmaz ve genler transkribe edilemez (Şekil 90) **Transkripsiyon YOK.**



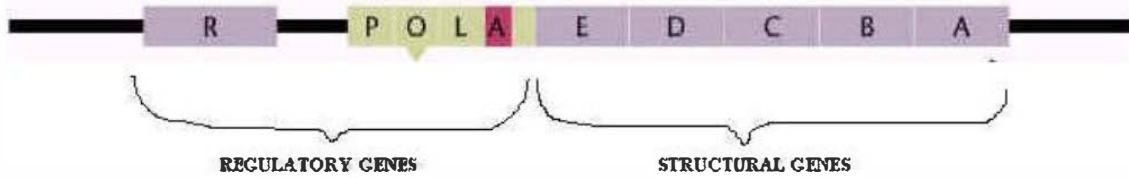
Şekil 90. Glukoz olduğu (cAMP seviyesi düşük) Durumda Gen İşleyişi
(<http://nptel.ac.in/courses/102103015/module7/lec5/3.html>, 2017)

Eğer laktoz bulunan ortama glukoz ilave edilecekse laktozun transport ve yıkımından sorumlu olan enzimlerin sentezi baskılanır. İşte Lac operonu proteinlerinin glukoz tarafından baskılanmasına 'Katabolik represyon' denir.

Triptofan (Trp) Operonu

Protein sentezinin kontrolünde değişik bir mekanizma C.Yanofsky ve arkadaşları (1976) tarafından *E.coli*'de triptofan operonunda bulunmuştur. Sürekli olarak yapılan bir ürünün üretimi baskılanabilir sistem ile düzenlenebilir ve buna en iyi örnek Trp operonudur.

Triptofan operonun yapısında regülatör gen (R), promotor (P), operatör (O), lider bölge (L) (lider bölgede Attenuation: zayıflatıcı bir bölge bulunur) ve poligenik (polisistronik) yapısal genler bölgesinden oluşmaktadır (Şekil 91).



Şekil 91. Triptofan (Trp) Operonu

(<http://biosiva.50webs.org/Lacoperon.htm>, 2017)

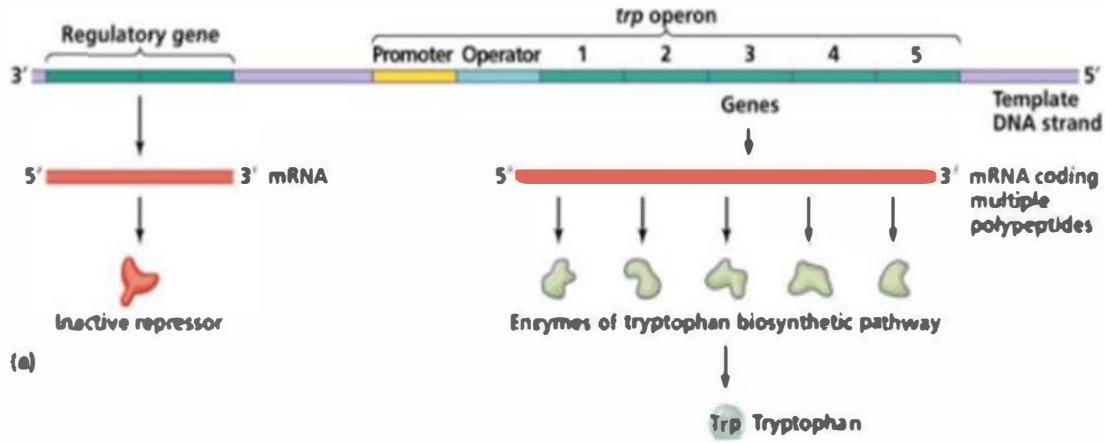
Yapısal gen bölgesi E, D, C, B ve A ile gösterilen 5 ayrı polipeptidin sentezinden sorumlu bölgedir (Polisistronik gen). Yapısal genlerden E ve D'den sentetaz, C'den indol gliserol sentetaz, B ve A'dan triptofan sentetaz sentezlenir.

Triptofan biyosentezinde 2 kontrol vardır. Bir tanesi Negatif kontrol diğeri Zayıflatıcı (Attenuation) kontroldür.

Negatif kontrol olarak Triptofan operon sistemi

Ortamda triptofan yoksa regülatör genden sentezlenen represör proteini inaktiftir ve buna 'aporepresör' denir. Glikozun bulunduğu

ortamda *E.coli* hücresi normal olarak triptofan sentezini sağlar, represör protein inaktif olduğundan operatöre bağlanamaz ve RNA pol enzimi promotora bağlanarak yapısal genleri transkribe etmektedir. Triptofan sentezinden sorumlu beş enzim sentezlenir (Şekil 92). **Transkripsiyon VAR.**



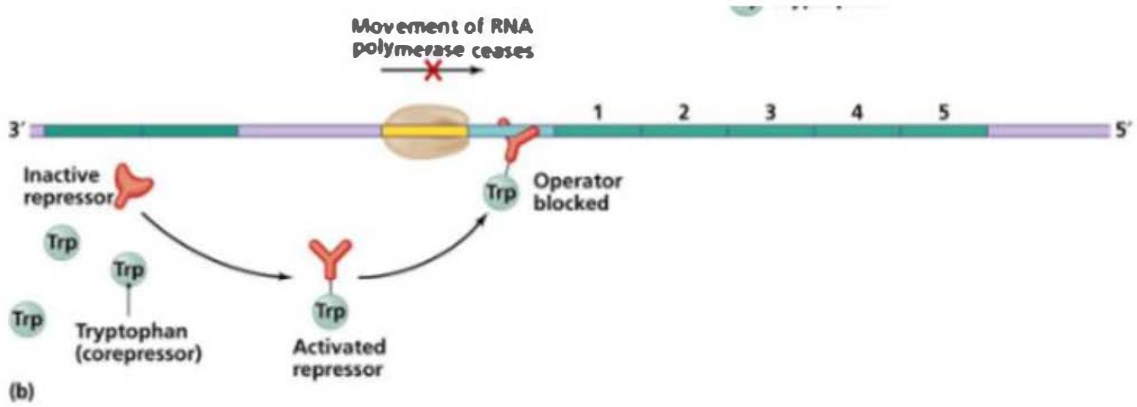
Şekil 92. Ortamda Triptofan Yokluğunda Operon sisteminin İşleyişi

(<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/regulation.html>, Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2006)

Ortamda triptofan varsa, triptofan represöre bağlanarak onu aktive eder. Bu nedenle triptofan bir ko-represör olarak işlev görür.



Aktif represör operatöre bağlanarak RNA pol enziminin promotora bağlanmasını inhibe eder ve yapısal genler transkribe edilemez (Şekil 93). **Transkripsiyon YOK.**

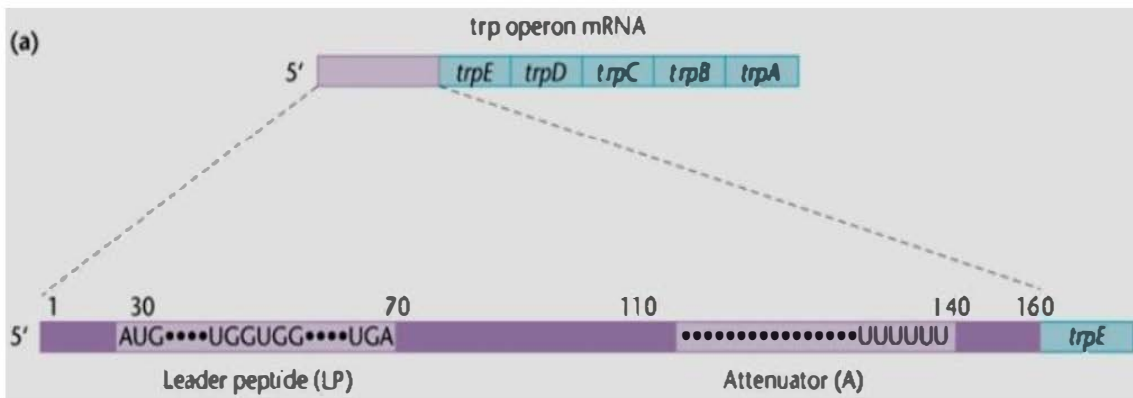


Şekil 93. Ortamda Triptofan varlığında Operon sisteminin İşleyişi

(<http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/regulation.html>, Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings, 2006)

Zayıflatıcı (Attenuation) kontrol olarak Triptofan operon sistemi

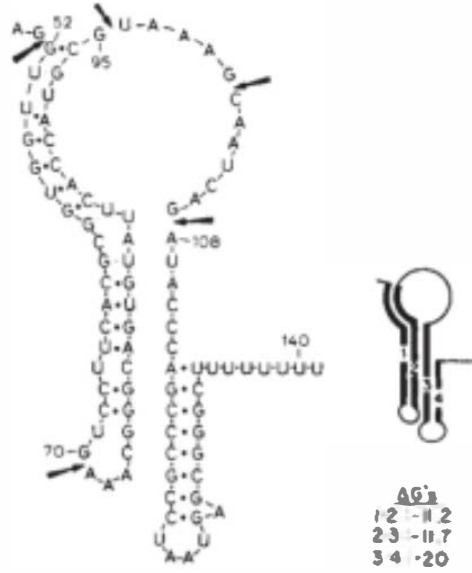
Triptofan operonunda zayıflatıcı bölge denen bir bölge daha bulunur ve transkripsiyon için kontrol mekanizması sağlar. Lider bölgede 2 adet arka arkaya triptofan kodonu olan UGGUGC kodonları bulunur (Şekil 94a). Bunların bulunuşu tesadüf değildir. Bu bölgeler transkripsiyonun kontrolünde anahtar rol oynar. Prokaryotlarda transkripsiyon ve translasyon aynı anda gerçekleştiğinden bu operonda attenuasyon ile bir kontrol mekanizması vardır. Trp operonunda RNA pol enziminin sentezlediği mRNA aynı zamanda ribozoma bağlanarak protein sentezi devam etmektedir.



Şekil 94a. Lider Bölgede 2 Adet Arka Arkaya Triptofan Kodonu

(<http://slideplayer.com/slide/7055226/>, 2017)

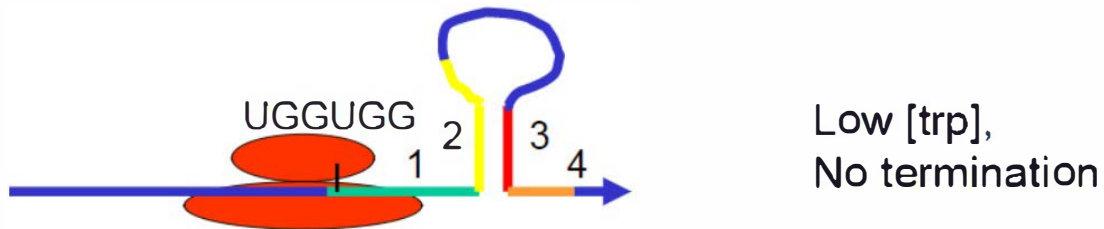
Lider dizi özel bir yapıya sahiptir. Bu yapıda 4 kol bulunur. 1. kol 2. kol ile 3. kol 4. kol ile baz çifti yapar. Yine 2. kol hem 1. hem 3. ile baz çifti oluşturabilir 3. kolda hem 2. hem 4. kolla baz çifti yapabilir (Şekil 94b).



Şekil 94b. Lider Dizinin Yapısı ve Oluşturduğu Kollar

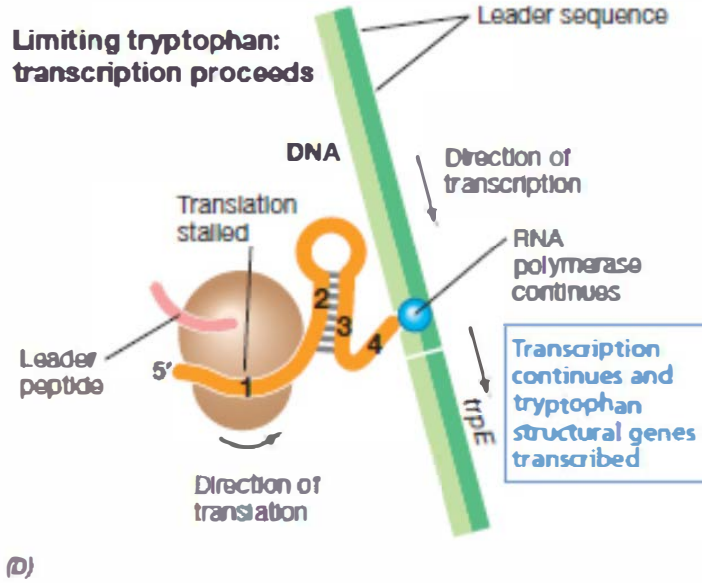
(<https://www.nature.com/scitable/topicpage/negative-transcription-regulation-in-prokaryotes-1013>, 2008)

Ortamda triptofan az ise tRNA'nın ortamda triptofanı bulup onu ribozoma taşıması zaman alır. Bu takdirde 1. kol ile 2. kol baz çifti yapar, 3. ve 4. kol baz çifti yapamadığından saç tokası şekli meydana getirmesi mümkün değildir. RNA pol enzimi yapısal genlerde mRNA sentezine devam eder (Şekil 95a ve b). **Transkripsiyon VAR.**



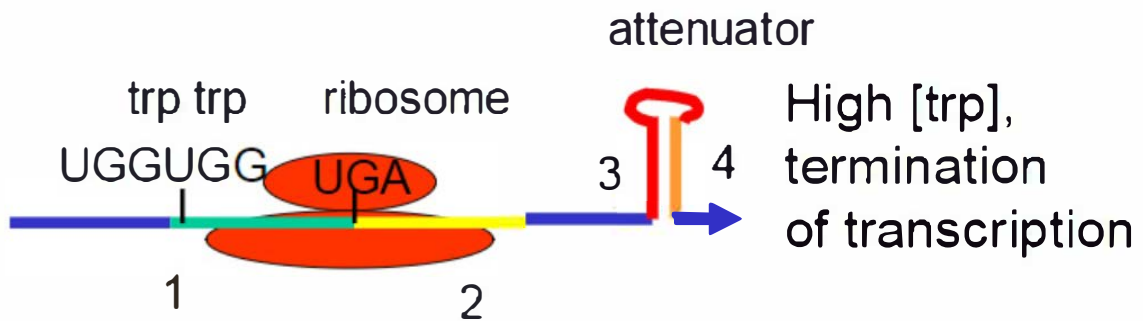
Şekil 95a. Ortamda Triptofan Az Olduğu Durumda Gen İşleyişi

(<http://slideplayer.com/slide/9805570/>, 2017)

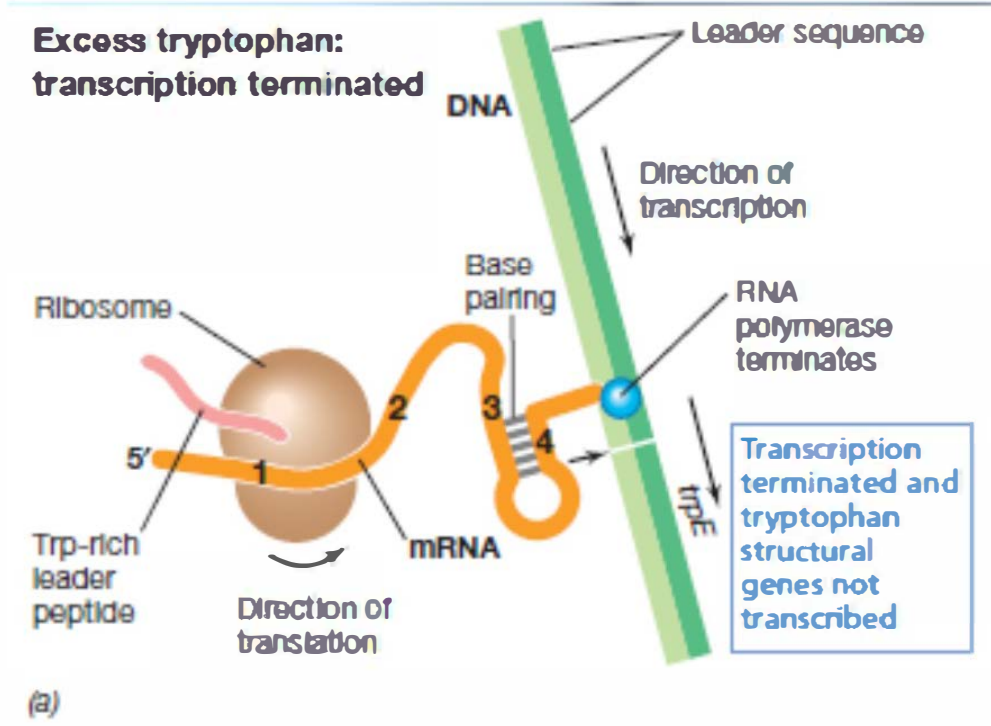


Şekil 95b. Ortamda Triptofan Az Olduğu Durumda Gen İşleyişi
(http://2012.igem.org/File:IGEM_attenuation_diagram_1_12.09.23.png, 2012)

Ortamda triptofan var ise lider dizide arka arkaya olan 2 triptofan aminoasid kodunun gelindiği zaman tRNA ortamda triptofan bulmakta güçlük çekmeyecek, buradan hızlı geçecek ve sentez devam edecektir. Bu durumda 1. ve 2. kol, 2. ve 3. kol baz çifti yapamaz, ancak 3. ve 4. kol baz çifti yapmakta ve saç tokası şekli ortaya çıkmaktadır (Şekil 96a ve b). Bu saç tokası zayıflatıcı etki göstermektedir. Bu durum sentezin sonlanması için bir sinyaldir ve RNA pol enzimi mRNA sentezi devam edemez, transkripsiyon durur. Transkripsiyon **YOK**.



Şekil 96a. Ortamda Triptofan Olduğu Durumda Gen İşleyişi
(<http://slideplayer.com/slide/9805570/>, 2017)



Şekil 96b. Ortamda Triptofan Olduğu Durumda Gen İşleyişi
(http://2012.igem.org/File:IGEM_attenuation_diagram_1_12.09.23.png, 2012)

KISIM 6

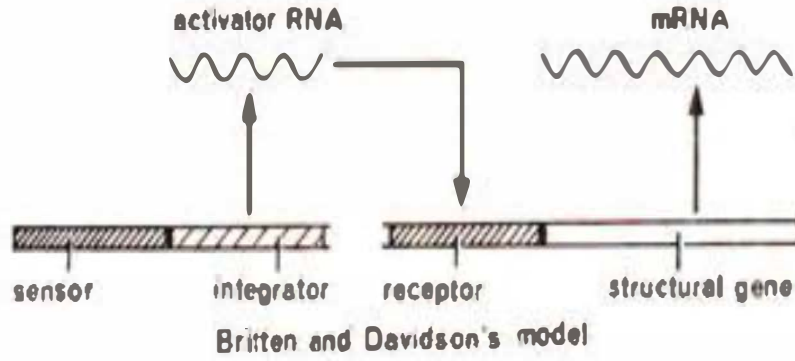
ÖKARYOTLARDA GENLERİN YAPI ve İŞLEYİŞİ

TRANSKRİPSİYONUNUN KONTROLÜ

Ökaryotik hücreler, prokaryotlardan daha fazla genetik bilgi içermektedir. Örneğin; bir insan hücresi yaklaşık olarak E. coli hücresinden bin defa daha DNA molekülüne sahiptir. Ayrıca ökaryotik DNA' lara histon adı verilen bazik proteinlerle özel yapısal bir ilişki içerisinde dir. Prokaryotlarda böyle bir yapı söz konusu değildir. Bu bazik proteinler cm' lerle ölçülen DNA molekülünün sıkı bir şekilde paketlenmesini sağlayarak birkaç mikrometreye sığmasını sağlar. Yine ökaryotik hücrelerde nükleusun etrafında bir zar bulunmaktadır. Bundan dolayı ökaryotlarda transkripsiyon nükleus içinde yapılırken translasyon sitoplazmada gerçekleşmektedir. Prokaryotlarda ise 2 olay iç içedir. Prokaryotik hücrelerde genler kesintisiz ve doğrusal bir şekilde proteine tercüme edilirken ökaryotlarda mRNA' lar öncül halde sentezlenmekte ve bir takım değişiklikler geçirip olgun mRNA halinde sitoplazmaya transfer edilmektedir.

Ökaryotik hücre genlerinin nasıl çalıştığına dair birçok model ileri sürülmüştür. Bunlardan en çok kabul göreni R. J. Britten- E.H. Davidson (1969) tarafından ileri sürülen 'R. J. Britten- E. H. Davidson Modeli'dir (Şekil 97). Bu modele göre ökaryotik genler spesifik enzim substratlarını, hormon reseptör komplekslerini ve düzenlemeyi sağlayan nükleotitleri tanıyan sensör (alıcı) bölgeler içermektedirler. Her bir sensör bölge integratör (I) bölgesine bitişiktir. Eğer bir substrat ya da hormon reseptör kompleksi sensör bölgeyi aktive edecek olursa integratör gen transkribe uğramakta ve aktivatör RNA sentezlenmektedir. Bu aktivatör RNA aynı

veya farklı kromozomlar üzerinde bulunan yapısal gene bitişik olan reseptör bölgeye bağlanmaktadır ve yapısal gen transkribe olmaktadır. Oluşan mRNA hücre nükleosunda yapısal değişikliğe uğrar ve olgun halde sitoplazmaya salınır ve burada ribozomlarda proteine çevrilir.



Şekil 97. Britten ve Davidson Modeline Göre Ökaryotlarda Gen İşleyişi

(http://www.biocyclopedia.com/index/genetics/regulation_of_gene_expression_a_variety_of_mechanisms_in_eukaryotes/brittendavidson_model_for_unit_of_transcription.php, 2012)

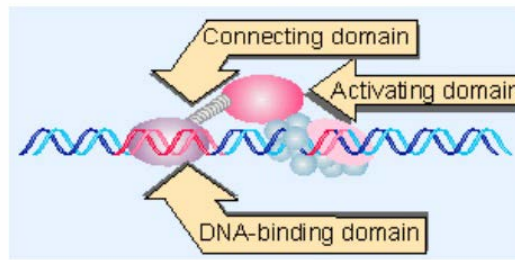
Ancak, son yıllarda yapılan çalışmalar bu modelin doğru olmadığını, bir aktivatör RNA'nın bulunmadığını, ökaryotik genlerin bazı proteinler tarafından aktif hale getirildiğini ortaya koymuştur. Ökaryotik genlerin ifadesine birçok proteinin karıştığı ve kompleks bir durumun olduğu ifade edilmiştir. Genlerin nasıl kontrol edildiği konusu tam olarak açıklanmamıştır, bu konudaki çalışmalar sürmektedir. Bazı regülatör proteinlerce (transkripsiyon faktörleri) genlerin kontrol edildiği bildirilmiştir.

Gen transkripsiyon kontrolü hücrenin fonksiyonu ve canlılığın devamı için önemlidir. Ökaryotlarda farklı hücre tipleri morfolojik ve fonksiyonel açıdan farklılıklar gösterir. Örneğin; aynı genomu taşıyan bir böbrek hücresi bir kan hücresinden yapısal ve işlevsel olarak farklıdır. Bu farklılık genlerin kaybolmasından değil gen ifadesindeki değişikliklerden dolayıdır. Ökaryotik gen ifadesinin kontrolünün transkripsiyon, RNA işlenmesi veya translasyon gibi farklı seviyelerde ortaya çıktığı ifade edilmektedir. Prokaryotik mRNA'ların yarı ömrü ortalama 1-3 dakikadır. Bu nedenle prokaryotlarda protein sentezinin düzenlenmesi transkripsiyonel seviyedir. Buna karşın ökaryotik mRNA'nın yarı ömrü 10 dakika ile 3 saat arasında değişmektedir. Bu nedenle protein sentezinin kontro-

lû daha çok transyonal seviyededir. Nadirde olsa transkripsiyonel seviyede de düzenlenmektedir. Her bir ökaryotik genin kendi promotoru vardır. Yani ökaryotik genler operonlar şeklinde organize olmamışlardır. Prokaryotik genler represör proteinler tarafından regüle edilirken(düzenlenirken) ökaryotlarda represörler nadiren rol oynamalarına rağmen ökaryotik genler esasen transkripsiyonel aktivatörler tarafından regüle edilirler. Bu aktivatörler transkripsiyon faktörleridir.

ÖKARYOTİK REGÜLATÖR PROTEİNLER (Transkripsiyon Faktörleri)

Regülatör proteinler (transfaktörler) olarak adlandırılan genleri aktive den veya engelleyen aktivatör ve represör proteinleri içerirler. Bu proteinler kendilerinin bağlandığı cis- elementler (RNA pol II enziminin transkripsiyonu başlatmasına yardımcı olan, DNA üzerinde bulunan spesifik kontrol dizileridir, TATA kutusu ya da Hognes kutusu) olarak adlandırılan DNA'daki spesifik kontrol dizilerini tanırlar. Bu proteinlerin DNA'ya bağlanması yakınında bulunan genin transkripsiyonunu ya aktive (pozitif regülasyon) yada inhibe (negatif regülasyon) eder. Ökaryotik promotorlar prokaryotik promotorlardan daha karmaşık. Promotora ek olarak ökaryotik genler bir ya da daha fazla cis-elemente sahiptir. Her gen kendi cis-elementine bağlanan transfaktörleri tarafından kontrol edilir. Transfaktörler en az 2 işlevsel bölgesi (domain) olan proteinlerdir. (Domain: Bir proteinde özgül bir işlev gören aminoasit dizilerinin olduğu bölgedir). Bu 2 işlevsel bölgelerden birisi transfaktörünün DNA'ya bağlanmasını sağlayan DNA- binding domain, ikincisi ise transkripsiyonun aktive edilmesini sağlayan trans activating domaindir (Şekil 98).



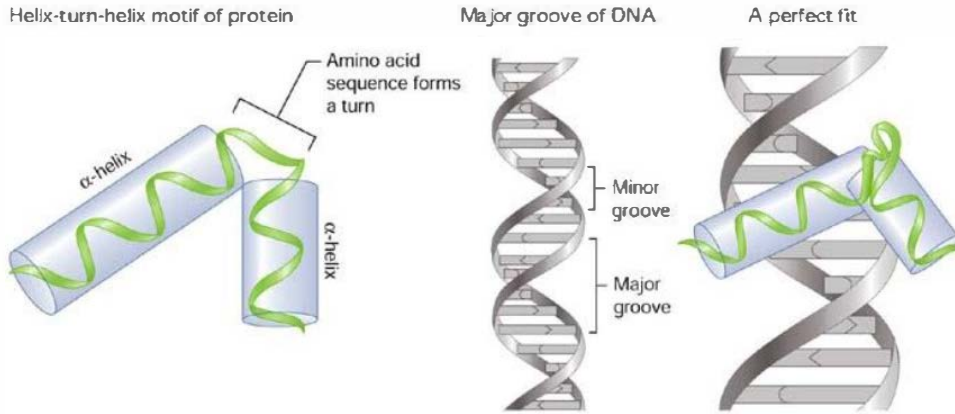
Şekil 98. Transfaktörler En Az 2 İşlevsel Bölgesi (Domain) Olan Proteinlerdir

(<http://genes.atpspace.org/20.12.html>, 2000)

Transkripsiyon faktörleri DNA bağlanma bölgesinde içerdikleri 3 boyutlu yapısal motiflere göre 3 gruptur. Bunlar promotordaki özel dizilere bağlanarak RNA polimerazın DNA'nın kalıp ipliğine doğru biçimde bağlanmasını sağlarlar.

1. Heliks-Dönüş-Heliks(helix-turn-helix)→HTH Proteinleri
2. Çinko Parmak Proteinleri (Zinc finger)
3. Bazik Lösin Fermuarı Proteinleri (Basic leucine zipper, b ZIP)

1. Heliks-Dönüş-Heliks: İlk bulunan DNA bağlanma bölgesine ait bir motiftir. Bu motif kısa bir aminoasit ipliği ile bağlanmış 2 α sarmalı içerir. Bu sarmallardan biri DNA sarmalının büyük oluğundaki 6 bazlık bir bölgeyi tanıyıp bağlanmayı sağlarken diğer α sarmal DNA ile protein arasındaki etkileşimi stabilize eder (Şekil 99).

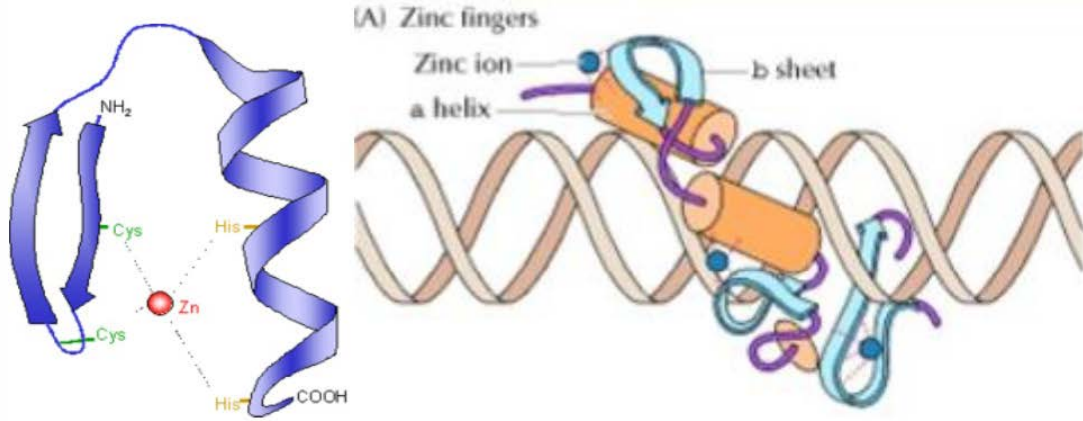


Şekil 99. Heliks-Dönüş-Heliks Motifi ve DNA'ya Bağlanması

(<http://www.bi.miami.edu/~cmallery/150/gene/sf14x14.jpg>, 2017)

2. Çinko Parmak Proteinleri: Bu motif çinko içermesi ve şeklinin parmağa benzemesinden dolayı bu şekilde adlandırılmaktadır. Bu motifte 2 sistein ve 2 histidini birbirine bağlayan 1 çinko atomu bulunur. Parmak şeklindeki yapı DNA'nın büyük ya da küçük oluklarına bağlıdır (Şekil 100).

Ökaryotik düzenleyiciler çeşitli DNA'ya bağlanma domenlerini (motiflerini) kullanabilirler.

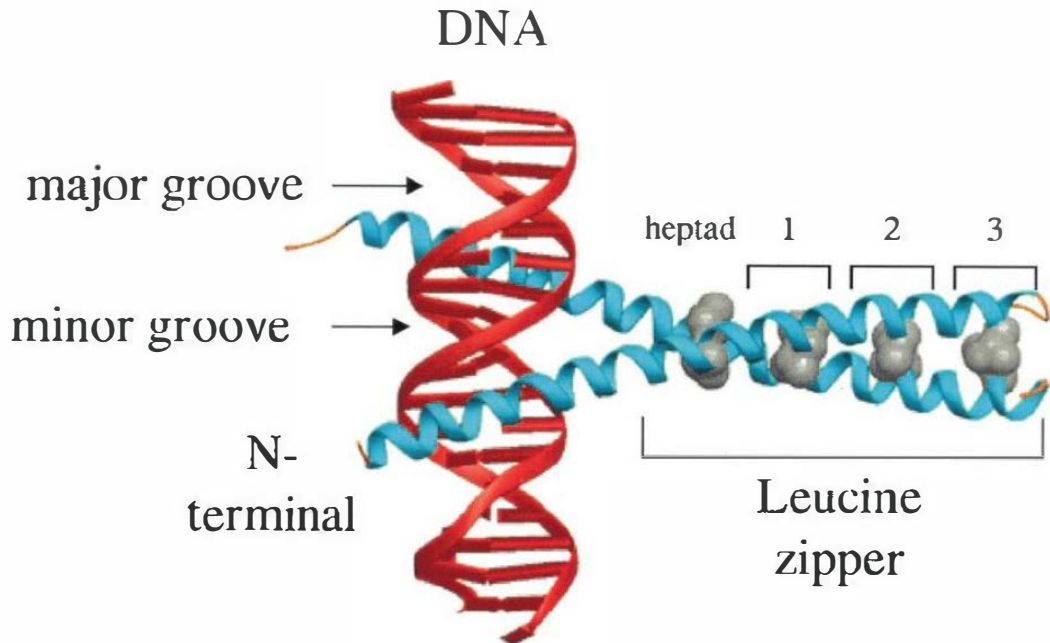


Şekil 100. Çinko Parmak Motifi ve DNA'ya Bağlanması

(https://en.wikibooks.org/wiki/Structural_Biochemistry/Zinc_fingers, 2017)

(<http://slideplayer.com/slide/7463417/>, 2017)

3. Bazık Lösin Fermuarı Proteinleri: Bu yapının ana elemanı proteinin uzun α heliks bölümündeki 4 lösin aminoasitinin arka arkaya tekrarıdır ve bunlar 1 çeşit fermuar oluştururlar. Bu proteinlerde DNA'daki büyük ve küçük oluklara bağlanır (Şekil 101).



Şekil 101. Bazık Lösin Fermuarı ve DNA'ya Bağlanması

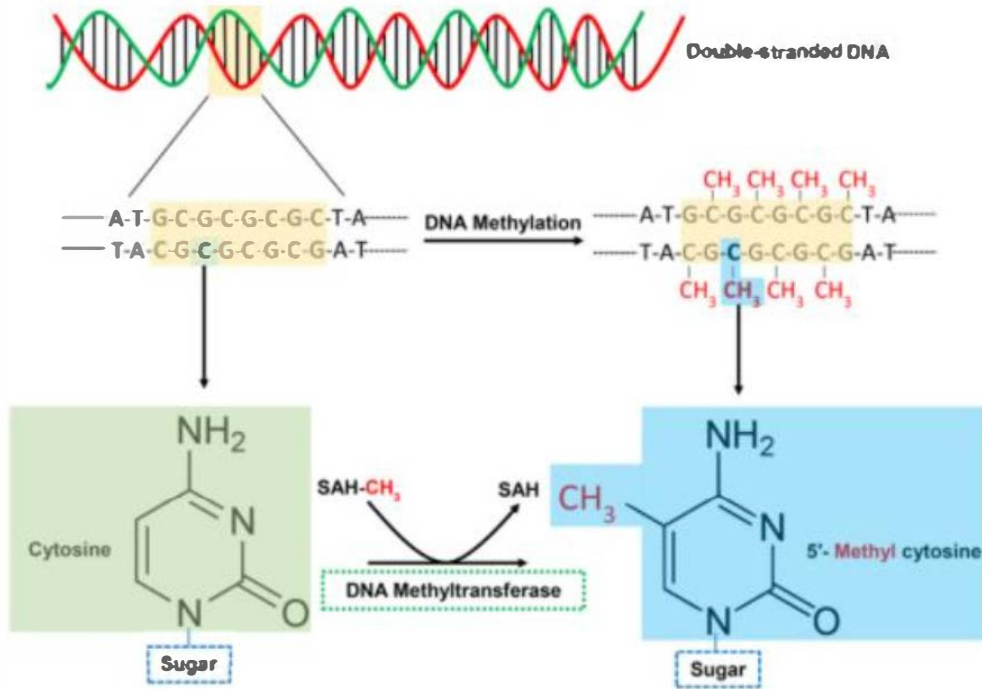
(https://www.researchgate.net/publication/10658708_Classification_of_Human_BZIP_Proteins_Based_on_Dimerization_Properties/figures?lo=1&utm_source=google&utm_medium=organic, 2002)

ÖKARYOTLARDA TRANSLASYON AŞAMASINDAKİ DÜZENLENME

Translasyonun ilk basamağında başlatıcı tRNA'nın ribozumun küçük alt birimine bağlanmasında rol alan IF2 (başlama faktörü 2) fosforile edilir. Bu durumda IF2'ye GTP bağlanması engellenir ve translasyonun başlaması baskılanır.

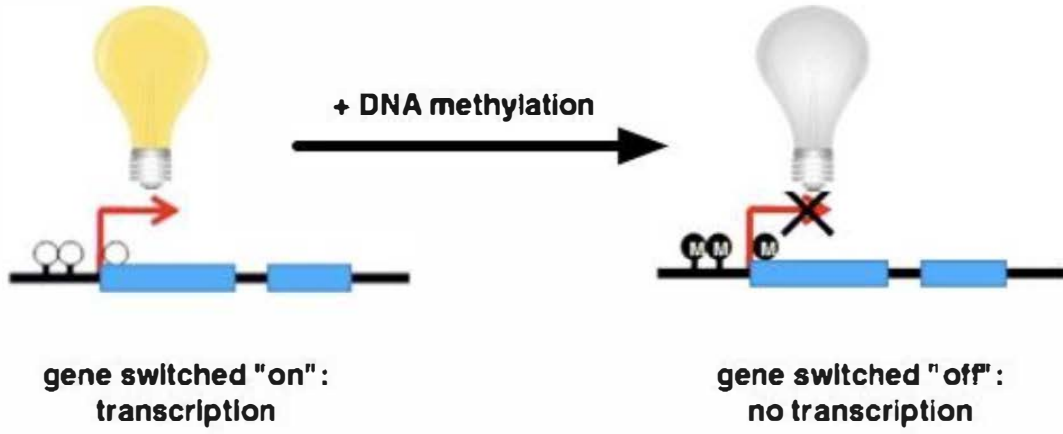
METİLYASYONU İLE DNA'NIN SESSİZLEŞTİRİLMESİ

Prokaryot ve ökaryotlarda gen ifadesinin baskılanması için genel bir mekanizmadır. DNA metil-transferaz enzimi ile metil grubu sitozine aktarılır ve sitozin, 5 metil sitozin haline gelir. Bu modifiye baz guaninin ve sitozin alanlarında fazla bulunur ve bu alanlar CpG adacıkları olarak bilinir (Şekil 102a). Bu olay genleri inaktif hale getirir ve DNA metillenmiş haldeyken transkripsiyon faktörleri DNA'ya bağlanamaz. Transkripsiyon baskılanır ve sonuçta metilasyon geldiği bölgelerde sessizleşmeye yol açar (Şekil 102b).



Şekil 102a. DNA Metilasyonu

(https://www.researchgate.net/publication/301823026_DNA_Methylation_An_Epigenetic_Insight_into_Type_2_Diabetes_Mellitus/figures?l=1, 2016)



Şekil 102b. Metilasyon ile DNA sessizleştirilmesi

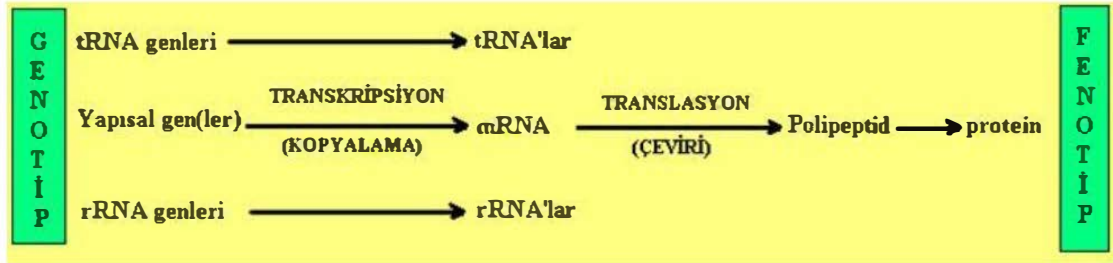
(<https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerkhome/forschungsarbeiten/lebenswissenschaftler/2011/zillner-forschungsbericht0,2011>)

KISIM 7

RİBOZOMAL PROTEİN SENTEZİ (TRANSLASYON)

Protein sentezinde 3 RNA molekülü görev yapmaktadır. Bunlardan mRNA(elçi RNA) aminoasit dizisini belirlemek için DNA'dan kopyalanmış olan genetik bilginin taşınmasında aracılık eder. tRNA (transfer RNA) mRNA' daki baz dizisine göre belirlenen aminoasiti ribozomlara taşır. rRNA (ribozomal RNA) ribozomların yapısına katılırlar ve aminoasitler arasındaki peptit bağlarının oluşumunda rol alırlar (Şekil 103).

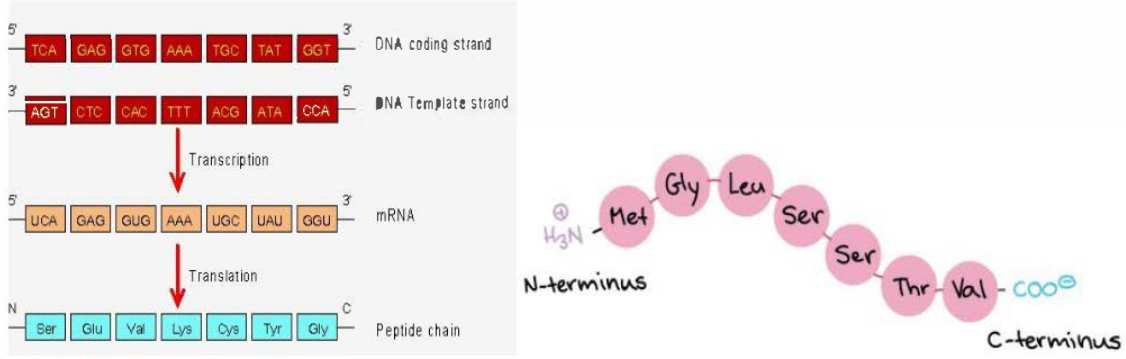
Gen Anlatımı



Şekil 103. Gen Anlatımı

(<http://slideplayer.biz.tr/slide/2921381/>, 2017)

Translasyon, bir mRNA'daki baz dizisini kullanarak bir proteindeki aminoasitin dizilmesi ve birleştirilmesinde kullanılan işlemlerin tamamı olarak bilinir yani kısaca mRNA'nın kontrolü altında meydana gelen polipeptid sentezidir. DNA' nın kopyalanan kolunun 3' ucundan başlanarak transkribe edilen RNA 5' ucundan 3' yönüne doğru okunur (5'→3'). Protein sentezi sırasında her aminoasit, bir önceki aminoasitin karboksil grubuna tek tek eklenir ve protein sentezi amino ucundan karboksil ucuna doğru ilerler (Şekil 104).



Şekil 104. Translasyon ile Protein Sentezi

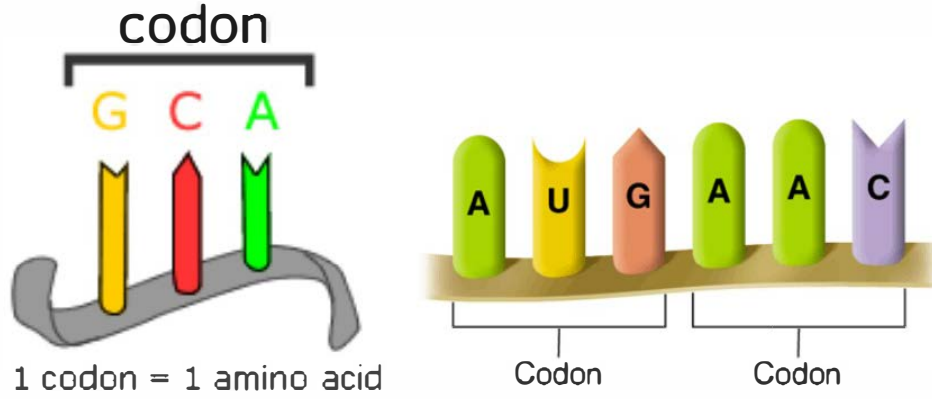
(<https://blog.udemy.com/mrna-sequence/>, 2014)

(<https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/the-stages-of-translation>, 2017)

GENETİK KOD (GENETİK ŞİFRE)

RNA; U, C, G, A bazı içerirken DNA; T, C, G, A bazlarını içermektedir. Eğer her nükleotid bir aminoasiti belirleseydi 20 aminoasitten sadece 4'ü kopyalanabilirdi ($4^1=4$). Eğer 2 nükleotitlik bir grup kullanılsaydı o zaman $4^2=16$ kodon oluşturabilir bu da 16 aminoasit demektir. Oysaki doğada canlı yapısında yer alan temel 20 aminoasit vardır. 3 nükleotitten oluşan bir grup kullanılırsa $4^3=64$ kodon meydana gelebilir. Dolayısıyla 3 nükleotitten oluşan gruplar 20 aminoasiti kodlamak için yeterlidir. Protein sentezini yönlendiren mRNA dizisi triplet (3 bazlık) kodonlar halindedir. Her bir triplet bir kodondur (Şekil 105).

Kodon: RNA üzerinde bir aminoasiti kodlayan 3'lü baz grubuna denir.



Şekil 105.3 Nükleotitten Oluşan Kodon bir Aminoasidi Kodlamaktadır

(https://evolution.berkeley.edu/evolibrary/search/imagetdetail.php?id=284&topic_id=&keywords=, 2017)

(https://moodle.cisd.k12.pa.us/district_videos/Biology/iText/products/0-13-115540-7/ch12/ch12_s3_5_pr.html, Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., as publishing pearson prentice hall, 2004)

Genetik kod Tablosu

64 kodondan 61 tanesi 20 aminoasiti belirlemektedir (Tablo 6). Bunlardan 3 tanesi stop (dur kodonu) kodonudur, anlamsız kodonlardır ve hiçbir aminoasiti kodlayamazlar. Bu stop kodonları UAG, UAA, UGA kodonlarıdır.

UAG: amber kodunu, UAA: ochre kodunu, UGA: opal kodunu olarak da isimlendirilmiştir.

Genetik kodun en önemli özelliği dejenere olmasıdır. Yani belirli bazı aminoasitler birden fazla kodon tarafından kodlanabilirler. Örneğin; Arjinin, lösin ve serin aminoasitlerinin herbiri için 6 kodon alenin ve glisin için 4 kodon vardır. Yalnızca methionin ve triptofan için tek bir kodon vardır. Tüm ökaryot ve prokaryotlarda protein sentezi AUG kodonu ile başlamakta ve bu kodon methionin kodonudur (Tablo 6). Dolayısıyla protein sentezi tüm canlılarda methioninle başlar.

Tablo 6. Genetik Kod Tablosu

		Second letter				
		U	C	A	G	
First letter	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } UCC } Ser UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA STOP UAG STOP	UGU } Cys UGC } UGA STOP UGG Trp	U C A G
	C	CUU } CUC } Leu CUA } CUG }	CCU } CCC } Pro CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } Arg CGA } CGG }	U C A G
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG Met	ACU } ACC } Thr ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	U C A G
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } GCC } Ala GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } GGC } Gly GGA } GGG }	U C A G

Key:

Ala = Alanine (A)
 Arg = Arginine (R)
 Asn = Asparagine (N)
 Asp = Aspartate (D)
 Cys = Cysteine (C)
 Gln = Glutamine (Q)
 Glu = Glutamate (E)
 Gly = Glycine (G)
 His = Histidine (H)
 Ile = Isoleucine (I)
 Leu = Leucine (L)
 Lys = Lysine (K)
 Met = Methionine (M)
 Phe = Phenylalanine (F)
 Pro = Proline (P)
 Ser = Serine (S)
 Thr = Threonine (T)
 Trp = Tryptophan (W)
 Tyr = Tyrosine (Y)
 Val = Valine (V)

(<https://www.quora.com/What-are-triplet-codons>, 2016)

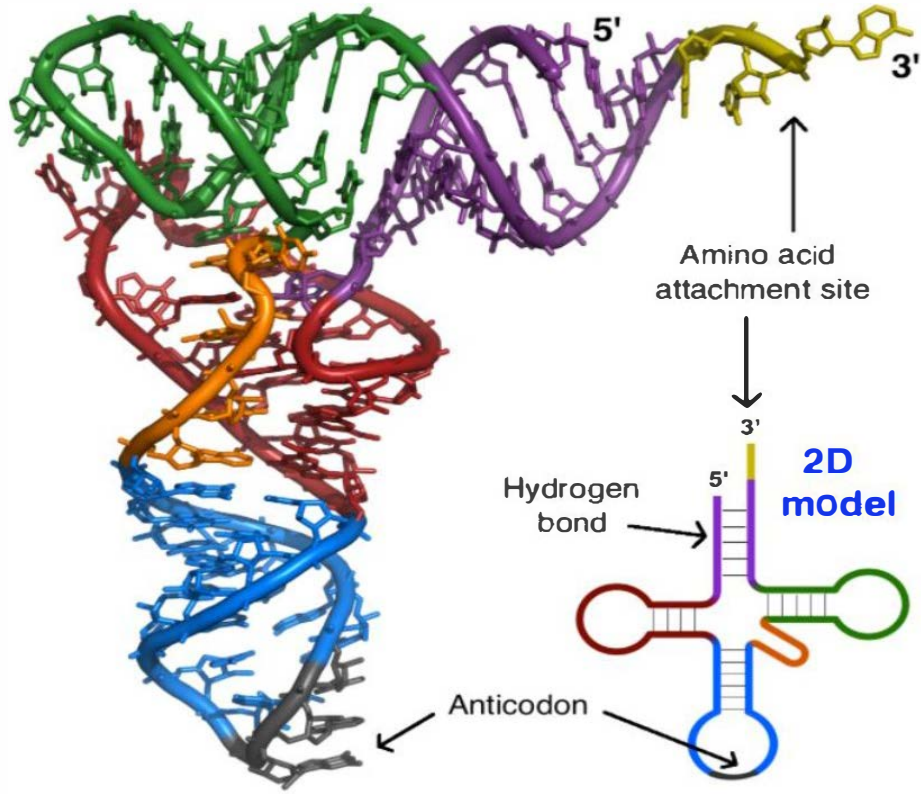
Genetik kod tüm canlılarda aynı olduğu için evrenseldir ancak mitokondri hariç tutulur, çünkü UGA stop kodonu iken mitokondri DNA'sında triptofan kodonu, nükleer DNA'daki arjinin kodonları olan AGG ve AGA, mitokondri DNA'sında stop kodonudur.

PROTEİN SENTEZİ İÇİN GEREKLİ OLAN KÖPLEMENTLER

- tRNA
- Ribozomlar
- mRNA
- Aktive edici enzimler
- Protein faktörleri
- ATP ve GTP (Enerji kaynakları)
- Magnezyum iyonları (Mg^{+2})

tRNA'nın Yapısı ve Fonksiyonu

Translasyonda yapısındaki antikodonlara uygun aminoasitleri ribozomlara taşıyan moleküldür. tRNA'lar 70-80 nükleotit uzunluğundadırlar. Üç boyutlu yapıları incelendiğinde yonca yaprağına benzediği görülmüştür (Şekil 106).

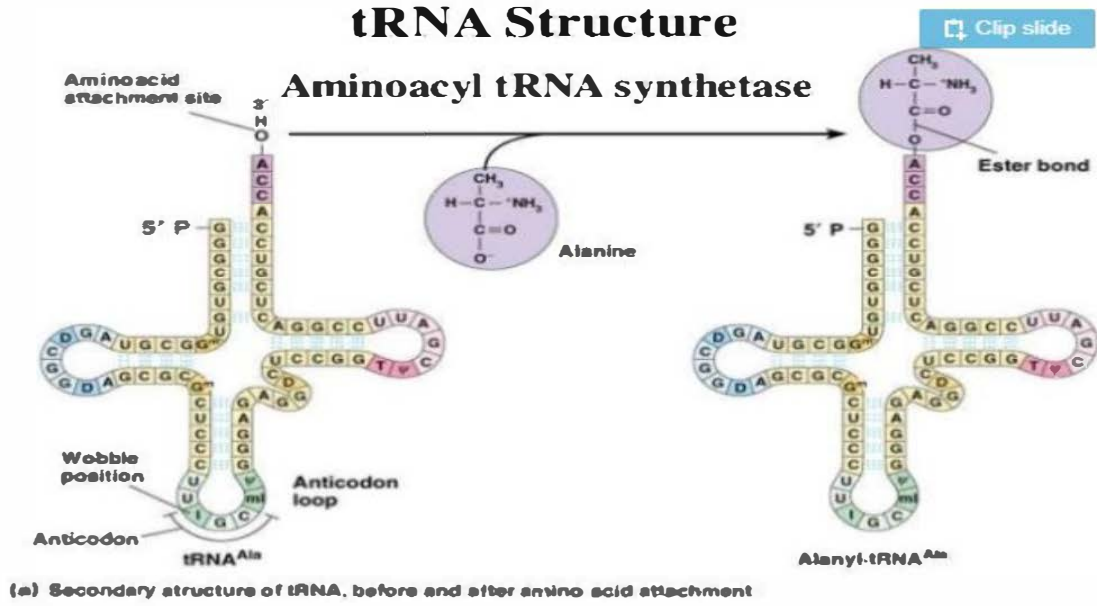


Şekil 106. tRNA'nın Yapısı

(<https://www.khanacademy.org/science/biology/gene-expression-central-dogma/translation-polypeptides/a/tRNA-and-ribosomes>, 2017)

Bu yapıda 4 kol bulunmaktadır. Bunlar:

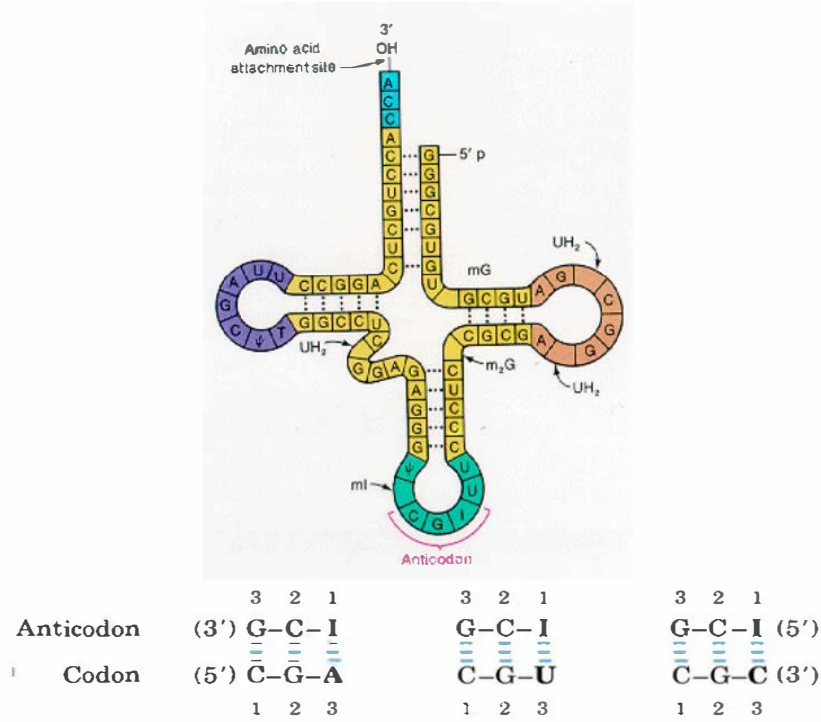
- 1- Aminoasit bağlanma kolu: Bu kol tRNA'nın 3' ucunda yer alır. 3' ucunda CCA nükleotitleri bulunur. Her aminoasitin karboksil grubu ile Adenin 3' OH grubu arasında ester bağı ile buraya bağlanır (Şekil 107).



Şekil 107. Aminoasit Bağlanma Kolu

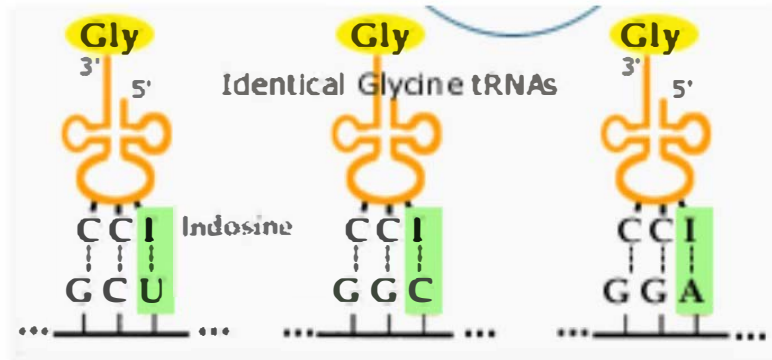
(<https://www.slideshare.net/junaidmunir3/dna-rna-protein-central-dogma>, 2017)

- 2- D(dihidroüridin) kolu: Aminoasit sentetaz enziminin bağlandığı yerdir (Şekil 108).
- 3- TΨC (Pseudoüridin, T kolu)kolu: Ribozoma tRNA'nın bağlanmasını sağladığı ileri sürülmüştür (Şekil 108).
- 4- Antikodon kolu: mRNA'daki ilgili kodonla baz çifti oluşturur. tRNA'da mRNA'ya karşılık gelen kodondur. Kodon-antikodon birleşmesinde mRNA'daki kodon ile tRNA'daki antikodon arasında geçici zayıf Hidrojen bağları kurulmaktadır (Şekil 108).



Şekil 109. İnosin Bazı İçeren Antikodon Kolu ve Wobble Eşleşmesi

(<http://biology.kenyon.edu/courses/biol114/Chap05/Chapter05.html>, 2017)
 (<http://biochem4.okstate.edu/~firefly/Bioch205/Bioch205clmfolder/b205clm23/proteinsynthesis.htm>, 2005)



Şekil 110. Wobble Eşleşmesi

(https://www.nobelprize.org/educational/medicine/dna/a/translation/tma_wobble.html, 2017)

Ayrıca tRNA'daki antikodounun ilk bazı U, C, A ve G ise bu durumda da mRNA'daki kodon 3. bazı farklı bazlarla eşleşerek farklı kodonların tanınmasını da sağlamaktadır (Tablo 7).

Tablo 7. Wobble eşleşmeleri

Table 30.7. Wobble pairing.

Anticodon (first base)	Codon (third base)
U	A, G
C	G
A	U
G	U, C
I (inosine, resembles G)	U, C, A

(http://www.biocyclopedia.com/index/genetics/the_genetic_code/wobble_hypothesis.php, 2012)

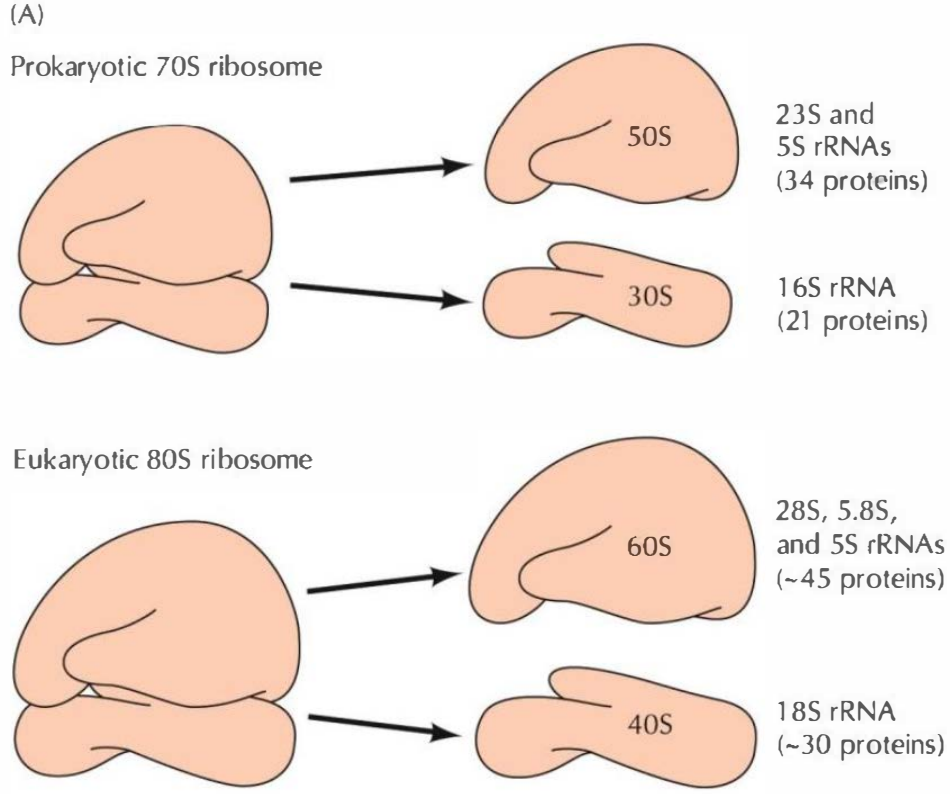
Wobble Hipotezi'nin özeti:

- Bir mRNA kodonundaki ilk 2 baz (1. ve 2. bazlar) tRNA'daki antikodonla her zaman güçlü baz eşleşmesi yapar.
- Antikodondaki 1. baz (gevşek baz) kodondaki 3. bazla eşleşir. Bu 1. baz tRNA tarafından tanınan kodonların sayısı belirler.
- Tüm 61 kodonun translasyonu (proteine çevrimi) için minimum 32 tRNA gereklidir.

Ribozomların Yapısı ve Fonsiyonu

Prokaryotlarda ve ökaryotlarda bulunan ribonükleoprotein yapısında olup bütün hücrelerin sitoplazmasında, mitokondri matriksinde ve kloroplastta bulunan proein sentezleyen makinalardır. Bütün organizmalarda küçük ve büyük alt birimlerden oluşur. Prokaryotlarda küçük alt birim 30S, büyük alt birim 50S olup, bunlar birleşerek 70S ribozomu oluştururlar. Ökaryotlarda küçük alt birim 40S, büyük alt birim 60S olup bunlarda 80S ribozomu oluştururlar (Şekil 111). Buradaki S (Svedberg birimi) ağırlık birimi her alt birimin farklı rRNA ve proteinlerden kaynaklanan santrifüjlemedeki çökeltme hızlarını gösteren sedimentasyon sayısı

sıdır (çökelme katsayısı) yani S =Svedberg birimi olup, molekülün büyüklüğüne göre ultrasantrifüjdeki çökme hızıdır.

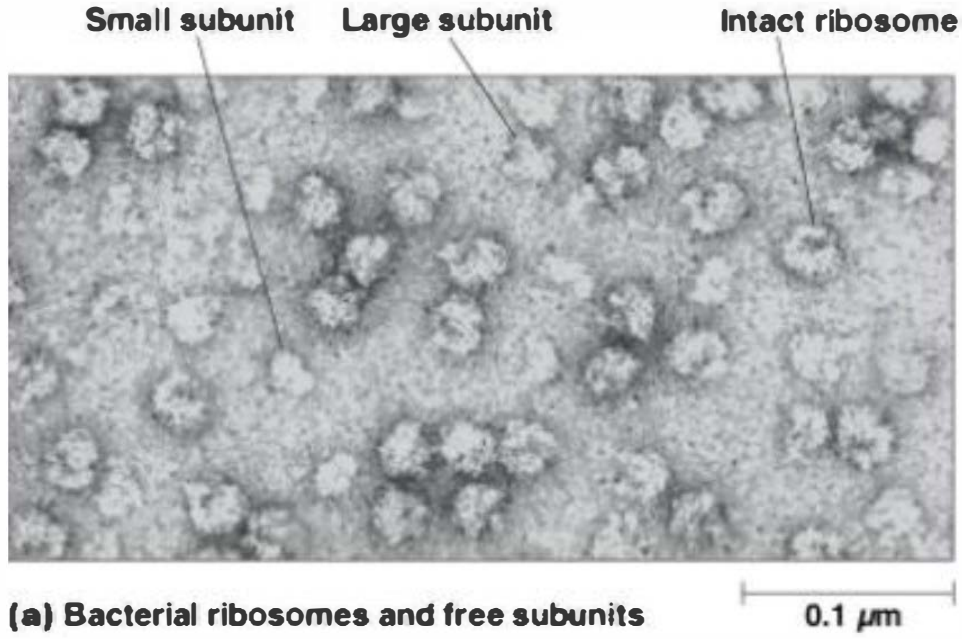


THE CELL, Fourth Edition, Figure 8.4 (Part 1) © 2006 ASM Press and Sinauer Associates, Inc.

Şekil 111. Prokaryotik ve Ökaryotik Ribozom Yapıları

(<http://ribosomesrule.blogspot.com.tr/2015/10/ribosomes.html>, 2015)

Ribozomun alt birimleri sitoplazmada serbest haldedir, protein sentezi sırasında büyük ve küçük alt birimler birleşerek 70S/80S yapısını oluşturmaktadırlar (Şekil 112).

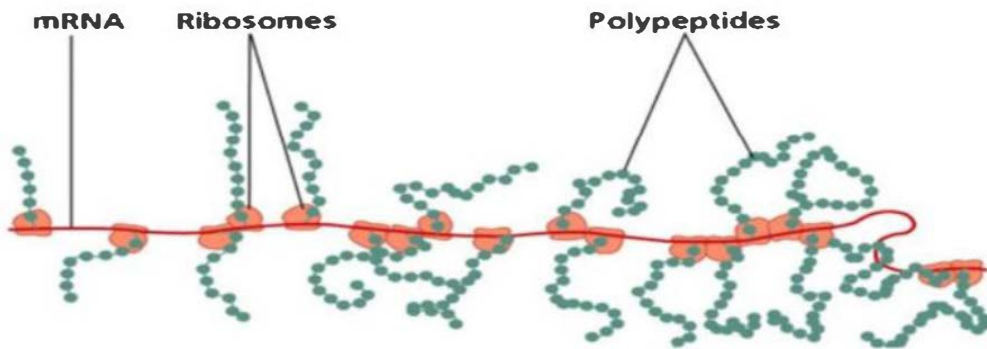


Şekil 112. Bakteriyel Ribozomlar ve Serbest Alt Birimleri

(<https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/CB22.html>, 2015)

Protein sentezi sırasında ökaryot ve prokaryotlarda ribozomlar bir tek mRNA zincirine bir ipe takılmış boncuk dizisini andırır şekilde bağlanırlar. Bu yapıya poliribozomlar veya polizomlar denir. Böylece yapısal bir düzen içerisinde bir mRNA'dan birçok polipeptit zinciri aynı anda sentezlenmektedir (Şekil 113).

Polyribosome

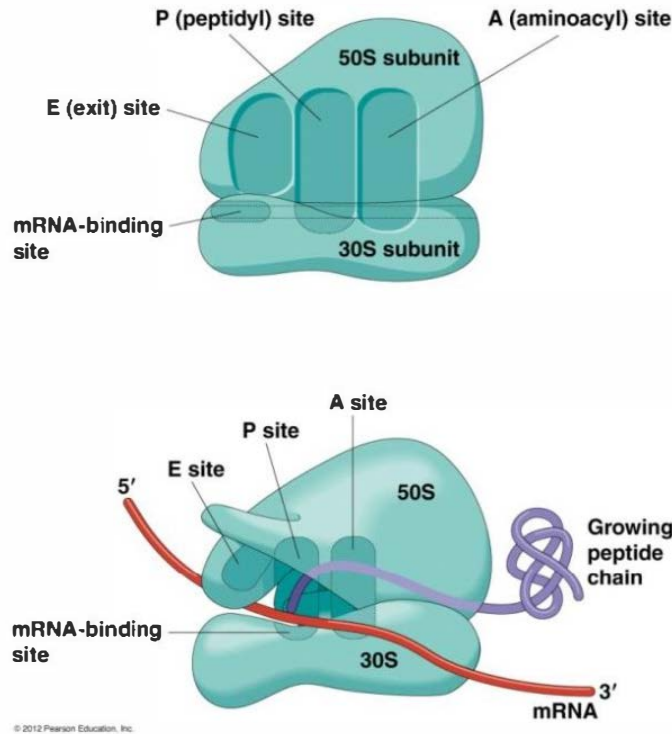


Şekil 113. Poliribozom Yapısı

(<http://slideplayer.com/slide/8682952/>, 2017)

Ribozom üzerinde 4 alan bulunur (Şekil 114). Bunlar;

- 1- mRNA bağlanma alanı: mRNA'nın translasyon için 30S'lik alt üniteye yerleştiği bölgedir.
- 2- A (Aminoasil-tRNA bağlanma alanı) alanı: Amino asitlerle bağlanmış olan spesifik tRNA'ların antikodonlarının, 30S alt üniteye mRNA üzerinde sırada bulunan bazlarla birleştiği bölgelerdir. Bu bölge hem 50S ve hem de 30S alt üniteye bulunur.
- 3- P (Peptidil-tRNA bağlanma alanı) alanı: A bölgesinde özel tRNA ile bağlı bulunan aminoasitlerin, bu bölgeyi boşaltmak için aktarıldıkları bölgedir. Bu bölge hem 50S ve hem 30 S'lik alt üniteye bulunur.
- 4- E (Exit: çıkış) alanı: P alanından ayrılan aminoasid taşımayan boş tRNA'nın 50S'lik alt üniteden çıkış yeri.

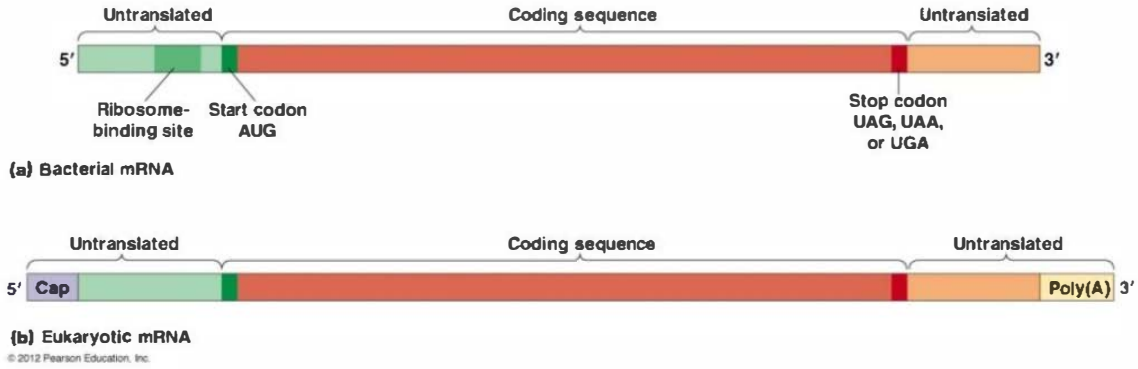


Şekil 114. Ribozomda Bulunan Alanlar

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_02.jpg, 2012 Pearson Education Inc, 2012)

mRNA'nın Yapısı

Prokaryotik mRNA'nın sitoplazmadaki ömrü 1-3 dakikadır ve bu yüzden çok dayanıksızdır. Translasyon başladıktan hemen sonra 5' ucundan parçalanmaya başlar. Ökaryotik mRNA ise 5' ucundaki şapka yarısı ve 3' ucundaki poli A kuyruğundan dolayı saatlerce dayanır (Şekil 115). Bu yapılar mRNA'yı sitoplazmadaki nükleazlara karşı korumaktadır. Prokaryotik DNA'larda sentezlenen mRNA'lar 2 ya da daha fazla polipeptit zincirin sentezinden sorumludurlar. Bu mRNA'lara polisistronik veya poligenik mRNA adı verilir. Ökaryotlarda ise DNA'lardan sentezlenen mRNA'lar bir tek polipeptit zincirine kalıplık yaparlar. Yani polipeptit zincirin sentezinden sorumludur. Bu mRNA'lara da monosistronik veya monogenik mRNA denir.



Şekil 115. Prokaryot ve Ökaryotik mRNA Yapısı

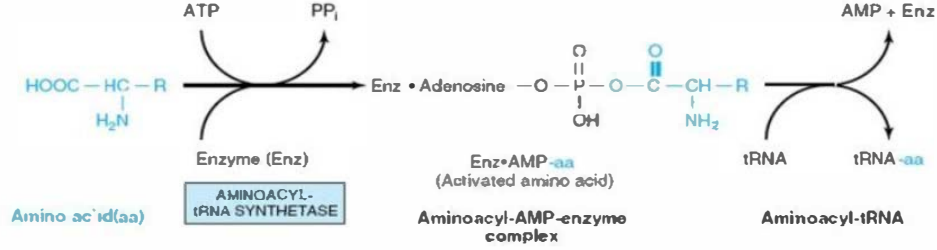
(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_06.jpg, 2012 Pearson Education Inc, 2012)

PROTEİN SENTEZİNİN AŞAMALARI

Aminoasitlerin Aktivasyonu

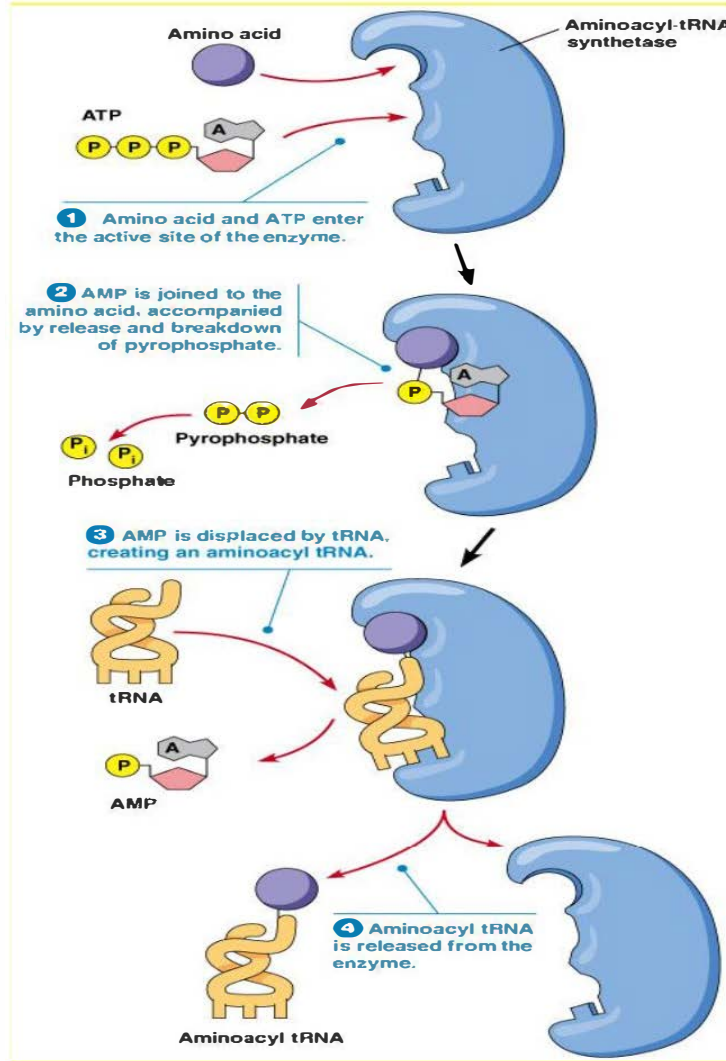
Hücre sitoplazmasında bulunan 20 aminoasitin herbiri kendine özgül olan tRNA' larla esterleşmektedir. Esterleşmeye aminoasıl tRNA sentetaz enzimi gerçekleştirir. 20 aminoasit için 20 farklı sentetaz enzimi vardır. Bu enzim magnezyuma ihtiyaç duyar. Enzim tRNA'ya bir aminoasit ekler bu enerji gerektiren bir olaydır ve ATP kullanılır (Şekil 116a ve b).

Activation of amino acid



Şekil 116a. Aminoasitlerin Aktivasyonu

(<http://slideplayer.com/slide/4343392/>, 2017)



Şekil 116b. Aminoasitlerin Aktivasyonu

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_05.jp, 2012 Pearson Education Inc, 2012)

Protein sentezi 4 aşamalarda gerçekleşmektedir;

- 1- Başlama
- 2- Uzama
- 3- Sonlanma
- 4- Sentez sonrası modifikasyonlar

1- Başlama: Prokaryotik hücrelerde sentezin başlaması için gerekli bileşenler;

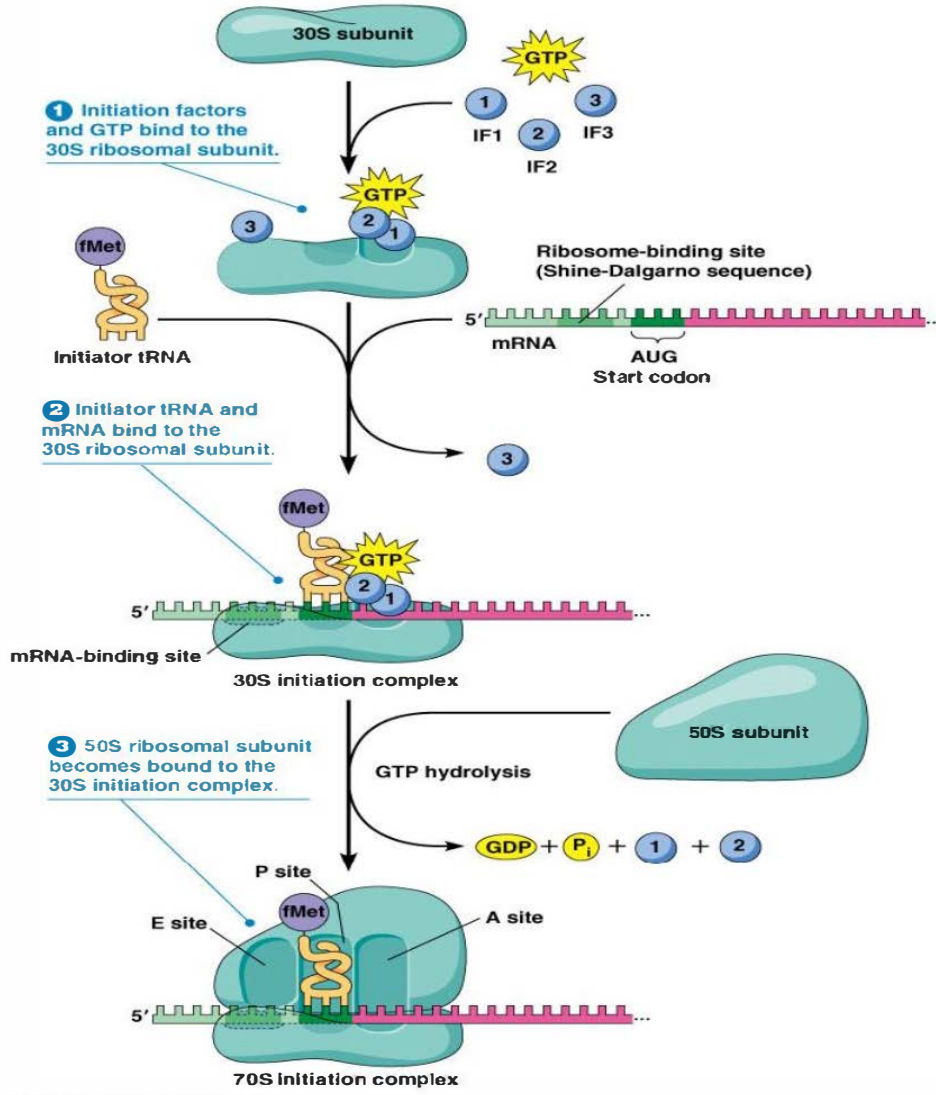
- 16S rRNA ihtiva eden 30S alt ünitesi
- Belli bir polipeptin şifresini taşıyan mRNA
- Sentezin bağlanmasını sağlayarak N- formilmethionin-tRNA(fmet_t RNA)
- Başlama Faktörleri (IF 1-2-3)
- GTP enerjisi

Sentezin başlaması 3 aşamada gerçekleşir (Şekil 117);

- 1-** Başlama faktörü IF-3 30S ile birleşir. Bu birleşme 30S ve 50S ünitelerini birbirine bağlanmasını engellemektedir. Daha sonra yapıya IF-1 ve GTP taşıyan IF-2 katılır (Tüm faktörler 1. aşamada 30S'e bağlanır) (Şekil 117).
- 2-** 30S alt ünitesine mRNA ve başlangıç tRNA'sı bağlanır. Bu sırada IF-1 ve IF-3 ortama salınır. IF-2 ise halen 30S'e bağlıdır. mRNA'nın başlama kodonu olan AUG kodonu ribozomun üzerinde tam başlangıç aminoasiti taşıyan tRNA'nın bağlanacağı noktaya bağlanır (Şekil 117). Bu bağlanma 1974 yılında Shine ve Dalgarno adlı 2 araştırmacı tarafından *E.coli* ile yaptıkları çalışmalar sonucunda açıklanmıştır. Bu bilim insanları, mRNA' da başlama kodonunun üst kısmında 3 ile 9 arasında pürince zengin bir bölgenin olduğunu ve bu bölgenin 30S'teki 16S rRNA'nın pirimidince zengin dizisiyle eşleştiğini bulmuşlardır (Şekil 118a). Yani mRNA'daki pürince zengin diziyle 16S rRNA'daki pirimidince zengin dizinin baz çifti yaptığı ve bu bağlamanın tam olarak başlama kodonuna gelecek şekilde

olduğunu saptamışlardır. Bulucularının adından dolayı mRNA'nın ribozoma bağlandığı alan **Shine-Dalgarno Dizi-si** olarak bilinmektedir. Ökaryotlarda da böyle bir dizinin olduğu ve buraya da bulucusunun adından dolayı **Kozak Dizisi** (5'ACCAUGG3') denir (Şekil 118b). Ökaryotlarda protein sentezi methionin ile başlarken/ prokaryotlarda formillenmiş methioninle başlar (Şekil 119).

- 3-** 50S büyük ünitenin 30S'e bağlanmasıdır. Bu enerji gerektiren bir olaydır. GTP kullanılır. Böylece 70S başlama kompleksi oluşur ve IF faktörleri ortama salınır (Şekil 117).



Şekil 117. Protein Sentezinin Başlama Aşamaları

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_08.jpg, 2012)

The diagram illustrates the interaction between an mRNA molecule and a 16S rRNA molecule. The mRNA sequence is shown as a horizontal bar with the sequence CAUCCUAAGGAGGUUUGATCCUAUGCG. The 16S rRNA sequence is shown as a blue curved bar with the sequence AUUCCUCCA. The Shine-Dalgarno sequence (AGGAGGU) is highlighted in yellow and is shown base-pairing with the 16S rRNA sequence (AUUCCUCCA). The start codon (AUG) is highlighted in green. Labels include 'mRNA', 'Shine-Dalgarno sequence', 'Start codon', '5'', '3'', and '16S rRNA'.

(<http://dnaofbioscience.blogspot.com.tr/2016/05/what-is-shine-dalgarno-sequence.html>, 2016)

5' AGCACGAGGGGAAAUCUGAUGGAACGCUAC E. coli trpA
UUUGGAUGGAGUGA AACGAUGGCGAUUGCA E. coli araB
GGUAAACAGGUAA C AACCAUGCGAGUGUUG E. coli thrA
CAAUUCAGGUGUGAAGUGUAAAACCA GUA E. coli lacZ
AAUCUU CGAGGCUUUUUU AUGGUUCGUUCU 6X174 phage A protein
UAACUAAGGAUGAA AUGC AUGUCUAAGACA Qβ phage replicase
UCCUAGGAGGUUUG ACCU AUGCGAGCUUUU R17 phage A protein
AUGUACUAAGGAGGUUGU AUGGAACAACGC λ phage cro

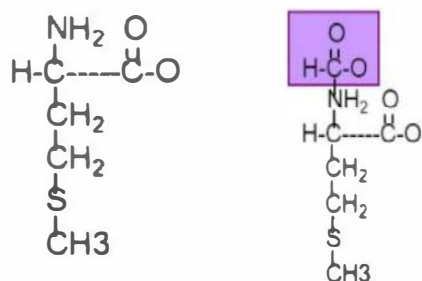
5' - AGGAGGACAGCUAUG - 3'

RBS spacer initiator

5' - A/GCCACCAUGG - 3'

RBS | initiator

(http://www.powershow.com/view1/19e8e2-ZDc1Z/Shine_Dalgarno_sequence_powerpoint_ppt_presentation, 2017)
(<http://dnaofbioscience.blogspot.com.tr/2016/05/what-are-kozak-sequences.html>, 2016)



N - formyl - methionine

(<http://slideplayer.com/slide/8063831/>, 2017)

2- Uzama

mRNA daima 5'→3' yönüne doğru okunur ve protein sentezi daima en baştaki amino asitin NH₂-ucundan (amino) → en sondaki aminoasidin COO-ucuna (karnoksil) doğru yapılmaktadır.

Zincir uzamasında uzama faktörleri görev yapar. Bunlar; EF- Tu, Ts, G'dir ve

Uzama 3 aşamada gerçekleşir (Şekil 120a).

1- Aminoasit taşıyan bir tRNA' nın A bölgesine bağlanması

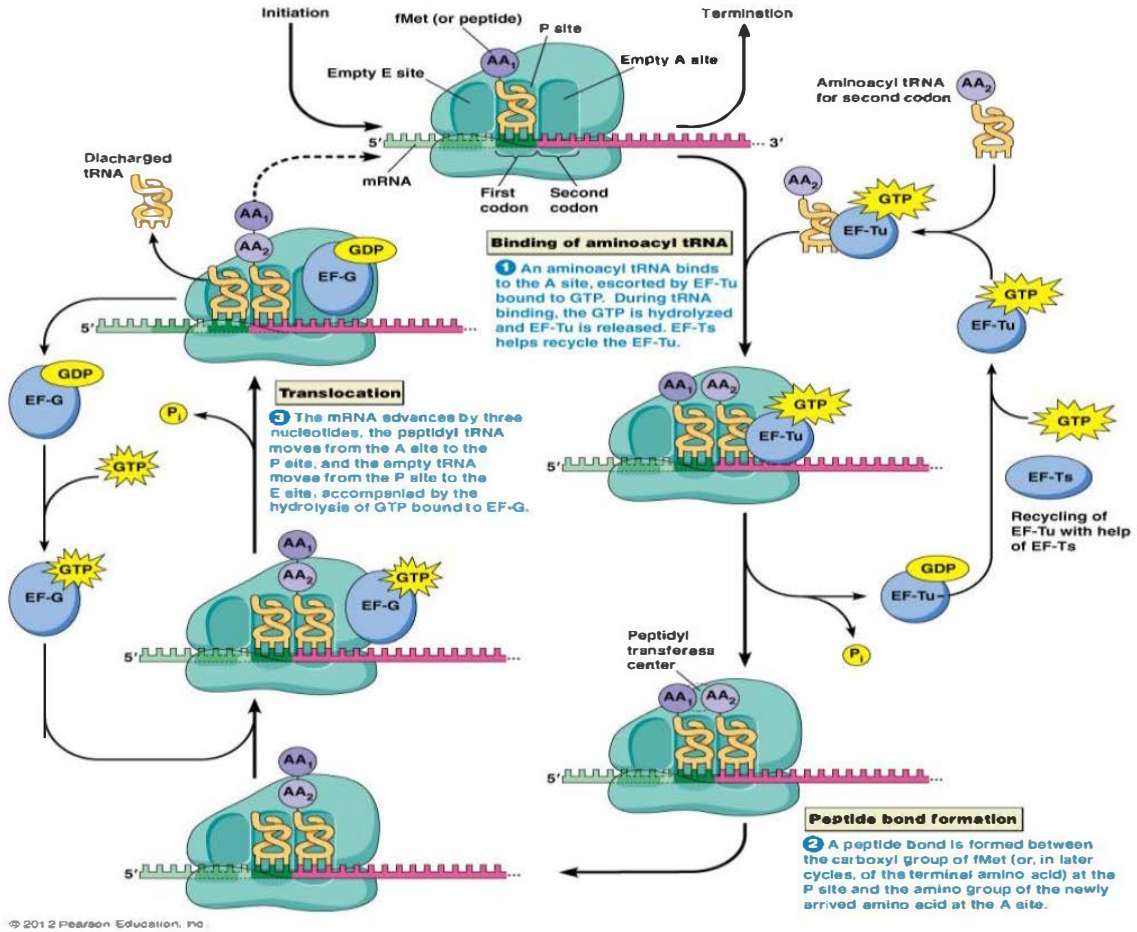
2- Peptit bağının oluşumu

3- Translokasyon

1. Aminoasit taşıyan tRNA' nın A bölgesine bağlanması: Burada GTP taşıyan EF-Tu, aminoasit taşıyan tRNA'ya bağlanır. Sonra bu kompleks ribozomdaki A bölgesine taşınır. mRNA'daki AUG başlama kodonu ribozomun P bölgesine yerleşmiştir. 2. Kodon yani başlama kodonundan sonraki kodon A bölgesine yerleşmiştir. Aminoasit taşıyan tRNA EF-Tu+GTP kompleksi A bölgesine bağlanırken enerji harcanır ve GTP, GDP+ P_i'a parçalanır. Bu GDP, EF-Ts tarafından tekrar GTP' ye dönüştürülür (Şekil 120a).

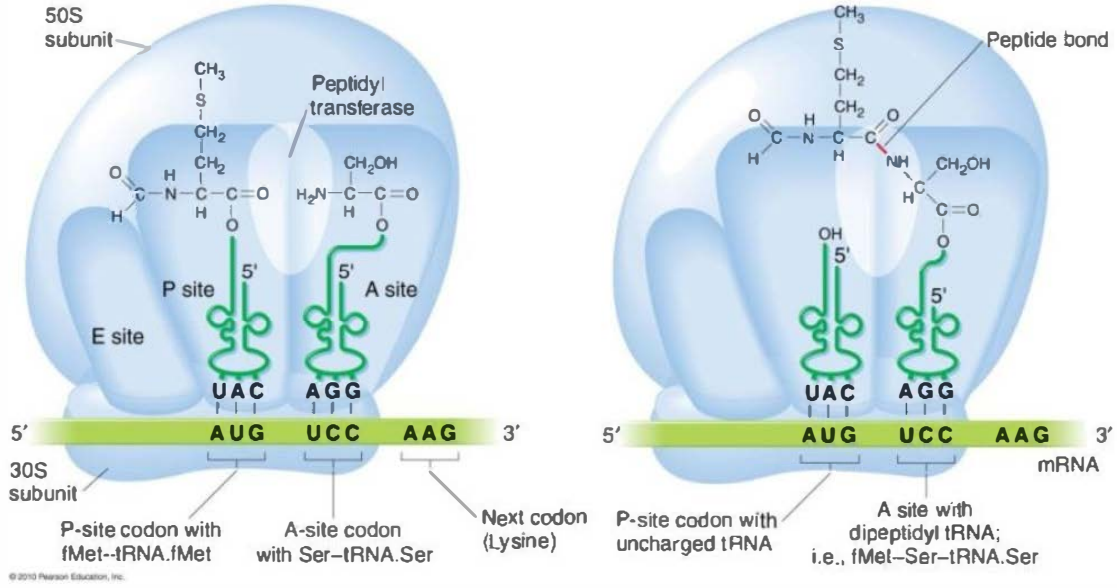
2. Peptit bağının oluşumu: Bu iki aminoasit arasında peptit bağının oluşmasıdır. Ribozomun P bölgesindeki tRNA'daki amino grubu formillenmiş, karboksil ucu ise tRNA' daki adeninin 3'OH grubuyla esterleşmiştir. 2. kodona bağlanmış olan tRNA'nın 3'OH grubuna bağlı olan aminoasitin amino grubu serbesttir. Ribozomun 50S alt ünitesinde bulunan peptidil transferaz enzimi 2. aminoasitin amino grubu ile 1. aminoasitin arasında peptit bağını oluşturur. Bu bağın oluşması ise ester bağının kırılması ile oluşur (Şekil 120a ve b). Daha sonraki zincir uzamasında yeni gelen aminoasitin amino grubu ile daha önceden zincire katılmış olan aminoasitin karboksil grubu arasında peptit bağı oluşur.

3. Translokasyon: Ribozomun mRNA' da 1 kodon ilerlemesi-ne translokasyon denir. Peptit bağı oluşuktan sonra P bölgesinde aminoasitini kaybetmiş tRNA bulunur. A bölgesi ise peptidil tRNA içerir. Bu aşamada ribozom mRNA'nın 3' ucuna doğru 1 kodon ilerler. Ribozomun mRNA üzerindeki hareketi EF-G ile sağlanır. Hareket mekanizması tam olarak bilinmez. Bu hareket enerji gerektirir ve GTP kullanılır. Bu hareket A bölgesindeki peptidin tRNA'yı P bölgesine kaydırır ve boş tRNA P bölgesinden E bölgesine hareket eder ve ribozomdan salınır. A bölgesine yeni gelecek olan aa_tRNA bağlanır ve zincir uzar (Şekil 120a).



Şekil 120a. Protein Sentezinin Uzaman Aşamaları

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/Biol2060/Biol2060-22/22_10.jpg, 2012)



Şekil 120b. Peptit Bağının Oluşumu

(https://www.mun.ca/biology/scarr/iGen3_06-18_simple.html, 2010 Pearson Education, Inc, 2010)

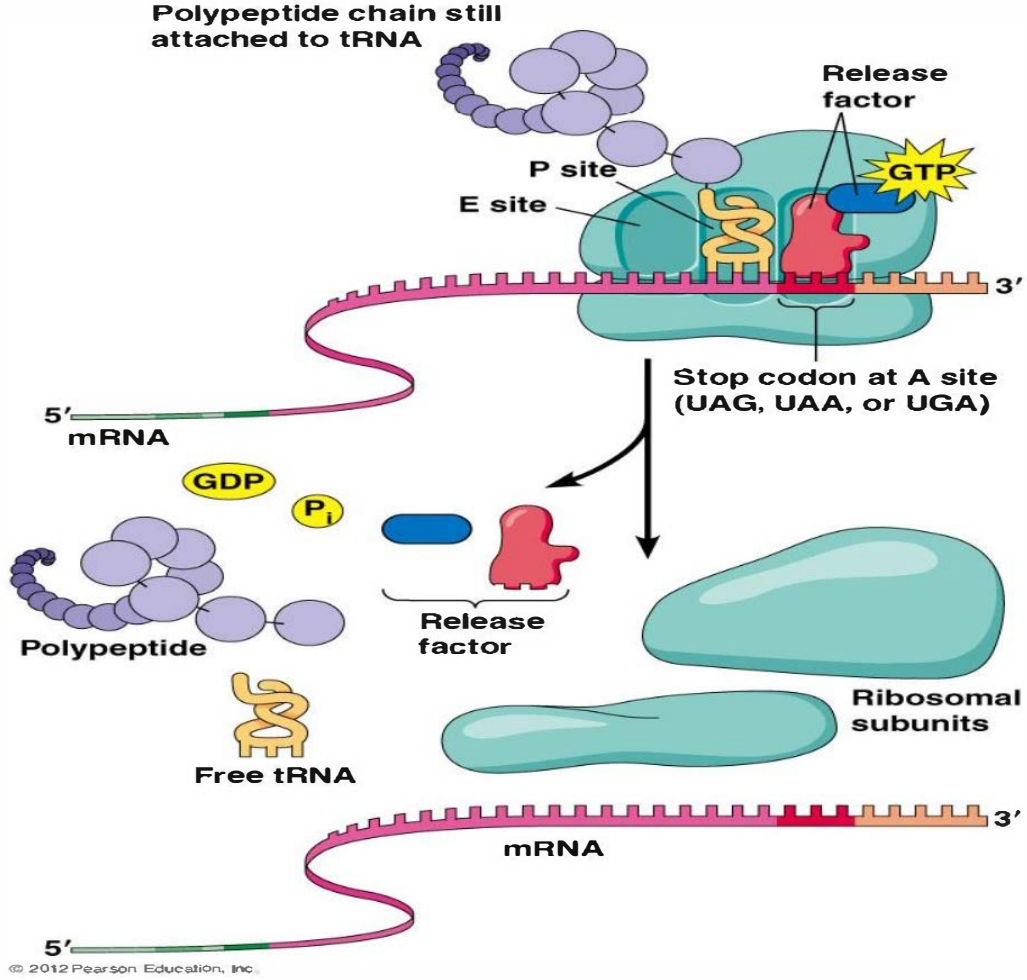
3- Sonlanma

Zincirin uzama safhası sonuncu kodona kadar devam eder ve mRNA üzerinde UAA, UGA, UAG kodonlarından bir tanesine gelindiğinde sentez sona erer. Çünkü bu kodonlar hiçbir aminoasiti kodlayamayan anlamsız kodonlardır ve bunlara stop(dur) kodonu denir. Sentezin sonlanmasında iki sonlandırma faktörleri işlev görür (release factors: RF1 and RF2). Bunlarda RF1 → UAA, UAG kodonlarını, RF2 → UAA, UGA kodonlarını tanıır. Bunların yardımı ile son tRNA polipeptit zincirinden koparılır. 70S ribozom; 30S ve 50S alt ünitelere ayrılır (Şekil 121).

Protein sentezi çok hızlı cereyan eder önemli bir mekanizmadır. *E. coli* 400 aminoasitlik bir polipeptiti 10 sn'de gerçekleştirmektedir.

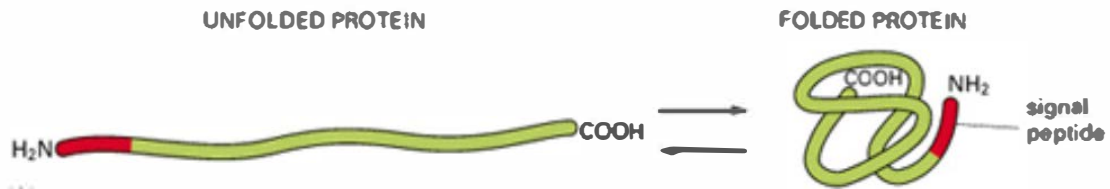
Sentezlenen proteinlerin N terminalinde 15-30 aminoasit arasında değişen sinyal peptidi bulunur (Şekil 122a). Bu peptit sentezlenen proteinin nereye gideceğini belirler. Proteinin görev yapacağı yere ulaştıktan sonra sinyal peptidi enzimatik olarak uzaklaştırılır (Şekil 122b).

Sentezlenen protein ya sitoplazmada kalır ya da organelere taşınır ve orada görev yaparlar (Şekil 122c).



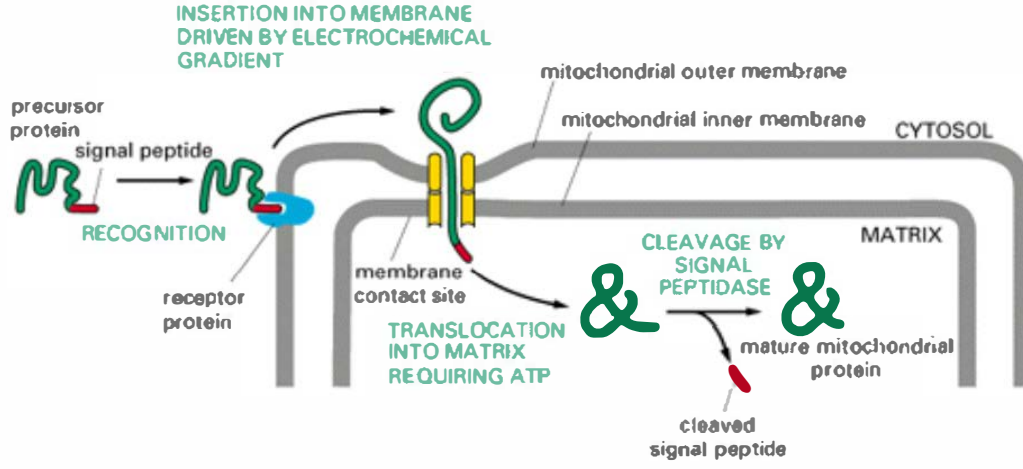
Şekil 121. Protein Sentezinin Sonlanması

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_11.jpg, 2012)

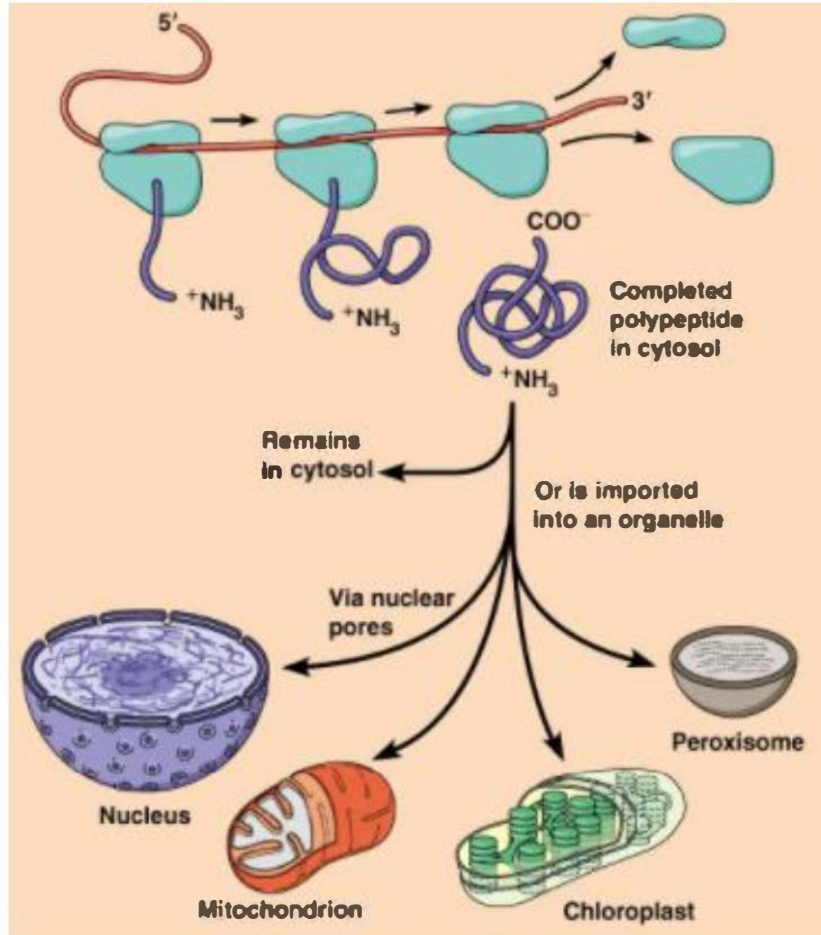


Şekil 122a. Sentezlenen proteinlerin N terminalindeki Sinyal Peptidi

(<http://193.205.144.19/scienze/corsonew/lezione11.html>, 2017)



Şekil 122b. Sinyal Peptidin Enzimatik Olarak Uzaklaştırılması
(<http://193.205.144.19/scienze/corso%new/lezione11.html>, 2017)



Şekil 122c. Sitoplazmada Tamamlanan Proteinin Hücre İçindeki Dağılımı

(https://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL2060/BIOL2060-22/22_13.jpg, 2012 Pearson Education Inc, 2012)

4. Sentez Sonrası Modifikasyonlar

Proteinler sentezlendikten sonra kıvrılıp, bükülerek üç boyutlu yapılarını kazanır. Şaperonlar adı verilen proteinler görev yapar (Şekil 123). Proteinler kimyasal olarak değişir ve fonksiyonel yapı kazanırlar (Şekil 124).

Yapılarına prostetik yapılar eklenebilir.

Disülfid bağları oluşturulur.

Yan gruplar metillenir.

Amino ve karboksil grupları modifiye edilir.

N ve C ucundaki aminoasitler çoğunlukla uzaklaştırılır ya da değişime uğrar. Bazen tek bir aminoasit değişime uğrar. Serin, Treonin, Triozin'deki hidroksil grupları enzimatik olarak ATP ile fosforillenmesi ile (-) yüklü aminoasitler oluşur ve bu aminoasitlerde diğer moleküllerle iyonik bağ yapabilir. Bazen de polipeptid zincirindeki bir aminoasite karbonil grubu eklenebilir.

Polipeptit sentezi sırasında ya da sonrasında karbonhidrat yan zincirler eklenir.

Proteinlerin tersiyer (üç boyutlu) ya da kuarter (dört boyutlu) yapısına metaller bağlanabilir.

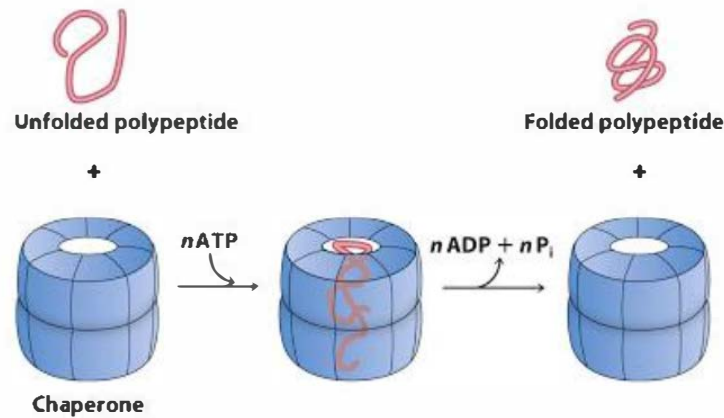
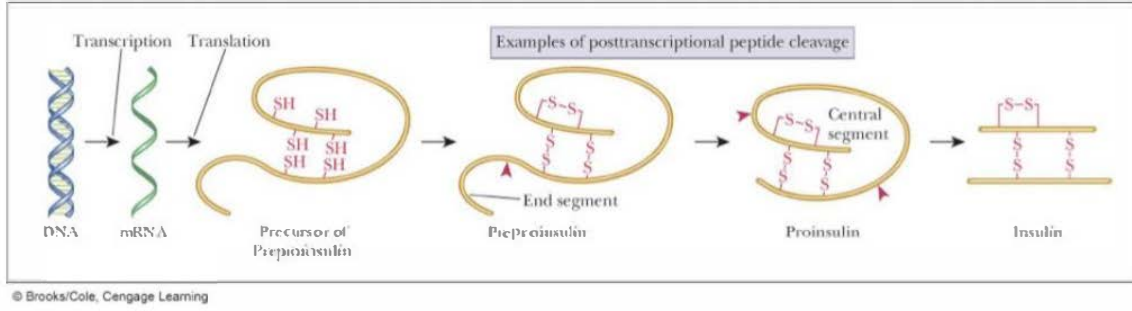


Figure 4-13 Principles of Biochemistry, 4/e
© 2004 Pearson Education, Inc.

Şekil 123. Proteinlerin Katlanmasında Şaperonların Görevi

(<http://sandwalk.blogspot.com.tr/2007/02/heat-shock-and-molecular-chaperones.html>, 2007)



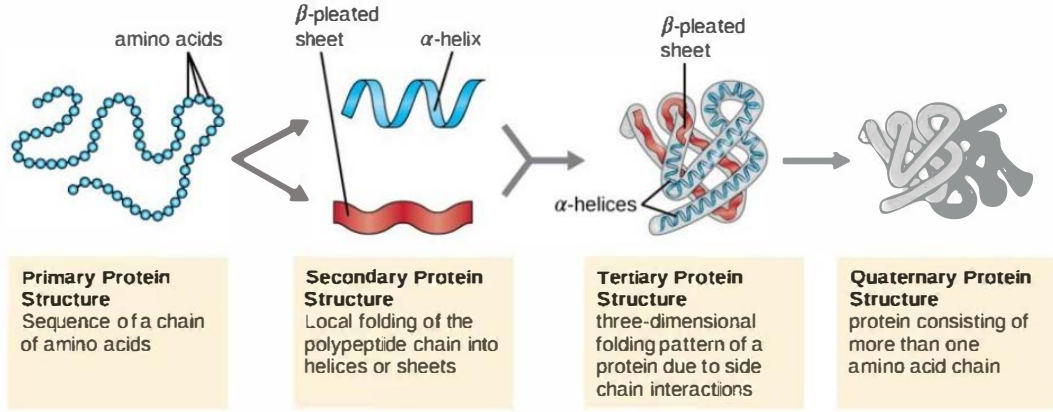
Şekil 124. İnsülinin 3 Boyutlu Yapı Kazanması

(<http://oregonstate.edu/instruct/bb350/textmaterials/12/Slide33.jpg>, 2017)

PROTEİN YAPILARI

Protein yapısı 4 şekilde incelenir.

- 1- Primer (Birincil) Yapısı: Bir protein için karakteristik ve genetik olarak tespit edilmiş olan ve peptid bağı ile bağlanmış olan amino asit dizilişidir (Şekil 125).
- 2- Sekonder (İkincil) yapısı: Bir proteinin primer yapısı yani polipeptit zinciri omurgası katlanarak sekonder yapıyı oluşturur. Sekonder yapı heliksel yapıda ya da plakalı yapıda olabilir. Bu yapılar kararlılık kazandıran polipeptid zincirinde hidrojen bağlarıdır (Şekil 125).
- 3- Tersiyer (üçüncül) yapısı: Sekonder yapılar üstüste katlanarak, sarılarak veya kendi etrafında kıvrılarak tersiyer yapıyı oluştururlar. Tersiyer yapı genellikle globüler proteinlerde görülür ve bu proteinler tersiyer yapılarıyla üç boyutlu şekillerine kavuşurlar (Şekil 125).
- 4- Kuaterner (dördüncül) yapısı: Birden fazla polipeptid zinciri (alt birimi) içeren proteinlerde polipeptid zincirleri tersiyer yapıyı oluşturan aynı bağ tipleriyle birbirleriyle salkımlar, topluluklar yaparak birleşir ve kuaterner yapıyı oluşturur (Şekil 125).



Şekil 125. Proteinlerin 4 Ana Yapısı

(<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/proteins/>, credit: modification of work by National Human Genome Research Institute, 2017)

Prokaryot ve ökaryotlar arasındaki protein sentezindeki farklılıklar tablo 8’de görülmektedir.

Tablo 8. Prokaryot ve Ökaryotlarda Protein Sentezindeki Farklılıklar

Prokaryotik ve Eukaryotik Hücredeki Protein Sentezi'nin Karşılaştırılması		
PROTEİN SENTEZİ	PROKARYOTLAR (70S)	EUKARYOTLAR (80S)
Sentezin Başlaması	↑ tRNA_{met} üzerinde Met amino asidin bulunması AUG başlama kodonu ↑ IF-1, IF-2 ve IF-3 ise başlama faktörleridir. ↑ 30S GTP gereklidir.	↑ tRNA_{met} üzerinde Met. amino asidin bulunması EUKARYOTİK HÜCREDE TRANSFORMİLAZ AKTİVİTESİ bulunmaz. ↑ 40S AUG başlama kodonu ↑ eIF-1, eIF-2 ve eIF-3 başlama faktörleridir GTP gereklidir.
Zincirin Uzaması	↑ EF-Tu ve EF-Ts GTP gereklidir. ↑ 50S ribozomda PEPTİDİL TRANSFERAZ gereklidir. EF-G TRANSLOKAZ gereklidir. GTP gereklidir.	↑ EF-1α EF-1β GTP gereklidir. ↑ 60S ribozomda PEPTİDİL TRANSFERAZ gereklidir. EF-2 TRANSLOKAZ (TRANSFERAZ ii) gereklidir. GTP gereklidir.
Sentezin Sonlanması	R ₁ , R ₂ ve R ₃ gereklidir.	RF ve GTP gereklidir.

Translasyon hızı	hızlı	yavaş
	(saniyede 17-21 aa zincire katılır)	(saniyede 6-9 aa zincire katılır)
Ribozom	sitoplazmada	Endoplazmik Retikulumda

Prokaryotlarda transkripsiyon ve translasyon aynı anda sitoplazmada gerçekleşirken, ökaryotlarda transkripsiyon çekirdekte, translasyon ise sitoplazmada gerçekleşmektedir (Şekil 126).

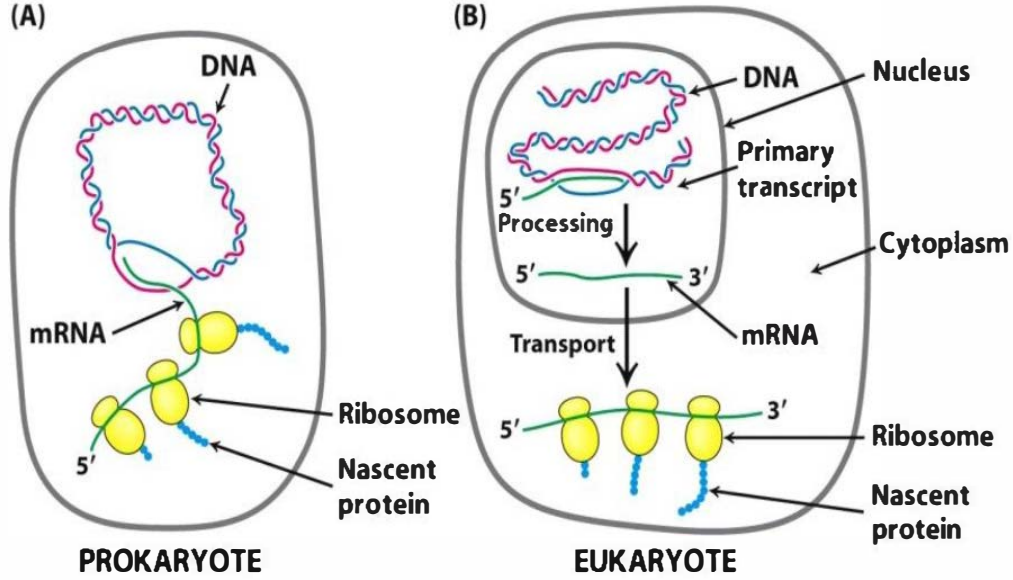


Figure 29.21
Biochemistry, Seventh Edition
© 2012 W. H. Freeman and Company

Şekil 126. Prokaryot ve Ökaryotlarda Transkripsiyon ve Translasyon
(http://regonstate.edu/instruct/bb451/winter14/stryer7/CH29/figure_29_21.jpg, 2012)

PROTEİN SENTEZİNİ İNHİBE EDEN ANTİBİYOTİKLER

Promisin: Peptit bağının oluşumunu engellemektedir.

Tetrasiklin: Bakterilerde ribozom A bölgesini bloke etmektedir.

Kloramfenikol: Ökaryotlarda peptidil transferaz enzimini inhibe etmektedir.

Eritromisin: Translokasyonu inhibe etmektedir.

Streptomisin: Genetik kodun yanlış okunmasına sebep olmaktadır.

Bakteri Toksini: Ökaryotlarda uzama faktörü üzerine etki etmektedir.

Risin: Ökaryotlarda 60S alt üniteyi inaktive etmektedir.

KISIM 8

NON-RİBOZOMAL (RİBOZUM DIŞI) PEPTİD SENTEZİ

Mikroorganizmalar tarafından üremenin gelişme (logaritmik) fazında üretilen primer metabolitler ve duranğın fazda üretilen sekonder metabolitler oldukça önemlidir. Primer metabolitler gelişme fazı (log phase) boyunca düzenli olarak üretilen ve mikroorganizmanın gelişmesi için gerekli metabolitlerdir (Şekil 127). Primer metabolitlere örnek; aminoasitler, vitaminler, sitrikasit. Sekonder metabolitler, organizma herhangi bir stres durumuyla karşılaştığı zaman faaliyete geçen özelleşmiş metabolit yollar tarafından durağan fazda (stationary phase) üretilir (Şekil 127). Örnek; toksinler, bazı enzim, indikatörler ve tüm antibiyotikler.



Şekil 127. Mikrobiyal Üreme Eğrisi

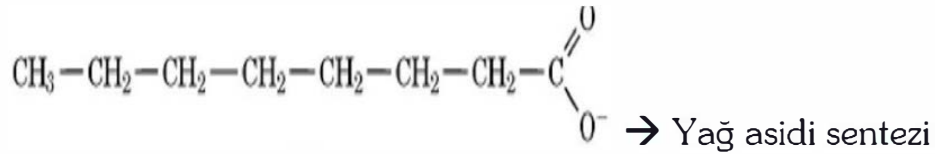
(<http://varuncnmicro.blogspot.com.tr/2016/09/btb9-bacterial-growth-curve.html>, 2016)

Mikrobiyal üreme eğrisinde durağan fazda (stationary phase) üretilen antibiyotikler 2 farklı mekanizmayla sentezlenir. Bunlar;

- 1) Ribozomal sentez
- 2) Non-ribozomal sentez'dir.

- 1) Ribozomlarda sentezlenen antibiyotiklere örnek olarak subtilin, erisin ve mersasidin verilebilir.
- 2) Ribozom olmadan sentezlenen (Non-ribozomal) antibiyotiklere örnek olarak aktinomisin, basitrasin, gramisidin, sikloparin, surfaktan ve tirosidin verilebilir.

Non-ribozomal sentez mekanizması 1971 yılında, Fritz Lipmann tarafından öne sürülmüş ve “thiotemplat mekanizması” olarak adlandırılmıştır. Polipeptidler yağ asidi sentezine benzer bir mekanizma ile sentezlenmektedir (Şekil 128). Buna göre, nonribozomal sentez mekanizmasında, peptidler yüksek molekül ağırlıklı multienzimler olan nonribozomal peptid sentetazlar (NRPS) aracılığıyla sentezlenmektedirler.

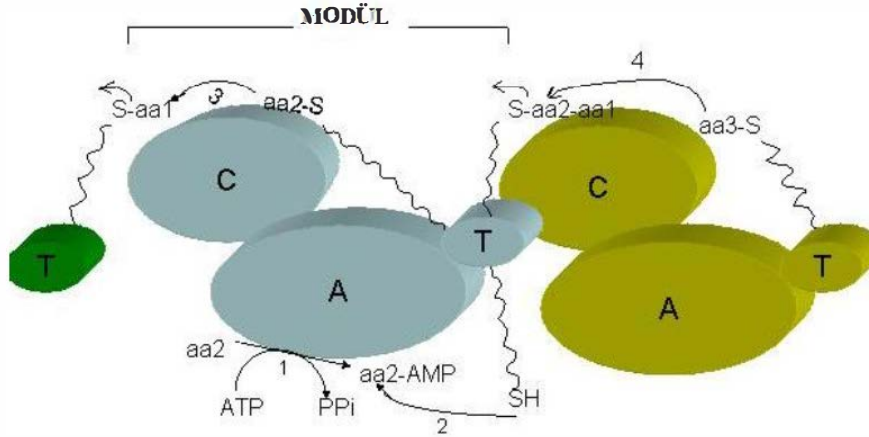


aa-aa-aa-aa-aa-aa-aa-aa → Non-ribozomal peptid sentezi

Şekil 128. Thiotemplat Mekanizması

Nonribozomal Peptid Sentetazlar; Adenilasyon (A), Tiyolasyon (T) ya da peptidil taşıyıcı protein (PCP) ve Kondensasyon (C) domainlerinden oluşmuş büyük multi-fonksiyonel enzimlerdir (Şekil 129). Bunların dışında Nonribozomal Peptid Sentetazlar, yeni sentezlenen peptidin salınmasında görev yapmakta olan Tiyooesteraz (TE) ve L-yi D-amino asite çevirme görevini üstlenen Epimeraz (E) domaini de içerebilmektedirler. Domainler bir araya gelerek modül olarak adlandırılan alt birimleri oluşturmaktadır (Şekil 129). Yaklaşık 1000 aminoasit içeren ve mole-

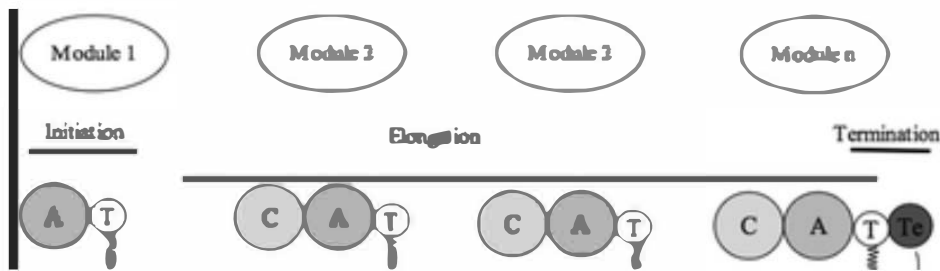
kül ağırlığı 120 kDa civarında olan her bir modül, belirli bir aminoasitin eklenmesi için özgüdür ve peptid sentetazda bulunan modül sayısı, genellikle oluşan peptiddeki aminoasitlerin sayısına eşittir.



Şekil 129. Nonribozomal Peptid Sentetazlar

(<http://linux1.nii.res.in/~zeeshan/nrps.html>, 2017)

Nonribozomal sentez mekanizmasında da ribozomal sentez mekanizmasına benzer olarak; aktivasyon, başlama, zincir uzaması ve sonlanma aşamaları bulunmakta ve gerekli enerji ATP hidrolizinden sağlanmaktadır. Fakat ribozomal sentez mekanizmasından farklı olarak kalıp görevini mRNA yerine peptid sentetazlar üstlenmekte ve oluşan ürünlerde standart L-aminoasitlere ek olarak D-aminoasitler, çok çeşitli sıra dışı ve modifiye aminoasitler de bulunabilmektedir. Bu sentezde bir başlama modülü, uzama modülleri ve sonlanma modülü bulunmaktadır. Sonlanma modülünde peptidin salınmasında görev yapan Tiyoesteraz (TE) ve bazen de L-'yi D-amino asite çevirme görevini üslenen Epi-meraz (E) domainide bulunmaktadır (Şekil 130).

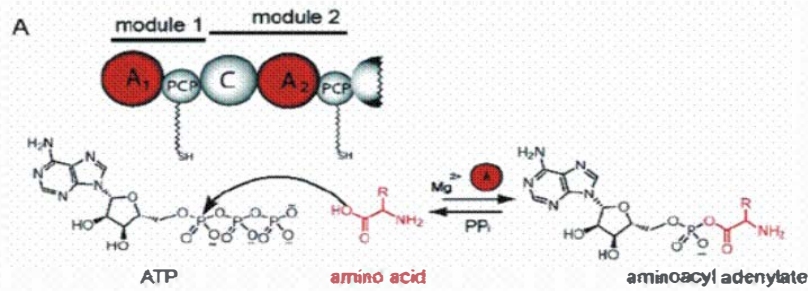


Şekil 130. Başlama Modülü, Uzama Modülleri ve Sonlanma Modülü

(<http://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2007/np/b514050c/unauth#!divAbstract>, 2007)

Nonribozomal peptid sentezi; aminoasitlerin aktivasyonu, başlama, uzama ve sonlanma olmak üzere dört aşamada gerçekleşmektedir.

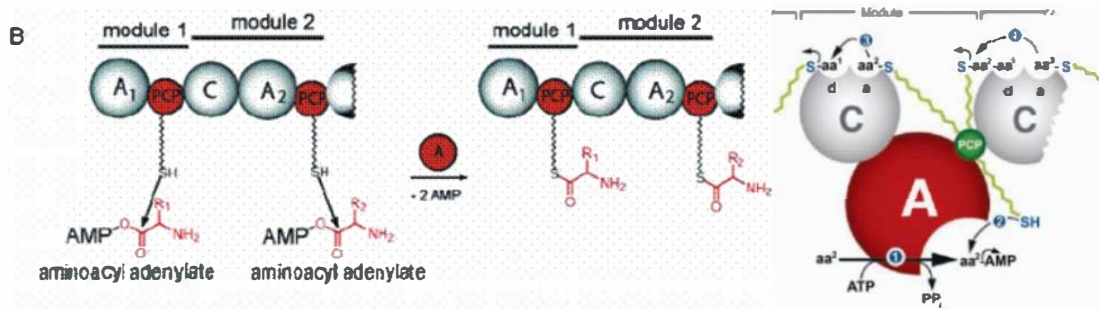
1- Aminoasitin Aktivasyonu: Adenilasyon bölgesi, aminoasitin tanındığı özgül bir diziye sahiptir. Aminoasit bu özgül dizi tarafından tanındığı zaman, ATP'deki adenil grupları kullanılarak adenilasyon reaksiyonu gerçekleşmekte ve böylece aminoasiladenilat oluşarak, aminoasit aktive olmaktadır (Şekil 131 ve 134).



Şekil 131. Aminoasitin Aktivasyon Aşaması

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsi-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2006)

2- Başlama: Bu aşamada aktive olmuş aminoasit modülün A bölgesine bağlanır. A bölgesi aminoasitin tanındığı yaklaşık 10 aminoasitlik özgül bir diziye sahiptir. Bu aminoasitlerin; A bölgesinden T (PCP)'ye geçmekte ve T bölgesi ileri geri hareket ederek aminoasitleri C bölgesine kaydırır. Aminoasitler üzerindeki AMP'ler serbest kalır (Şekil 132 ve 134).

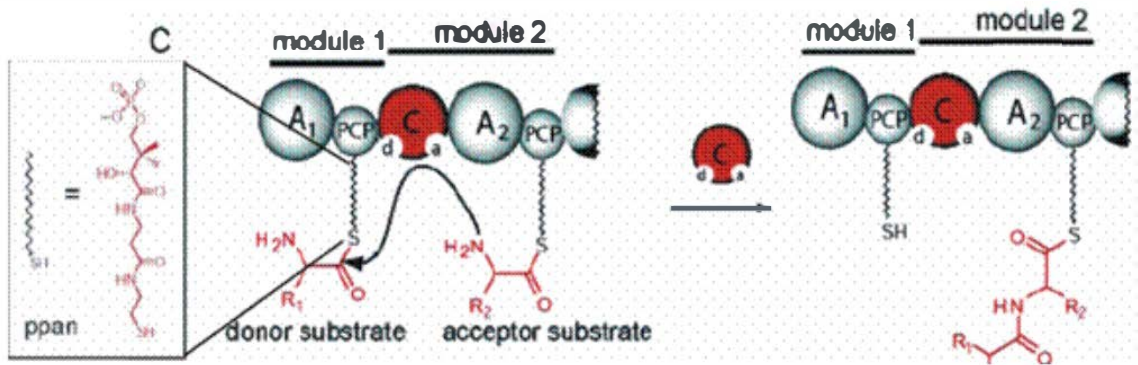


Şekil 132. Başlama Aşamaları

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsi-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2006)

(<http://reasonandscience.heavenforum.org/t2443-iron-uptake-and-homeostasis-in-prokaryotic-microorganisms>)

2- Uzama: Bu aşamada peptid bağı oluşturulur. Peptid bağı oluşumu C bölgesinde gerçekleşir. Verici aminoasitlerin karboksil grubu ile alıcı aminoasitlerin amino grubu arasında peptid bağı oluşur. Yani 1. modüldeki aminoasit ile 2. modüldeki aminoasit arasında peptid bağı oluşur. Bir sonraki modüldeki alıcı konumuna taşınarak burada diğer modül tarafından getirilmiş aminoasit ile aralarında peptid bağı oluşturulmakta ve bu şekilde zincir uzaması devam etmektedir (Şekil 133 ve 134).

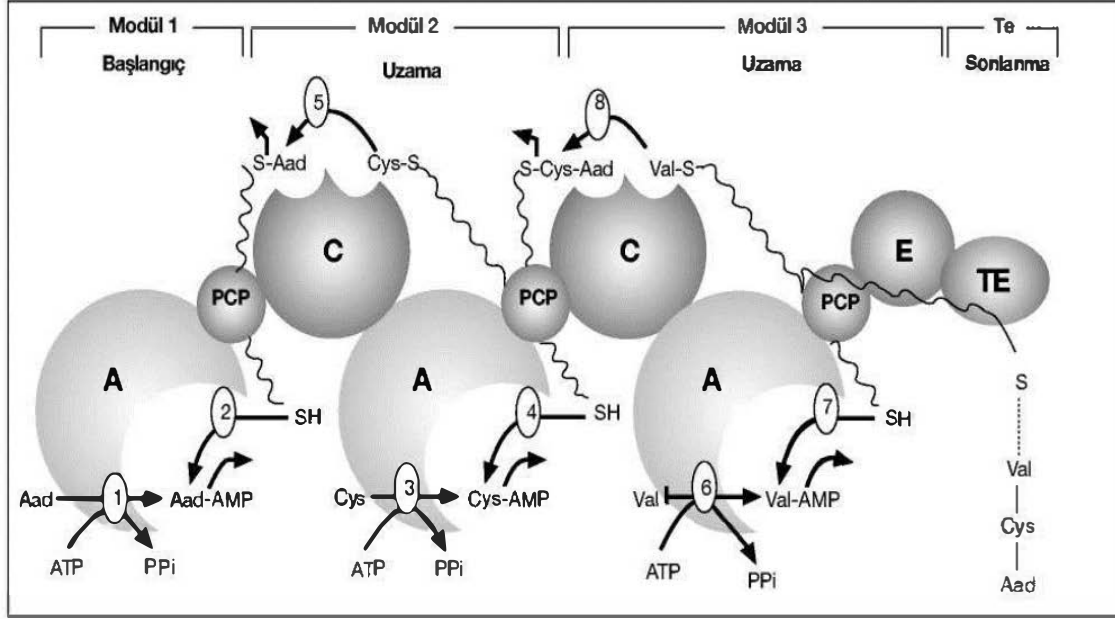


Şekil 133. Uzama Aşaması

(<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/koumoutsis-alexandra-2006-12-04/HTML/chapter1.html>, 2006)

3- Sonlanma: Peptid sentezinin sonlanması ve oluşan peptidin sentetazdan ayrılması en sonda yer alan tiyoesteraz (TE) bölgesi tarafından gerçekleştirilmektedir (Şekil 134). Sentez tamamlanıp ürün serbest bırakıldıktan sonra da bazı yapı modifikasyonları gerçekleştirilebilmektedir.

Oluşan ürünlerdeki aminoasit sayısı 3 ile 15 arasındadır.



Şekil 134. Nonribozomal Sentez Mekanizma Aşamaları

(Büber ve Açıan 2004)

Nonribozomal yolla sentezlendiği gösterilen ilk antibiyotikler Gramisidin S ve tirosidindir.

- Gramisidin (5 aminoasitten oluşur)
- Surfaktan (7 aminoasitten oluşur)
- Tirosidin (10 aminoasitten oluşur)

Diğer nonribozomal yolla sentezlenen antibiyotiklerden bazıları tablo 9'da verilmektedir.

Tablo 9. Nonribozomal yolla sentezlendiği gösterilen bazı antibiyotikler

Antibiyotik	Organizma
Aktinomisin	<i>Streptomyces clavuligerus</i>
Basitrasin	<i>Bacillus licheniformis</i>
Bialafos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>
Bleomisin	<i>Streptomyces verticillus</i>
Daptomisin	<i>Streptomyces roseosporus</i>
Enniatin	<i>Fusarium oxysporum</i>
Eksokelin	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
Fengisin	<i>Bacillus subtilis</i>
Gramisidin S	<i>Bacillus brevis</i>
Lovastatin	<i>Aspergillus terreus</i>
Pristinamisin I	<i>Streptomyces pristinaespiralis</i>
Siklosporin	<i>Tolypocladium niveum</i>
Siringomisin	<i>Pseudomonas syringae</i>
Surfaktin	<i>Bacillus subtilis</i>
Tirosidin	<i>Bacillus brevis</i>
Mycobacillin	<i>Bacillus subtilis</i>

KISIM 9

MUTASYONLAR ve DNA TAMİR MEKANİZMALARI

Ökaryotlarda mitoz bölünmenin gerçekleşmesi için S (Sentez) evresinde DNA'nın 2 katına çıkması gerekmektedir. 3 milyar bazın hata olmadan 2 katına çıkarılması son derece doğru bir mekanizma ile olmalıdır. Milyonda bir hata oranı bile her bir replikasyon döngüsünde 3 bin hata demektir ve buda çok büyük bir rakamdır. DNA molekülünün doğru bir şekilde replike olması ve sonraki nesillere doğru olarak aktarılması gerekir. Eğer DNA'da bir hasar meydana gelmiş ise bu hasarın tamir edilmesi gereklidir. Bu hasarlar hücre bölünmesinden önce tamir edilmezse DNA yapısı üzerinde kalıcı olur ve sonraki kuşaklara aktarılır. DNA molekülü üzerinde meydana gelen bu kalıcı değişikliklere 'mutasyon' denir. Mutasyona neden olan maddelere 'mutajenik maddeler', mutasyona uğramış organizmaya da 'mutant' denir.

MUTAJENLER

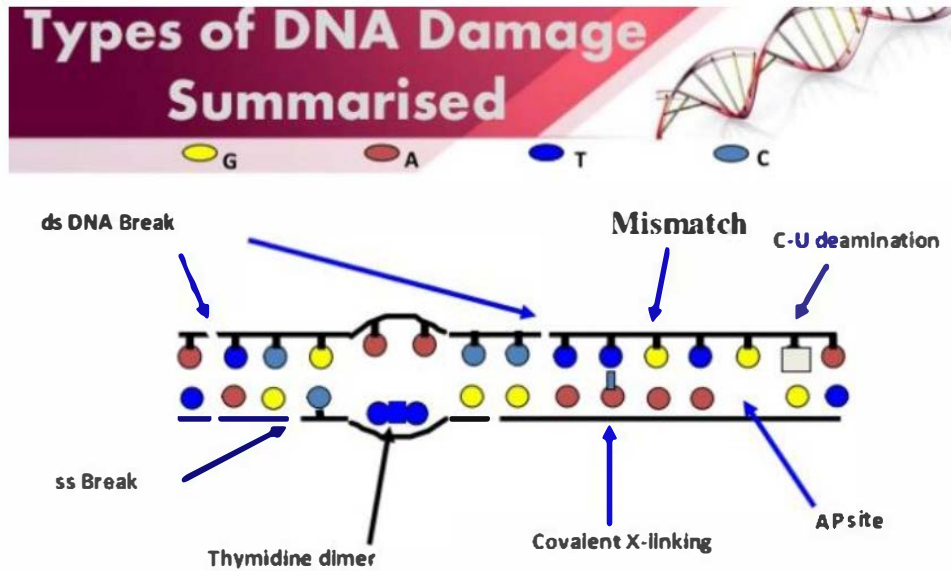
Mutajenler 2 grupta incelenir.

- a) **Kimyasal Mutajenler:** DNA'da etkisini gösteren organik bileşenlere kimyasal mutajen denir. Örneğin; Bromourasil (BU) pürin, pirimidin bazlarında değişime yol açar. Sigara dumanında bulunan nitroz asit A ve C nükleotitlerinin yapısındaki amino gruplarının ayrılmasına (deaminasyon) yol açabilir. Alkilleyici ajanlar DNA'da G ile etkinleşir ve replikasyonda G'nin yanlış eşleşmesine yol açarlar.

b) Fiziksel Mutajenler: UV, X-ışını, β , gama ışını gibi birçok formu radyasyonlardır. Bunlar tamiri zor mutasyonlara neden olur. DNA ve RNA'da yer alan bazı 260 nm'deki UV ışınlarını kuvvetli olarak absorbe ederler. UV'nin en önemli etkisi T dimerlerinin (T-T) oluşmasına, dolayısıyla aminoasit dizisinin değişmesine yol açar. X-ışınları, kozmik ışınlar ve gama ışınları UV'ye göre daha etkilidir. Bu tür ışınlar su ve diğer maddelerde iyonizasyon oluşturarak serbest radikaller oluştururlar. Bunlar da DNA, protein, lipid gibi makromoleküllerin yapısına bağlanarak bunların okside olmasına neden olur.

Spontan Değişiklikler: DNA'da kendiliğinden meydana gelen mutasyonlardır. Örneğin; C'nin U'ya dönüşmesi gibi.

DNA yapısında fiziksel, kimyasal ya da spontan değişiklikler ile çeşitli hasar tipleri oluşmaktadır. Tek iplikçik ya da çift iplikçik kırabilir, timin dimerleri oluşabilir, yanlış baz eşleşmeleri olabilir, Sitozin (C) Urasil'e (U) dönüşebilir (Şekil 135).



Şekil 135. DNA Hasar Tipleri

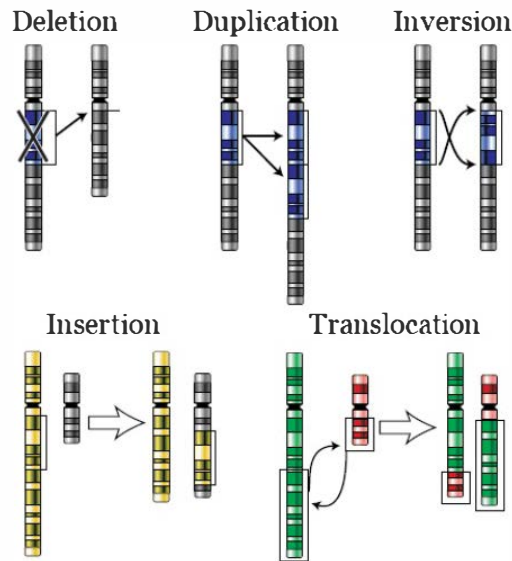
(<https://www.slideshare.net/SouvikPal15/dna-damage-and-repair-61846579>, 2017)

MUTASYONLAR

2 grup altında toplanır.

1- Makrolezyonlar: Bu tip mutasyonlar kromozomların sayısını veya kromozomlardaki geniş bölgeleri ilgilendiren büyük değişimlerdir. Burada genlerin sayısı ya da yerleşim düzenleri değişir. Bunun sonucunda da bireyin fenotipinde kalıcı değişimler ortaya çıkar. Makrolezyonlar 2 kısımda incelenir.

- a) Genom Mutasyonu (sayı değişimi):** Kromozom takımları sayısında ya katlar halinde artma(poliploidi) ya da azalmalarla (monoploidi) takımdaki kromozomlardan bazılarının sayısındaki artma ve azalmaları (anöploidi) kapsar.
- b) Kromozom Mutasyonları (yapı değişimleri):** Kromozomlarda kırılmalar sonucu oluşan parça kayıpları (delesyon), parça artışlarını yani kromozom dizisinin kendini kopyalamasını (duplikasyon), kromozomda bulunan genlerin ters dönerrek konumlanmasını (inversiyon), kromozomlar arası parça değiş tokuşlarını (translokasyon), bir DNA parçacığının kendi bölgesinden başka bir bölgeye hareketini(insersiyon= içeri girme) kapsar (Şekil 136).



Şekil 136. Kromozom Mutasyonları (Yapı Değişimleri)

([https://biolibretexts.org/TextMaps/Map%3A_Introductory_Biology_\(CK-12\)/4%3A_Molecular_Biology/4.8%3A_Mutation_Types](https://biolibretexts.org/TextMaps/Map%3A_Introductory_Biology_(CK-12)/4%3A_Molecular_Biology/4.8%3A_Mutation_Types), 2016)

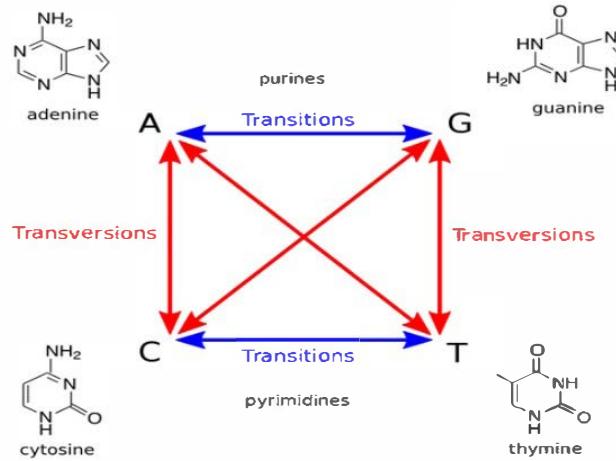
2- Mikrolezyonlar: Tek bir baz çiftinde meydana gelen değişikliklerdir.

2 kısımda incelenir:

A) Baz Değişimleri (Nokta Mutasyonları): DNA'daki bir baz değişimiyle ortaya çıkan mutasyona nokta mutasyonu denir. Transisyon ve transversiyon şeklinde görülmektedir.

Transisyon: Bir pürin yerine başka bir pürin girmesi ya da bir pirimidin yerine başka bir pirimidin girmesi (Şekil 137),

Transversiyon: Bir pürin yerine pirimidin girmesi veya bir pirimidin yerine pürin girmesidir (Şekil 137).



Şekil 137. Transisyon ve Transversiyon Şekli

(<http://rosalind.info/glossary/transition-transversion-ratio/>, 2017)

Nokta mutasyonları 3 şekilde ortaya çıkmaktadır;

1- Sessiz (Silent) Mutasyon: DNA'da bir aminoasite karşılık gelen kodonda (3'lü baz) bir nokta mutasyonuna rağmen kodondan sentezlenen aminoasit değişmez (Şekil 138).

2- Kayıp (missense) Mutasyon: DNA'da bir aminoasite karşılık gelen kodonda (3'lü baz) bir nokta mutasyon ile kodondan sentezlenen aminoasit değişir (Şekil 139).

Silent mutation

Wild Type DNA	TAC	GGG	AAA	GTC	CGT	GGC
Wild Type mRNA	AUG	CCC	UUU	CAG	GCA	CCG
Amino acids	Met	-Pro-	Phe-	Gln-	Ala-	Pro
Mutated DNA	TAC	GGG	AAG	GTC	CGT	GGC
Mutated mRNA	AUG	CCC	UUG	CAG	GCA	CCG
Amino acids	Met	-Pro-	Phe-	Gln-	Ala-	Pro

Şekil 138. Sessiz (Silent) Mutasyon

(<http://www.biocchemhelp.com/dna-mutations.html>, ©2012 biocchemhelp.com, 2012)

Mis sense mutation

Wild Type DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	ATC
Wild Type mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	UAG
Amino acids	Met	-Val-	Gly-	Arg-	Stop
Mutated DNA	TAC	GAC	CCC	GCC	ATC
Mutated mRNA	AUG	CUG	GGG	CGG	UAG
Amino acids	Met	-Leu-	Gly-	Arg-	Stop

Şekil 139. Kayıp (Missense) Mutasyon

(<http://www.biocchemhelp.com/dna-mutations.html>, ©2012 biocchemhelp.com, 2012)

3- Anlamsız (nonsense) Mutasyon: DNA'da bir aminoasite karşılık gelen kodonda (3'lü baz) bir nokta mutasyonu sonrasında kodon stop kodonunu oluşturur. Bu durumda protein tam olarak sentezlenemediğinden sentezlenen protein anlamsızdır (Şekil 140).

Nonsense mutation

Wild Type DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	CTT	CAC	ACC	ATT
Wild Type mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	GAA	GUG	UGG	UAA
Amino acids	Met	- Val-	Gly-	Arg-	Glu-	Val-	Trp-	Stop
Mutated DNA	TAC	CAC	CCC	GCC	ATT	CAC	ACC	ATT
Mutated mRNA	AUG	GUG	GGG	CGG	UAA			
Amino acids	Met	- Val-	Gly-	Arg-	Stop			

Şekil 140. Anlamsız (Nonsense) Mutasyon

(http://www.bi•chemhelp.com/dna-mutations.html, ©2012 bi•chemhelp.com, 2012)

B) Çerçeve (frameshift mutation ya da Kodon Kayması)

Kayması Mutasyonları: Bir protein sentezlemekle görevli gende baz dizisinin herhangi bir noktasında delesyon (çıkarılma) veya insersiyon (içeri koyma) ile kodonlarda kayma sonucu oluşan değişimdir (Şekil 141). Bu olayda aminoasit dizisi tamamen değiştiğinden farklı protein sentezlenir.

Insertion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG		3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly		
↓							
5'	AUG	CGA	UUA	UUA	CGG	G	3'
	Met	Arg	Leu	Leu	Arg		

Deletion

5'	AUG	CGA	UUA	UAC	GGG	AAA	3'
	Met	Arg	Leu	Tyr	Gly	Lys	
↓							
5'	AUG	CGA	UUA	UAG	GGA	AA	3'
	Met	Arg	Leu	Stop			

Şekil 141. Çerçeve (Frameshift Mutation) Kayması Mutasyonu

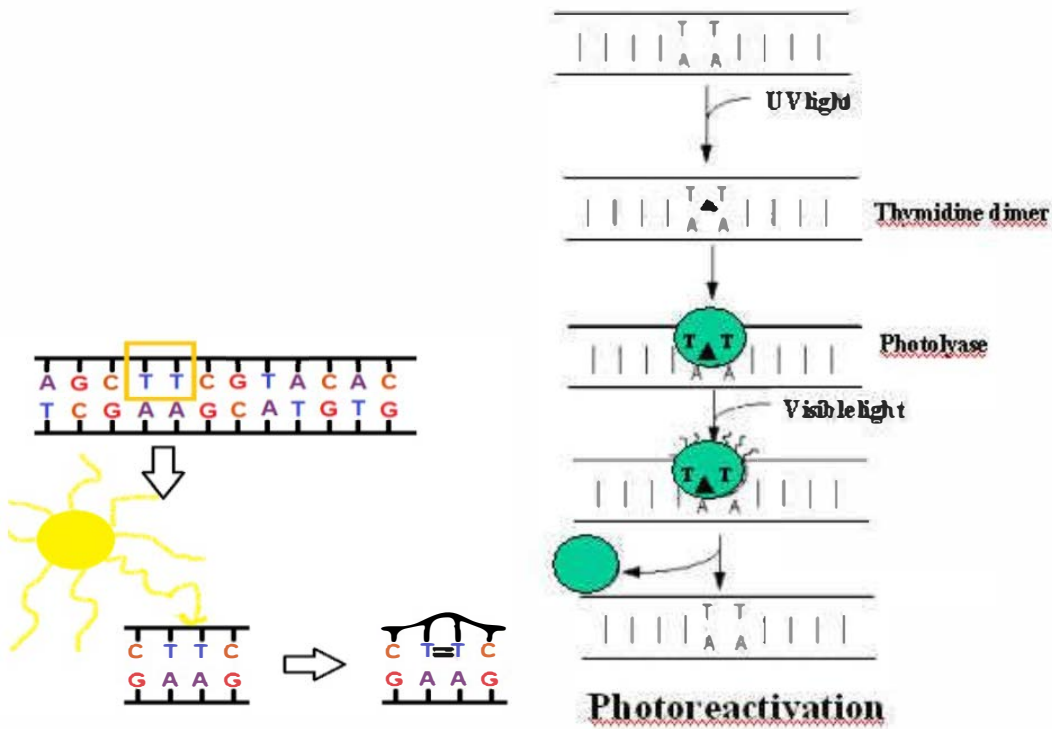
(https://sbi4u2013.wordpress.com/2013/02/10/gene-mutations/, 2013)

TAMİR MEKANİZMALARI

- Fotoreaktivasyon
- Mismatch (Hatalı eşleşme) tamiri
- Eksisyon (Kesip çıkarma) tamiri
- SOS tamiri

Fotoreaktivasyon

Direkt Timin (T) dimerlerinin onarımıdır. UV ışınının etkisiyle meydana gelen pirimidin ya da pürin dimerlerinin görünür ışıkta aktif hale geçirilen bir enzim olan **Fotoliyaz** enzimi tarafından yok edilmesi. Fotoliyaz ışık enerjisini tutar. Timin dimerlerinin bulunduğu bölgede DNA'ya bağlanıp dimerler arasındaki kovalent bağlarını kırmakta kullanılır. Böylece zarar görmüş bazlar eski haline döndürülür (Şekil 142). Bu onarımda kesme ve aralık doldurmaya gerek duyulmaz. Ökaryotlarda bu enzim bulunmamaktadır.



Şekil 142. Timin Dimer Oluşumu ve Fotoreaktivasyon ile Tamiri

(<https://scienceisntscary.wordpress.com/tag/thymine-dimer/>, 2013)

(<http://trishul.sci.gu.edu.au/courses/ss12bmi/repair.html>, 2002)

Missmatch (Hatalı Eşleşme) Tamiri

DNA üzerinde GATC dizileri defalarca tekrar etmektedir. Bu dizide bulunan Adenin (A), metilaz enzimi tarafından metillenir. GATC dizisi bir polindrom olduğundan karşı yeni zincirdeki GATC'de metillenme eğilimindedir. Fakat bu yeni zincirdeki dizi metilleninceye kadar zaman geçer, bu zaman içinde hata bulunur ve tamir edilir. Bu onarımda 4 protein görev yapar (Şekil 143).

Mut S, Mut L, Mut H ve Mut U'dur. Bu enzimler çok iyi korunmuşlardır. Prokaryot ve ökaryotlardaki mekanizmaları aynıdır. Fakat ökaryotlarda Mut H bulunmaz.

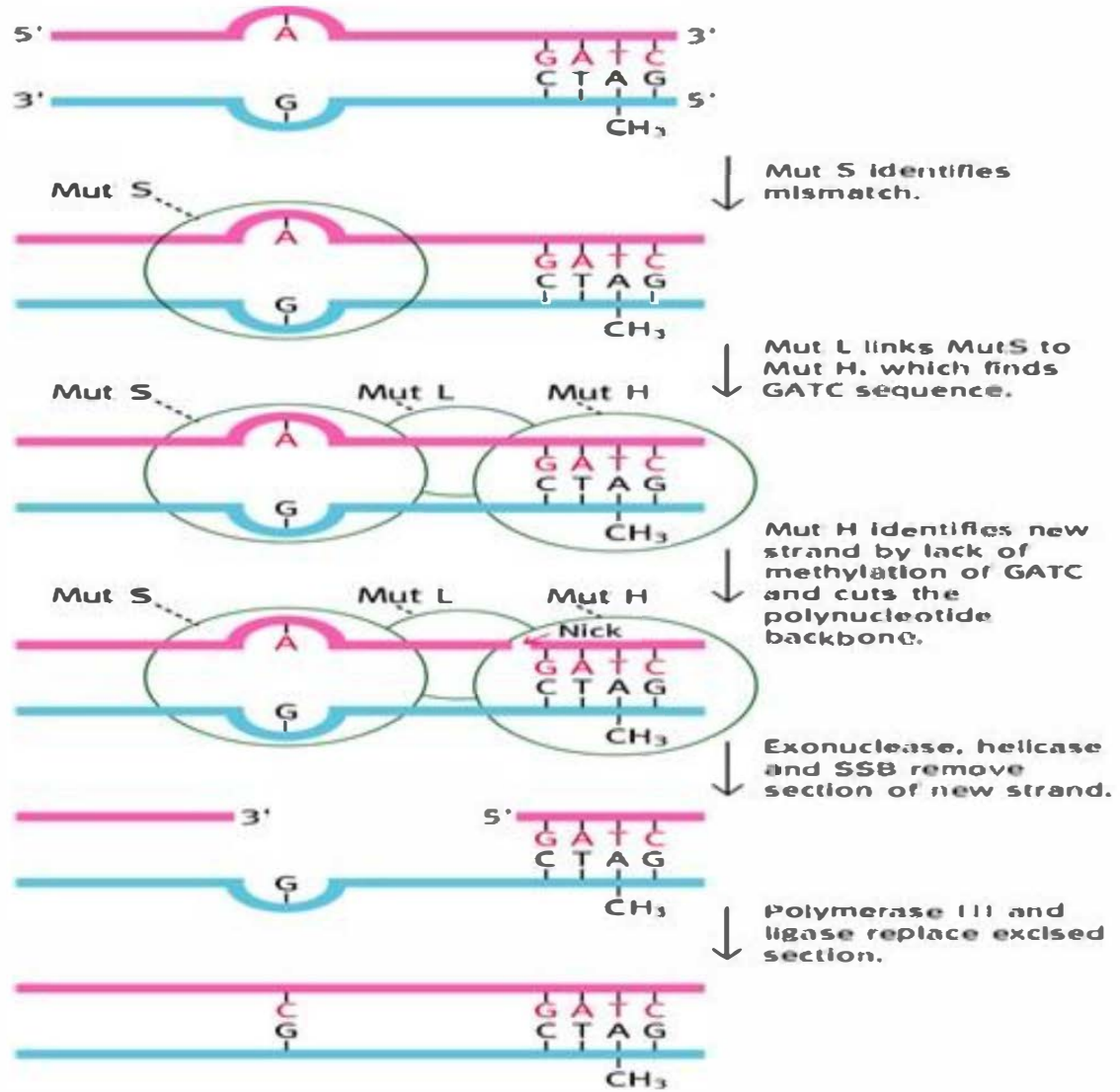
Mut S → Hatayı arar ve hatayı içeren DNA'yı kuşatır.

Mut L → Mut H'yi aktivite eder.

Mut H → Kırık oluşumunu sağlar.

Mut U → Görevi bilinmiyor ama DNA helikaz II'nin kesip çıkarma işleminde yardımcı olduğu ifade edilmektedir.

Mut S, DNA'daki uyumsuzluğu tanır ve ona bağlanır. Bu tamiri başlatır. Mut H ve Mut L'den oluşan kompleks metillenmemiş (nonmetile) zincirde kırık oluşturur. Bir ekzonükleaz metillenmiş bölge ile hatalı bölge arasındaki nükleotitleri uzaklaştırır. Kesme işlemi boyunca DNA pol III enzimi metillenmiş zinciri kalıp olarak kullanarak aktivite gösterir ve DNA, ligaz enzimi ile bağlanma işlemini yerine getirerek boşluklar doldurulmuş olur ve tamir işlemi biter (Şekil 143).



Şekil 143. Missmatch(Hatalı Eşleşme) Tamiri

(<http://slideplayer.com/slide/4961248/>, 2017)

Eksisyon (Kesip Çıkarma) Tamiri

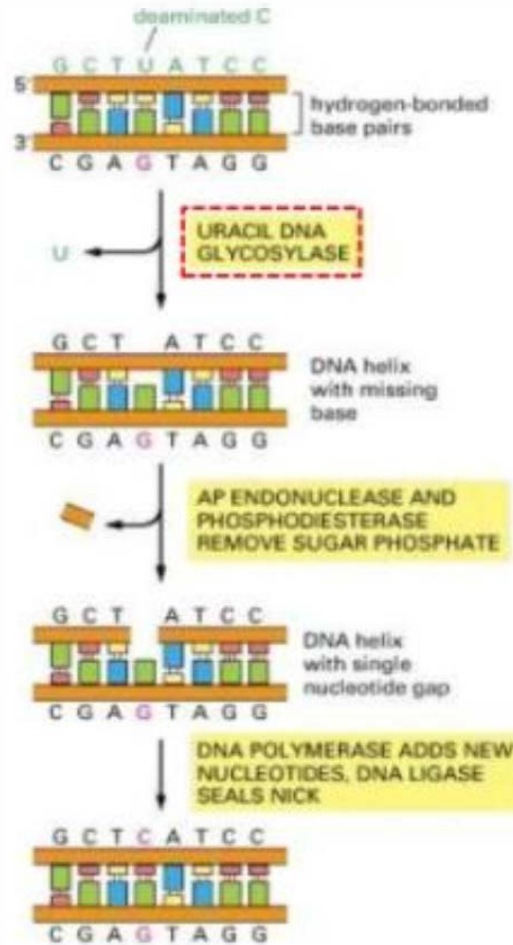
Temel olan 2 tipi vardır.

- 1- Baz eksisyon tamiri
- 2- Nükleotit eksisyon tamiri

1- Baz Eksisyon Tamiri

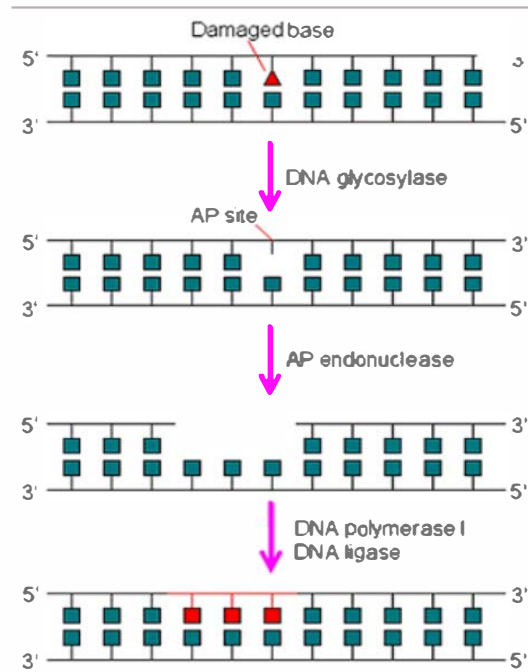
Anormal veya kimyasal olarak değiştirilmiş bazların DNA'dan uzaklaştırılmasıdır. Bu işlem DNA glikosilaz denen enzim tarafından gerçekleşir. Bu enzim DNA üzerinde hatalı özellikle adenin (A) ve sitozin (C)'nin deaminasyonu ile meydana gelen hataları tanır. Glikosilazlar anormal baz ve şeker arasındaki glikozitik bağı kırarak çalışırlar. Bu olay apürinik ya akpirimidik denen bölgeyi oluşturur. Bunların ikisine 'AP bölgeleri' denir. Bu AP bölgeleri endonükleazlar tarafından tanınır ve fosfodiesterazlarla birlikte eksik bazın şeker fosfat grubunu keserler. Doğal olarak DNA pol I enzimi kayıp bazın yerini doldurur ve ligazla boşluk kapatılır (Şekil 144a ve b).

Base excision repair



Şekil 144a. Baz eksisyon tamiri

(<https://www.slideshare.net/luisa3001/dna-repair-pathways>, 2011)

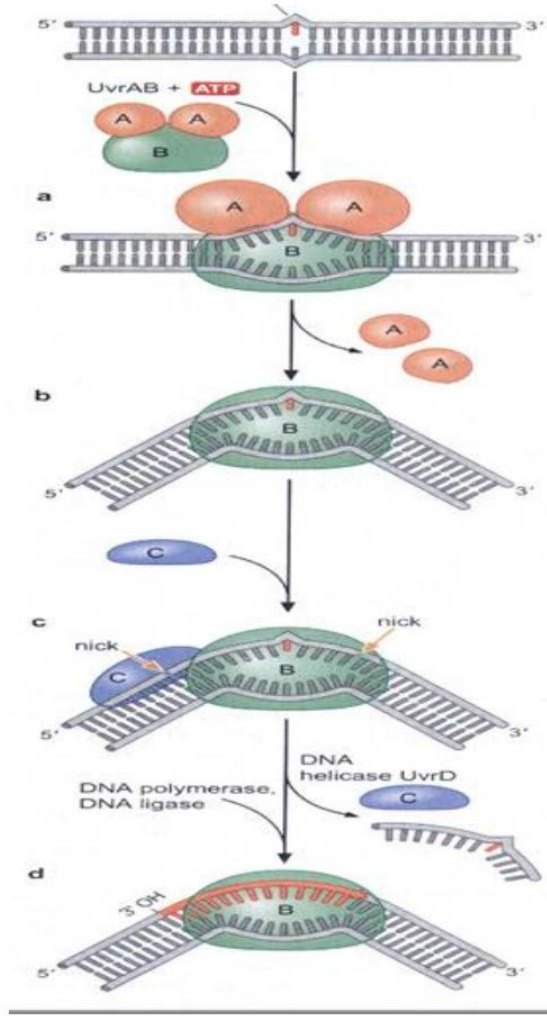


Şekil 144b. Baz eksisyon tamiri

(<http://www.biomedcentral.com/journal/Archive/Media/A41F3.gif>, 2014)

2- Nükleotit Eksisyon Tamiri

DNA'da değişikliğe uğramış bazların yok edilip, yerlerine doğru bazların konulmasında ikinci yol bu hatalı bazları içeren nükleotidlerin kesilip çıkarılmasıdır. Bu tamir sisteminde pürin ya da pirimidin dimeri gibi daha geniş bölgeler uzaklaştırılır. Bu ekzinükleaz (UV özgül endonükleaz veya UvrABC endonükleaz) denen enzimle gerçekleştirilir. Bu enzim zarar görmüş bazları keser ve bu bölgeyi içeren bir oligonükleotiti de uzaklaştırır. *E. coli*'de bu onarım mekanizması Uvr A, Uvr B, Uvr C, Uvr D proteinleri tarafından kontrol edilir. Hasarlı bölge trimetrik bir protein tarafından tanınır (Uvr A2-Uvr B). Bu protein hasarlı bölgeye bağlanır. Sonra Uvr A2 dimeri uzaklaştırılır ve Uvr C yapıya katılır. Uvr B-DNA kompleksi oluşturulur. Uvr B hasarlı bazların 3' ucundaki fosfodiester bağlarını keser. Uvr C ve hasarlı bölgenin 5' ucundaki fosfodiester bağlarını keser. Uvr C ve hasarlı bölge içeren parça Uvr D tarafından uzaklaştırılır. DNA pol I enzimi de B'yi uzaklaştırır. Aradaki boşlukları DNA pol I enzimi tarafından doldurur ve zincir ligazla kapatılır (Şekil 145).



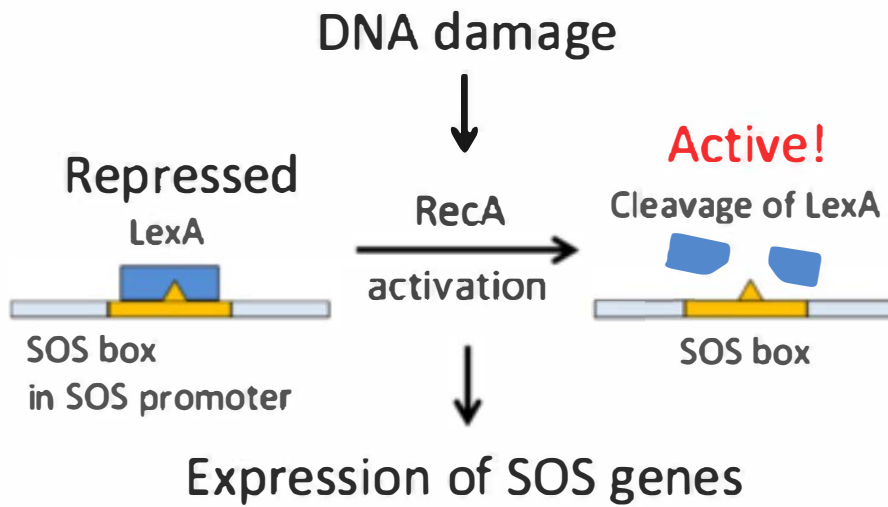
Şekil 145. Nükleotit Eksisyon Tamiri
(<http://slideplayer.com/slide/8421707/>, 2017)

SOS Tamiri

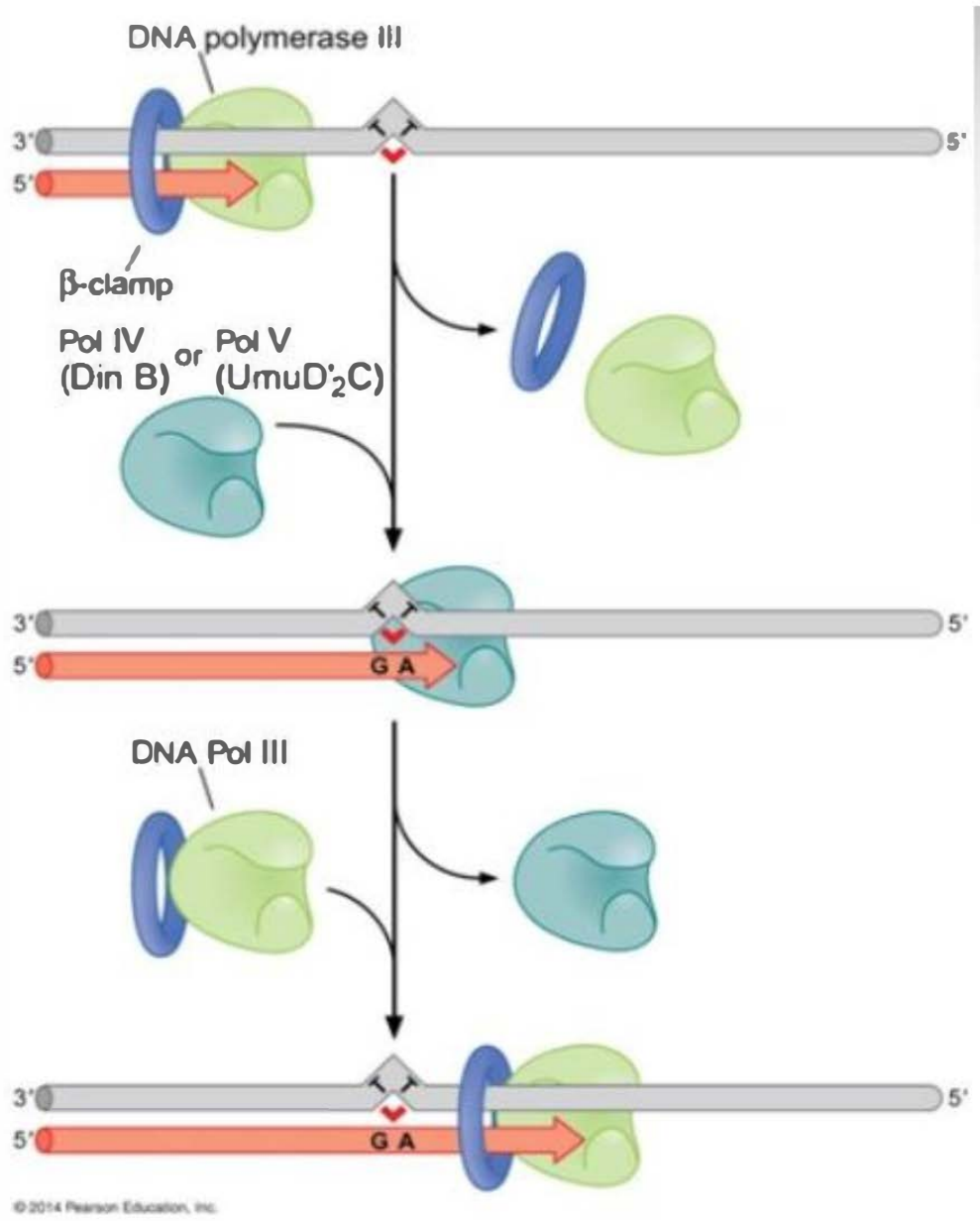
Hataya meyilli tamir sistemi ya da yaşamak için mutasyona göz yummak olarak da bilinmektedir. DNA'nın yüksek oranda hasara uğratılması normal DNA tamirini işlemez hale getirmektedir. Bu durum hücrede stres cevabının harekete geçmesine sebep olur ve birçok proteinin sentezi artar. Bu olaya 'SOS Cevabı' denir. Tüm çareler tükendiğinde kullanılan yoldur. E. coli hücreleri ağır bir şekilde hasar görmüş DNA'nın letal (öldürücü) etkisinden kurtulmak için bu sistemi kullanırlar. Bu sistemde replikasyon sırasında görülen bir lezyonda duraklayıp, boşluk bırakma yerine hata olduğunu belirten moleküller sentezlenir. Bu moleküller lezyon bölgesini hataya eğilimli bölge haline getirir ve replikasyon

hızla devam eder. Bu sistem DNA polimerazın hataya rağmen replikasyona devam etmesini sağlar. Boşluk oluşturulmaz, replikasyon doğrulduğundan fedakarlık edilir. Yaşamak için mutasyona göz yumulduğundan hataya meyilli tamir sistemidir.

SOS tamirinde 15-20 protein görev yapar. Bu sistemin işlerliği LexA+ RecA proteinlerinin ilişkisine bağlıdır. Normal koşullar altında SOS genleri LexA denilen ve regülasyonu sağlayan bir re-sepsör(baskılayıcı) protein tarafından kontrol edilir (Şekil 146a). DNA molekülü ağır bir hasara uğradığında RecA proteini aktif hale geçerek proteaz aktivitesi gösterir ve LexA' nın yapısındaki alanin-glisin aminoasitleri arasındaki peptit bağını kırarak represör proteini iki parçaya ayırır. İki parçaya ayrılan LexA proteini DNA üzerinden ayrılmakta ve bu sırada SOS tamirinden sorumlu 15 gen aktif hale gelir. Bu genlerden sentezlenen 15 protein SOS tamirinin yapılmasını sağlar. Bu proteinler UmuD ve UmuC'yi kapsayan proteinlerdir. UmuD, RecA tarafından UmuD' (D' üssüne)'ne dönüştürülür. UmuD' + UmuC bir araya gelerek kompleks oluşturur. Bu kompleksin DNA pol enzim aktivitesi vardır ve DNA pol IV olarak adlandırılır. DNA pol IV hatalı bölgede onarıma başlar, bu enzim pirimidin dimerinin karşısına rastgele iki nükleotid ekleyerek hatalı bölgede boşluk bırakmadan geçilmesini sağlar ve daha sonra yapıya giren DNA pol III replikasyon çatalının ilerlemesini mümkün kılar (Şekil 146b).



Şekil 146a. SOS Tamir Sisteminde LexA ve RecA Proteinlerinin Etkisi
(<http://2012.igem.org/Team:●saka/Project>, 2012)



Şekil 146b. SOS Tamiri
 (<http://slideplayer.com/slide/7769239/>, 2017)

KISIM 10

HÜCRE SIKLUSU PROGRAMLANMIŞ HÜCRE ÖLÜMÜ (APOPTOZİS)

HÜCRE SIKLUSU

Hücreler içerdiklerini 2 katına çıkararak ve 2'ye bölünerek çoğalırlar. Bu sürece 'hücre siklusu(döngüsü)' denir. Hücreler bir bölünme sinyali olmadığı sürece hücre siklusunun aktif fazlarına (G_1 , S, G_2 , M) giremezler ve istiharat denen G_0 fazında beklerler. Sürekli bölünen hücrelerde mitozdan sonra siklus interfaz (G_1 , S, G_2) ve mitoz (M) şeklinde tekrarlanır. İnterfaz hücre siklusunun %90'nını kapsar ve 16 -24 saat sürerken, mitoz 1-2 saat sürmektedir (Şekil 147). Hücre bölünmesi G_1 fazında kontrol noktası tarafından düzenlenir. Kontrol noktasında hücre bölünmesi ya duracak ya da hücre siklusu tamamlanacaktır.

G_1 (Gap: Aralık, Boşluk) fazı: Bu fazda hücreler kendi çevrelerini kontrol eder, sinyalleri alır ve bölünmeyi indükler. Bu fazda DNA replikasyonu için hazırlık yapılır. RNA ve protein sentezinde yapılır.

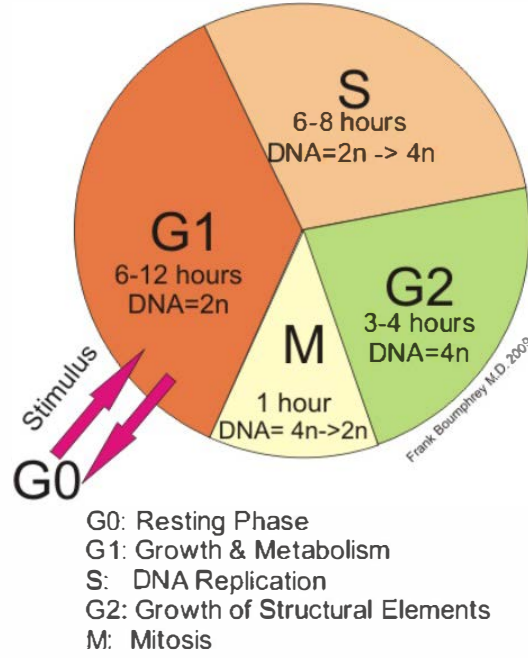
S (Synthesis: Sentez) fazı: Bu fazda DNA sentezlenir.

G_2 (Gap: Aralık, Boşluk) fazı: Bu fazda hücrede RNA ve protein sentezi gerçekleşir ve hücre mitozla hazırlanır.

M (Mitoz)→ Profaz, Metafaz, Anafaz ve Telofazdan oluşur. Bir hücre siklusu fazların işleyiş sırasına göre G_1 , S, G_2 ve M'den oluşur.

Eukaryotic Replication Cycle

(Times are for Cells Growing in Culture)



Şekil 147. Hücre Siklusu

(<https://socratic.org/questions/how-long-are-the-phases-of-mitosis>, 2017)

Hücreyi bölünmeye sevk eden sinyaller çok çeşitlidir. Hücre bölünme sinyali aldığı anda sinyal ileti kaskadı (cascade/şelalesi) denen bir mekanizma devreye girer. Hücre siklusunun süresi hücreden hücreye değişir. Sinek embriyosu 8 dk ile en kısa siklus süresine sahipken, insan karaciğ hücresinin siklus süresi 1 yıldan uzun olabilir.

Hücre siklusu bazı proteinler tarafından kontrol edilmektedir. Bunlar siklinler, siklin bağımlı kinazlar ve siklin bağımlı kinaz inhibitörleridir. Bu proteinlerin miktarları hücre siklusunun farklı fazlarında farklılıklar gösterir.

Siklinler (Cyclins): Siklinler hücre siklusunun çeşitli fazlarını aktive eden spesifik proteinlerdir. Bunlar siklusun çeşitli fazlarında bir taraftan sentez edilirken diğer taraftan da yıkılırlar. Bu yüzden siklin denir. Memeli hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde 16 tane siklin görev yapar. A, B, D ve E olarak isimlendirilmişlerdir (Şekil 148).

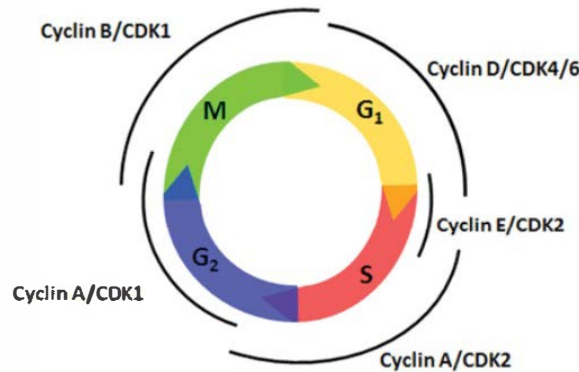
Siklin Bağımlı Kinazlar (Cdks: Cyclin dependent Kinases): Hücre döngüsü protein kinaz kompleksleri tarafından kontrol edilir. Kinaz enzimi bir siklinle çalıştığında buna siklin bağımlı kinaz (cdk) protein denir (Şekil 148). Yani cdk: siklin (yapısal protein) ve kinaz (enzim)'dan oluşur. Kinazlar hedef proteinlere fosfat grupları ekleyerek o proteinlerin aktivitelerini düzenleyen bir enzimdir. Kinazlar kendi başlarına bulunduğu inaktiftir. Ancak siklinle etkileşerek aktifleşir, böylece aktif siklin-cdk komplekslerini oluştururlar. siklin-cdk; siklin düzenleyici alt üniteyi, cdk ise katalitik alt üniteyi oluşturmaktadır. Bu aktif kompleks hedef proteinlerini fosforile ederek döngünün devamlılığını sağlarlar. Bu kompleks G_1 , S, G_2 ve M'ye geçişi de kontrol eder. Memeli hücrelerinde hücre siklusunun düzenlenmesinde 11 tane cdk vardır.

G_1 fazında sentezlenen siklin D, cdk4 ve cdk 6'ya (D-CDK4, DCCK6) bağlanır ve G_1 fazında ilerlemesini sağlar,

G_1 fazında sentezlenen siklin E cdk2'ye (E-CDK2) bağlanır ve hücrenin G_1 'den S fazına girmesini ve S fazında ilerlemesini sağlar,

Siklin A, cdk2 ve cdk 1'e (A-CDK2, A-CDK1) bağlanır ve bunlar hücrenin S fazını terk edip G_2 evresine girmesini sağlar,

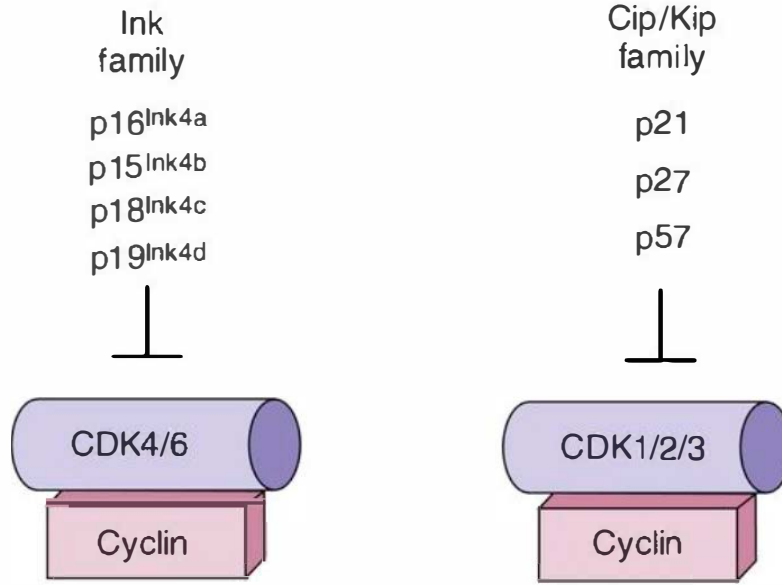
Sonuç olarak, Siklin B, cdk1'e bağlanır (B-CDK1) ve bu kompleks hücrenin G_2 fazından M fazına girmesini sağlar.



Şekil 148. Siklinler ve Siklin Bağımlı Kinazların Hücre Siklusu Boyunca Sentezi

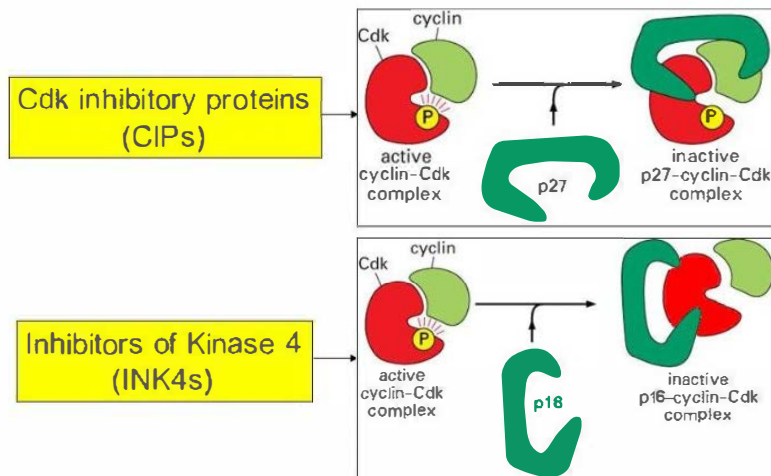
(<http://www.biosciencerep.org/content/30/4/243>, 2010)

Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitörleri (cyclin-dependent kinases inhibitors; CDIs, CKIs ya da CDKIs): Bu inhibitörler, cdk aktivitesini kontrol eder ve DNA replikasyonu inhibe ederler. 2 farklı CKIs ailesi vardır. Birincisi ink4 ailesi, ikincisi cip/kip ailesidir. Her ikisinde siklin cdk kinaz kompleksini inhibe eder (Şekil 149a ve b).



Şekil 149a. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Ailesi
(<https://clinicalgate.com/regulation-of-the-cell-cycle/>, 2015)

CYCLIN DEPENDENT KINASE INHIBITORS (CDKIs)



Şekil 149b. Siklin Bağımlı Kinaz İnhibitör Etkisi
(<http://slideplayer.com/slide/3246570/>, 2017)

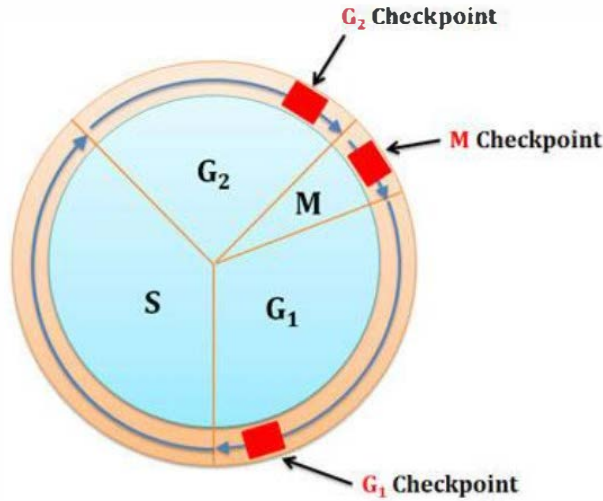
Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları (Check Points)

İnterfazda 2, mitozda 1 kontrol noktası vardır (Şekil 150).

İnterfazdakiler;

İlk Kontrol Noktası; geç G_1 fazında, S fazında girmeden önce gelir (Şekil 150). DNA sentezi için uygun sinyaller olsa bile hücrenin G_1 fazını terketmeden önce DNA'nın doğru durumda (hasarsız) olması gerekir. Eğer herhangi bir hasar saptanırsa hücre ya hasar onarır ya da apoptozise giderek ölür.

İkinci Kontrol Noktası; hücreler mitozda girmeden hemen önce gelir. G_2 'nin sonuna doğru olan kontroldür (Şekil 150). Hücre siklus inhibitörleri hücreyi yeni oluşacak hücrelerin doğru genetik kopyaya sahip olacaklarından emin olana kadar durdurur. DNA replikasyonu tamamıyla ve doğru şekilde değilse hücre bu kontrol noktasında herşeyi başarıyla düzenleyene kadar durur ve sonra M fazına girer.



Cell Cycle Checkpoints

Şekil 150. Hücre Siklusunun Kontrol Noktaları (Check Points)

(<http://www.easybiologyclass.com/cell-cycle-checkpoints-regulation-cancer/>, 2017)

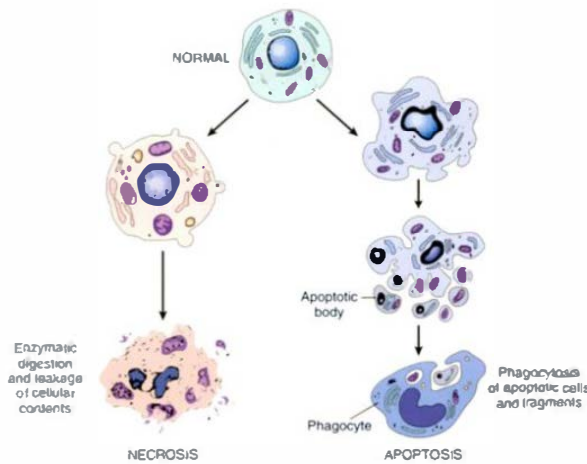
HÜCRE ÖLÜMÜ

Ökaryotik hücrelerde morfolojik ve biyokimyasal analizlerle ayırt edilmiş iki tip hücre ölümü belirlenmiştir. Bunlar, nekroz ve apoptozis'tir.

1- Nekroz: Kontrolsüz, programsız hücre ölümüdür. Aşırı ısı değişiklikleri, toksinler gibi çeşitli fiziksel ve kimyasal etkenler sonunda gelişen travmatik hücre ölümüdür. Nekroz patolojik bir olaydır (Şekil 151).

2- Apoptozis: Kontrollü, programlı hücre ölümüdür. Yaşlanmış, fonksiyonunu yitirmiş, fazla üretilmiş, düzensiz gelişmiş veya genetik olarak hasarı hücrelerin organizma için güvenli bir şekilde yok edilmelelerini sağlayan ve genetik olarak kontrol edilen programlı hücre ölümüdür (Şekil 151). Apoptozis, Yunanca'da Ape (ayrı) ve otozis (düşmek) kelimelerinin birleşmesiyle oluşmuş ve sonbaharda yaprakların dökülmesi anlamına gelen apoptozis ilk kez 1972'de Kerr, Wyllie ve Currie adlı patologlar tarafından kullanılmıştır. Programlı hücre ölümü olarak apoptozis fizyolojik koşullarda vücudun temel bir mekanizması olup hasarlı ya da zararlı hücrelerin ortadan kaldırılmasını sağlar. Apoptozis'i gerçekleştiren genler hayvanlarda ve bitkilerde bulunmuştur.

Apoptozisi nekrozdan ayıran en önemli özellikler; apoptozis de hücrelerin toplu olarak değil teker teker ölmesi, aktif protein, sentezinin gerekmesi, fagositoz sırasında proteolitik enzimler (proteaz) ortaya yayılmaması, hücre zarının ve organellerinin bütünlüklerinin korunmasıdır.



Şekil 151. Nekroz ve Apoptozis

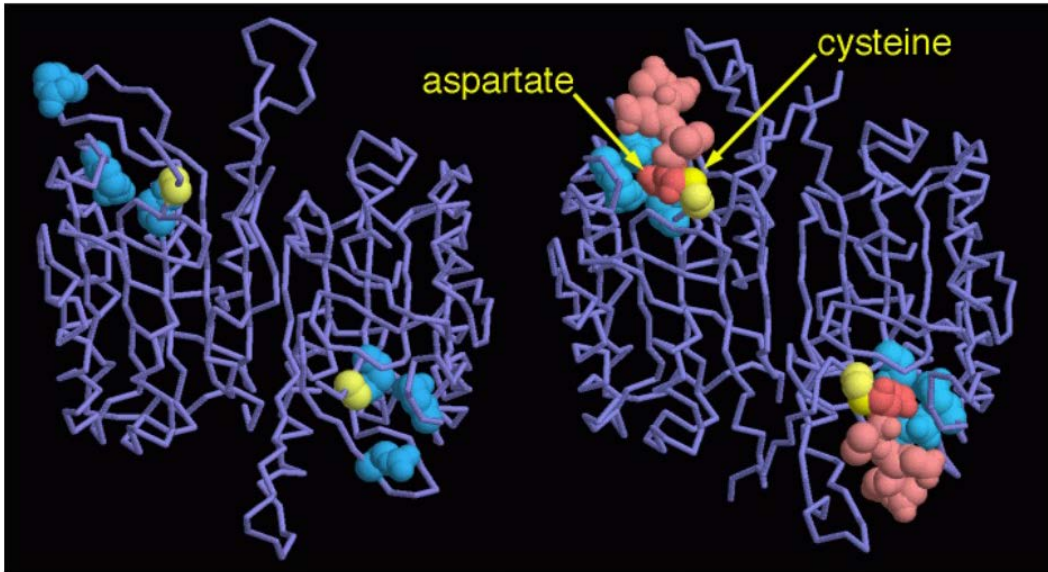
(<http://geoffrey-reedlife.blogspot.com.tr/2011/03/programmed-cell-death-apoptosis.html>, 2011)

APOPTOZİS (KONTROLLÜ, PROGRAMLI HÜCRE ÖLÜMÜ)

Apoptozis’de Kaspaz Enzimleri

Kaspaz enzimleri hücresel giyotin olarak da bilinmektedir. Apoptozisin erken dönemlerinde bir protein ailesi olarak bilinen kaspazların önemli rolü vardır. Bu proteinler normal hücresel fonksiyonlar için gerekli olan yapısal proteinleri ve DNA tamirinde rol alan nüklear proteinlerin parçalanmasından sorumludurlar. Kaspaz enzimleri büyük bir proteaz enzim ailesidir. Enzim aktif merkezinde sistein aminoasitini taşır ve hedef proteinleri aspartik asit (aspartat) birimlerinden kestiği için kaspaz (caspase) ismi verilmiştir (Şekil 152).

c (cysteine: sistein) – asp (aspartate: aspartat) – ase (-az, enzim eki): kaspaz (caspase)



Şekil 152. Kaspaz Enzimi ve Substratına Etkisi

(<http://pdb101.rcsb.org/motm/56>, 2004)

Kaspazlar hücre içerisinde inaktif olarak sentezlenirler ve prokaspaz adını alırlar. Bu inaktif prokaspazlar apoptozis sinyali alınınca hücredeki diğer kaspazlar tarafından aspartik asit birimlerinden kesilerek aktive edilirler. Kaspazlar 1’den 14’e kadar sınıflandırılmıştır (Şekil 153). Apoptoz sırasında ilk görev olan kaspaza ‘başlatıcı ya da öncü kaspaz’

(kasp 2, 8, 9, 10), apoptozun diğer aşamalarında yer alanlara 'efektör kaspaz' (kasp 3, 6, 7) denir. Kaspazlar proteolitik olarak birbirlerini aktifleştirir. Böylece bir şelale şeklinde işlev görürler.

Group I

Casp-1 (ICE)

Casp-4 (ICE_{wt}-II, ICH-2, TX)

Casp-5 (ICE_{wt}-III, TY)

Casp-11 (*murine*)

Casp-12

Casp-13

Casp-14 (MICE)

Group II

Casp-2 (ICH-1)

Casp-8 (FLICE, MACH, Mch5)

Casp-9 (ICE-LAP6, Mch 6)

Casp-10 (Mch4)

Group III

Casp-3 (Yama, CPP32, apopain)

Casp-6 (Mch2)

Casp-7 (ICE-LAP3, Mch3, CMH-1)

Şekil 153. Kaspaz Ailesi

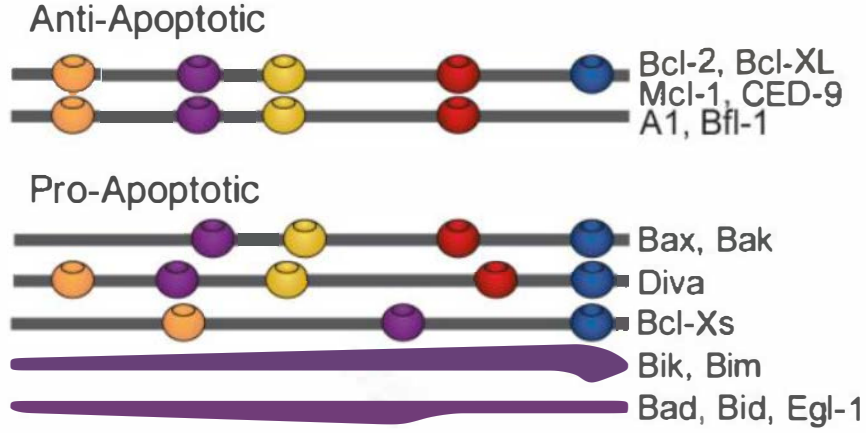
(https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3347503_AN20758251-01-080-g003&req=4, 2009)

Bcl-2 Ailesi

Bu ailede bulunan proteinler apoptozun kontrol noktasında görev alırlar. Bcl-2 kurucu üyedir ve B hücre lenfomasında tanımlandığından bu isim verilmiştir (Bcl=B cell lymphoma).

Mitokondride bulunur. Bcl-2 ailesi üyelerinin bir kısmının apoptozisi hızlandırdığı yani indüklediği (uyardığı) ki bunlara pro-apoptotik (Bax, Bad, Bid proteinleri), bir kısmının ise inhibe ettiği ki bunlara da anti-apoptotik (Bcl-2, Bcl-XL proteinleri) proteinler denilmektedir (Şekil 154).

Bcl-2 Family

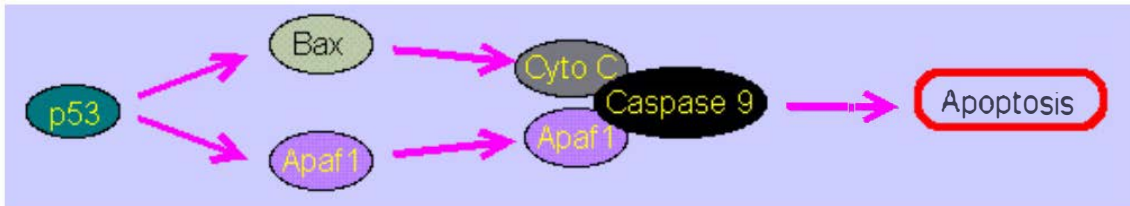


Şekil 154. Bcl-2 Ailesi

(<http://flipper.diff.org/app/items/info/1214>, 2008)

p53 geni

Hücrede iç ve dış nedenlerle DNA hasarı olduğunda aktive olarak apoptoza neden olan en önemli gendir. Bu genden ifade edilen p53 proteini (TP53 ya da tümör proteini) apoptozisi uyarmaktadır (Şekil 155). Bu genin kanser hücrelerinin oluşumunu önlemede önemli rol oynadığı kabul edilir. Normalde inaktif olan p53 geni hücrenin G₁ fazında kalarak S fazına geçmesini engeller. Böylece hücre siklusu durdurularak oluşmuş olan DNA hasarlı hücrenin çoğalması engellenir. Hücre hasarının tamiri başarılı olmazsa bu gen Bax proteinini aktive ederek hücrenin mitokondri aracılığıyla apoptozise gitmesini sağlar. Böylece hasarlı hücre ortadan kaldırılır. İnsan p53 geni on yedinci kromozom üzerinde yer alır.



Şekil 155. P53 proteinin Apoptozisdeki Rolü

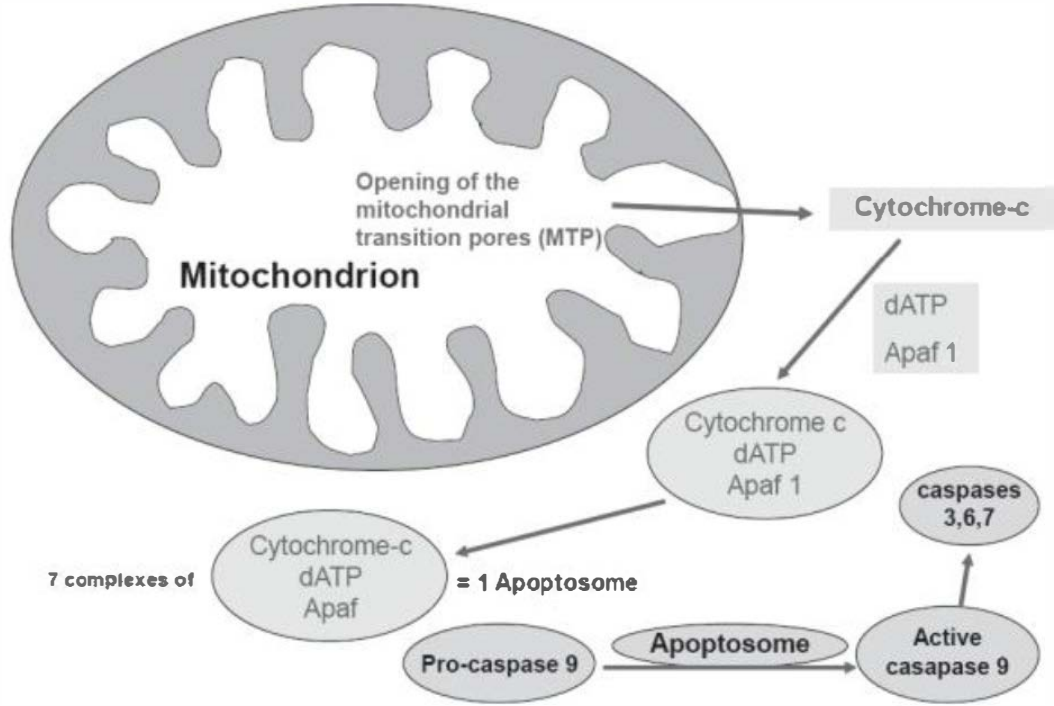
(<http://www.bioinformatics.org/p53/introduction.html>, 2017)

APOPTOSİZDE SİNYAL YOLAKLARI

Apoptosizde en iyi anlaşılan iki mekanizma içsel yolak (mitokondriyal yol olarak da adlandırılır) ve dışsal yolaktır.

1- İçsel Yolak (intrinsic pathway, mitokondriyal yol):

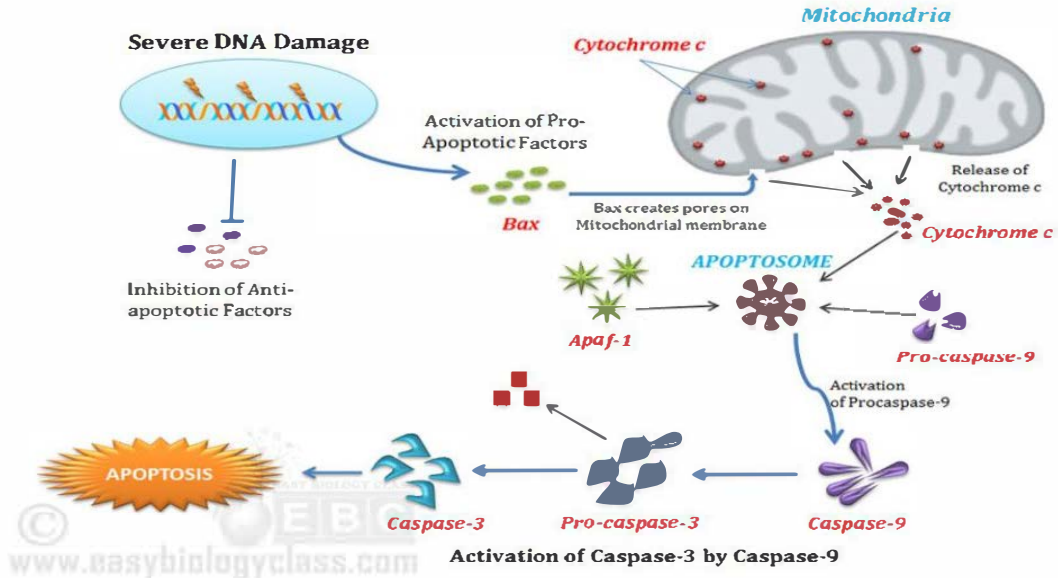
Hücreden kaynaklanan çok çeşitli sinyaller tarafından tetiklenen yoldur. Bu yolda mitokondri görev alır (Şekil 156a ve b). Mitokondrinin dış zarında oluşan geçirgenlik artışı Bcl-2 ailesinde bulunan pro ve anti-apoptotik proteinlerin karşılıklı etkileşimleri sonucu oluşur. Hem pro hem de anti-apoptotik üyeleri olan bu ailelerin mitokondri üzerindeki etkileriyle ya sitokrom-c'nin (cyt-c) sitoplazmaya salınması gerçekleşir ve apoptozisin başlatılması olayı gerçekleşir ya da sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasının baskılanması ile apoptozis inhibe edilir. Anti-apoptotik Bcl-2 proteinleri mitokondri dış membranına ve apoptozu aktive edici faktör olan apaf-1'e tutunmuştur. Hücre içinden alınan apoptotik sinyaller apaf-1'in mitokondriden ayrılmasına sebep olur. Bu ayrılma mitokondri zarının geçirgenliğini arttırır. Bu artış mitokondrinin iki zarı arasında bulunan sitokrom-c'nin sitoplazmaya salınmasına yol açar. Sitokrom-c sitoplazmada apaf-1'le birleşir. Bu yapıya prokaspaz 9 ve ATP katılarak apoptozom denen bir bütün oluşturulur. Apoptozomda prokaspaz 9 proteolitik olarak aktifleşir ve sitoplazmada bulunan diğer kaspazları aktive eder (kaspaz 3, 6 ve 7'yi). Aktive olan kaspazlar hücredeki birçok yapıyı enzimatik olarak tahrip eder ve apoptozisi başlatırlar (Şekil 156a ve b).



Şekil 156a. İçsel Yolak (intrinsic pathway, mitokondriyal yol)

(https://www.researchgate.net/publication/5770600_Ischemic_preconditioning_Protection_against_myocardial_necrosis_and_apoptosis/figures?lo=1, 2007)

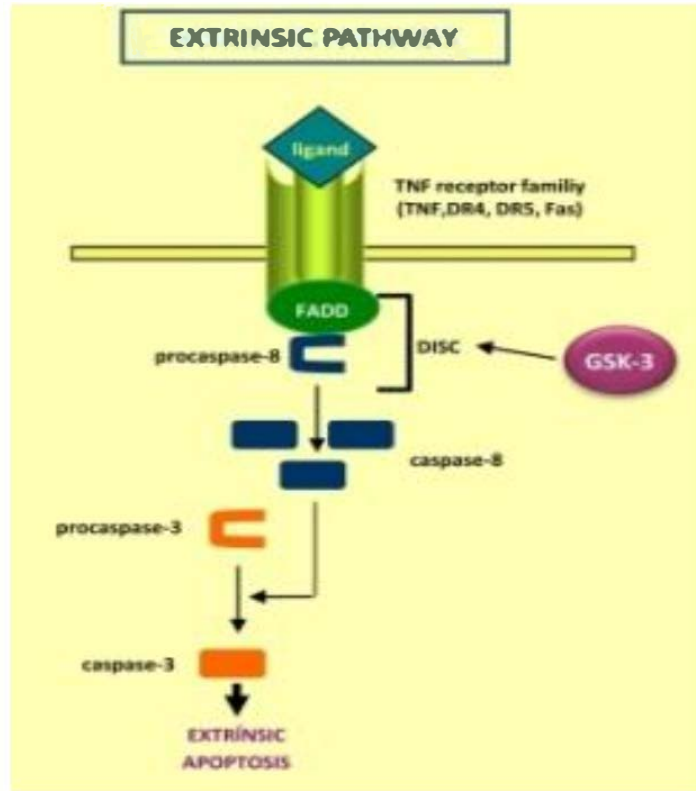
INTRINSIC PATHWAY OF APOPTOSIS (Mitochondria Mediated Programmed Cell Death Pathway)



Şekil 156b. İçsel Yolak

(<http://www.easybiologyclass.com/intrinsic-pathway-of-apoptosis-apoptosis-molecular-mechanism-part-1/>, 2017)

2- Dışsal Yolak (extrinsic pathway): Apoptozu tetikleyen sinyal moleküllerinin hücre zarında bulunan hücre ölüm reseptörlerine bağlanması apoptozu başlatır. Hücre ölüm reseptörü olarak bilinen Fas ya da tümör nekroz faktörü (TNFR-I) ile etkileşime girmesiyle indüklenir. Fas kendisine doğal olarak bağlı bulunan ve ölüm bölgeleri denen FADD (Fasla ilgili ölüm domaini, Fas-associated death domain) ile ilişkiye girerler. Bu ölüm bölgeleri ise sitoplazmada bulunan prokaspaz 8'i aktifleştirerek diğer kaspazların (kasp 3, 6, 7) şelale tarzında aktivasyonunu başlatırlar. Aktive olan kaspazlar hücredeki birçok yapıyı enzimatik olarak tahrip eder ve apoptozu başlatırlar (Şekil 158).



Şekil 158. Dışsal Yolak (Extrinsic Pathway)

(https://openi.nlm.nih.gov/detailedresult.php?img=PMC3217194_fm01-04-00045-g001&req=4, 2011)

APOPTOZUN AŞAMALARI

Apoptoz hücre içinden veya dışından gelen sinyallere başlatılan ve birbirini takip eden olaylar zinciri olarak seyreder. Sonuçta hücrenin fagositozu ile apoptozis sona erir. Bu aşamalar;

- 1- Apoptozisin başlatılması (sinyallerin alınması)
- 2- Kaspazların aktivasyonu
- 3- Hücrede morfolojik ve biyokimyasal değişikliklerin oluşması
- 4- Fagositoz

Apoptozdaki Morfolojik ve Biyokimyasal Olaylar

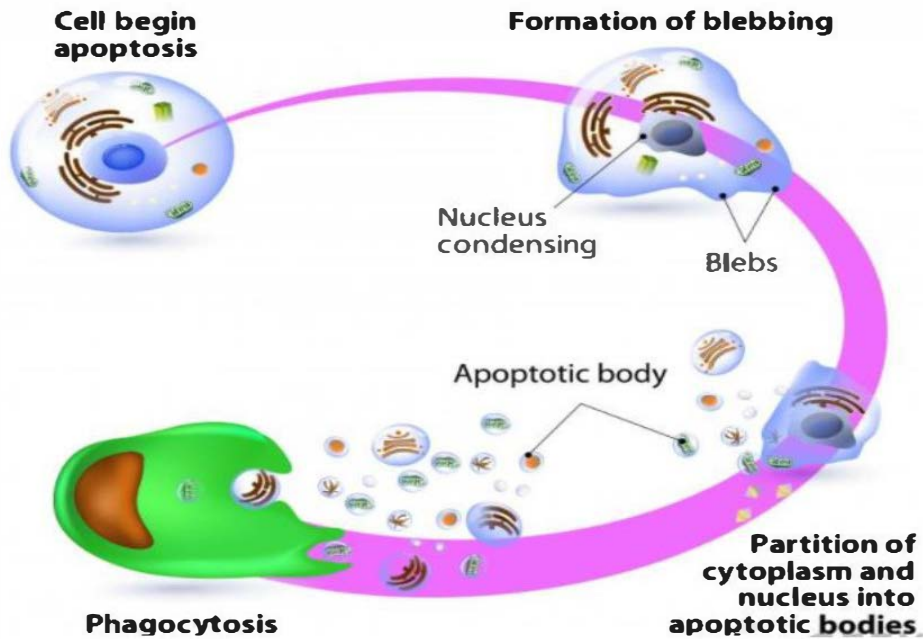
Biyokimyasal değişiklikler: DNA kırıklarının oluşumu, hücre iskeletinin yıkılması, hücre membranı değişikliklerini kapsar.

Morfolojik olaylar: Hücre büzülmesi, kromotin yoğunlaşması, nükleusun parçalanması, apoptotik cisimciklerin oluşumunu kapsar.

Apoptotik Cisimcikler ve Hücrelerin Fagositozu

Apoptotik uyarıdan sonra hücre yuvarlaklaşır ve içeriği bir araya toplanır, sitoplazması büzülür. Hücre parçalanarak apoptotik cisimcikler oluşur. Bu birkaç dk sürer. Bu cisimciklerin fagositozu için 12-18 saat gerekir (Şekil 159).

Yakındaki komşu hücreler ve makrofajlar apoptotik cisimcikleri parçalarlar. Oluşan boşluk komşu hücrelerin göçü veya çoğalmasıyla apoptotik hücrenin boşluğu doldurulur.



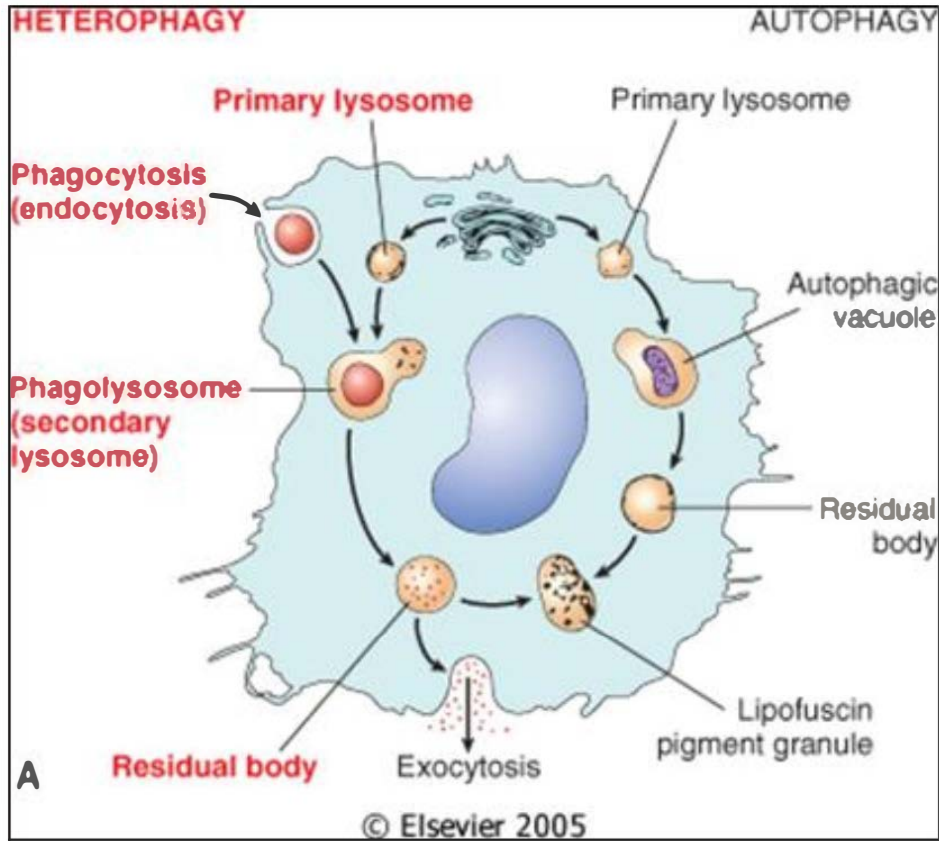
Şekil 159. Apoptotik Cisimcikler ve Hücrelerin Fagositozu

(<http://www.wisegeek.com/what-are-phagocytes.htm#diagram-of-apoptosis>, 2017)

Vücuttaki fagositozdan sorumlu hücreler, lökositler ve makrofajlardır. Bunlar profesyonel çöpçü hücrelerdir. Ortamdaki artıkları temizlerler. Artıkların temizlenmesi 2 yolla olur:

1- Heterofoji: Dış çevreden materyaller endositozla alınır. Katı partiküllerin alınımı '**fagositoz**', sıvı ve küçük moleküllerin alınımı '**pinositoz**' olarak adlandırılır. Heterofaji bir hücrenin başka bir hücrenin artıklarını yemesidir (Şekil 160). Nötrofil ve makrofajlarda yaygındır.

2- Otofoji: Bazen hücrenin kendi içerisinde organelleri zarar görür ve organel düzeyinde bazı atıkları kendi kendine yok eder. Bu olayda hücre hayattadır, ölmemiştir. Sadece bazı organelleri zarar görmüştür. Bu atıklar ya da bazı metabolik organel artıklarını hücre içinde yok etmesine 'otofaji' denir (Şekil 160). Hücre zedelenmesi sırasında yaygın olarak görülür.



Şekil 160. Heterofoji ve Otofoji

(<http://slideplayer.com/slide/10294128/>, 2017)

Apoptozun Kontrol Noktaları

Apoptozun olup olmayacağı Bax, Bcl-2 dengesinin doğruluğu belirler. Hücrenin apoptozise gitmesi için Bax düzeyinin Bcl-2'den fazla olması gerekir. Bu mekanizma apoptozda kontrol noktası-1 olarak önerilmiştir. 2. Kontrol noktası çok iyi belirlenmemiştir.

APOPTOZUN HESAPLANMASI

Yöntemler:

- 1) Morfolojik Görüntüleme Yöntemleri
- 2) İmmunohistokimyasal Yöntemler
- 3) Biyokimyasal Yöntemler
- 4) İmmunolojik Yöntemler
- 5) Moleküler Biyoloji Yöntemleri

Apoptotik hücredeki morfolojik değişiklikleri saptamak için ışık ve elektron mikroskobu kullanılır. Kaspazın aktivitesinin ölçülmesi, mitokondrinin yapısına bakılması ve Bax/ Bcl-2 oranının saptanmasıyla apoptotik hücreler belirlenir.

KISIM 11

REKOMBİMAT DNA TEKNOLOJİSİ (rDNA Teknolojisi)

Klon: Genetik olarak birbirinin aynı hücreler grubu

Gen klonlama: Bir genin kopyalarının oluşturulması Ana gen ile aynı (wild-type) Ana genden farklı (mutant)

Rekombinant DNA: Farklı DNA parçalarının birleştirilmesi

Rekombinant DNA (rDNA) Teknolojisi: Rekombinant DNA moleküllerinin bir konak hücreye aktararak çoğalmalarını (klonlama) sağlayan bir dizi işlemi kapsayan teknoloji.

1970 yılında Hamilton Smith mikroorganizmalarda bulunan ve DNA'yı spesifik dizi bölgelerinden kesen restriksiyon endonükleaz enzimlerinin bulunmasıyla rekombinant DNA teknolojisi ortaya çıkmıştır. Bu teknoloji ile doğada normalde görülmeyen rekombinant varyasyonlar elde edilebilmekte, genlerin organizmalarda etki düzeyleri değiştirilebilmekte, organizmalara çok uzak kaynaklardan yeni genler aktarabilmekte ve genomların nükleik asitlerin analizi gerçekleştirilebilmektedir. Bu teknoloji ile tıpta birçok genetik bozukluklar ve hastalıkların teşhis, tedavisi yapılır. Yine bu teknolojiyle mutasyonların adlandırılması ve kromozomlar üzerinde haritalanması, kalıtsal hastalıkların taşıyıcı ve hasta bireylerde teşhisi, tedavi amacıyla sağlıklı bireyden hasta bireye gen transferi mümkün kılınmıştır. 1979'da rekombinant DNA teknolojisi ile insülinin biyosentezi gerçekleştirilmiştir.

rDNA TEKNOLOJİSİNDE KULLANILAN VEKTÖRLER

Gen klonlanmasında kullanılan aracı moleküllere vektör denir. Kendini bağımsız olarak replike edebilmelidir. Bir bölgesinde birçok RE için tek kırılma noktasına sahip olmalıdır ki, bu noktadan RE ile kesip yabancı DNA parçası ile birleşsin. Üzerinde seçilebilir bir belirleyici (selection marker) taşınmalıdır. Bu sayede yabancı DNA'yı taşıyan konakçı hücreler ayırt edilebilir. Konakçıdan kolayca izole edilebilir olmalıdır.

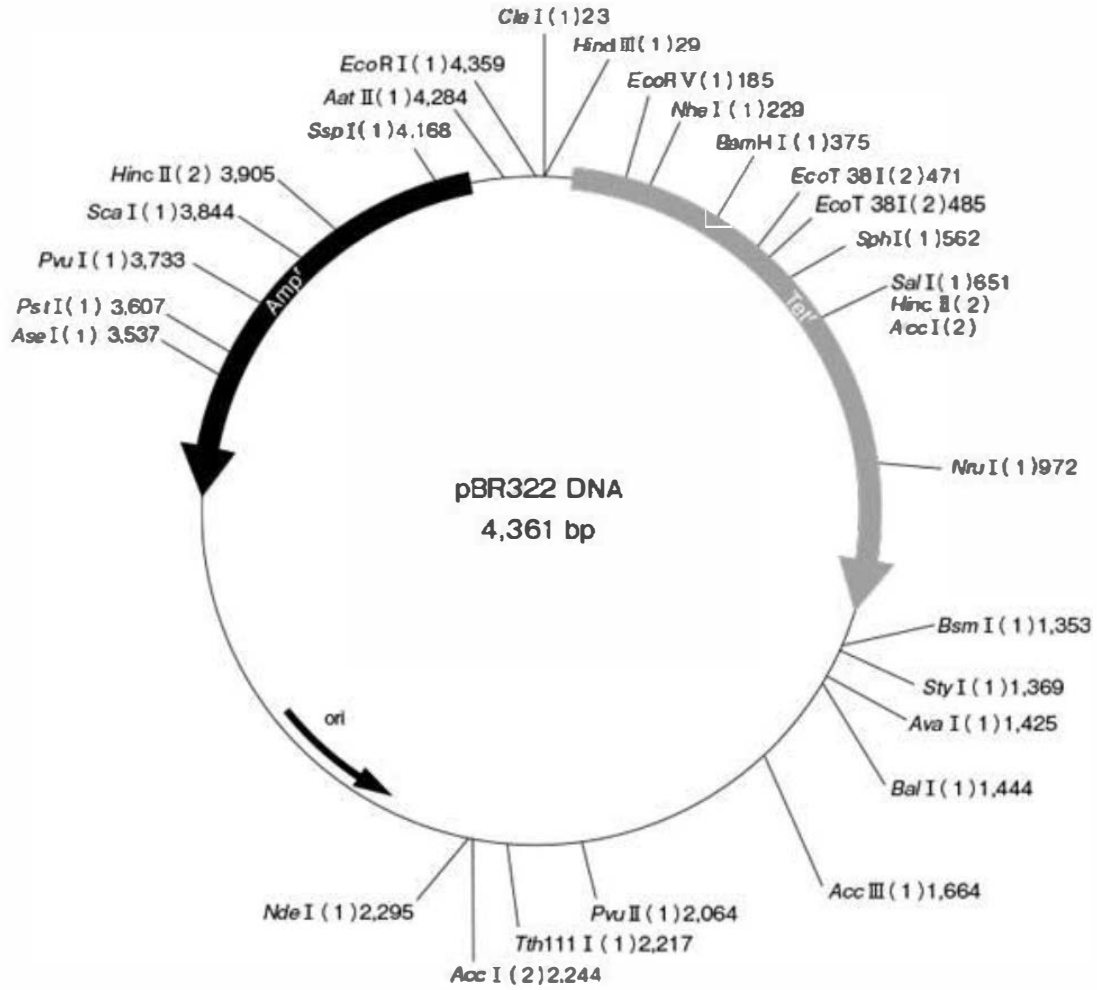
Vektörler olarak, Plazmidler, Bakteriyofajlar, Kosmidler, Bakteri yapay kromozomları (BAC), Maya yapay kromozomları (YAC), Memeli yapay kromozomları (MAC), İnsan yapay kromozomları (HAC) kullanılmaktadır.

Plazmidler

Plazmidler bakterilerde bulunan kromozom dışı (ekstra kromozomal) DNA parçacıklarıdır. Hemen her tür bakteride plazmidlere rastlanabilmektedir. Genellikle çift zincirli çembersel DNA'lar olmakla birlikte, bazı bakterilerde çizgisel plazmidlere de rastlanmıştır. Kromozomal DNA gibi, çeşitli proteinleri sentezleyebilen genler bulunmaktadır. Bu proteinler genellikle yaşam için şart olan proteinler değil, belli ortamlarda, özel koşullarda, bakterilere avantaj sağlayan proteinlerdir. Bunlar arasında antibiyotik ve başka toksik maddelere karşı direnç, antibiyotik sentezi, toksin yapımı sayılabilir. Plazmidlerin kromozomdan bağımsız var olabilmeleri için başlangıç proteinlerinin tanıyabileceği bir replikasyon orijini 'ori' bölgesi bulunur. Birçok 'ori', sadece bir tür bakteri tarafından tanındığı için sadece o bakteri içerisinde çoğalabilir. Birçok türde bakteri içerisinde çoğalabilen plazmidler saptanmıştır. Bu tür plazmidler genellikle kendi çoğalmaları için gerekli genlerin çoğunu kendi üzerlerinde taşırlar.

Doğal olarak bulunan plazmitler büyük ve kullanışsız olduklarından, bunların yerine in vitro ortamda amacına yönelik olarak hazırlanan yapay plazmid vektörler kullanılmaktadır. Üzerlerinde ampiciline, tetrasiklin, kanamisin gibi antibiyotiklere karşı direnç genleri taşırlar. Bunlar seleksiyonda önemli fonksiyonu olan marker genlerdir. Plazmid vektör

10 kb yabancı DNA alabilir. Yapay plazmidler pBR 322, pUC 18, pUC-19 plazmitleridir. pBR322 en fazla kullanılan yapay plazmittir (Şekil 161).



Şekil 161. pBR 322 Plazmid Yapısı ve Kesim Bölgeleri

(<http://www.nippongene.com/siyaku/product/dna-cloning/pbr322-dna/pbr322-dna.html>, 2017)

Shuttle (mekik) plazmid vektörler

Prokaryotik promotor taşıyan ekspresyon vektörlerine, ökaryotiklere ait bir promotor da ilave edilirse, bu tarzda hazırlanan vektör hem prokaryotik ve hem de ökaryotik mikroorganizmalarda replike olabilir (bifonksiyonel plazmitler).

Bakteriyofajlar

Faj'lar bakteriyi enfekte eden virüslerdir. En önemlileri Lambda (λ) ve M13 bakteriyofaj vektörleridir. Bunlar *E.coli* virüsü olup, klonlanacak DNA ile lamda DNA'sı birleştirilir, bir protein kılıf içinde konak hücreye girerek orada çoğalır. Bakteriofajlar plasmidler gibi antibiyotiğe karşı direnç geni taşımazlar. Lambda bakteriyofajı 50 kb uzunluğundadır ve 20 kb yabancı DNA bu vektörlere sokulabilmektedir.

Kozmid vektörler

Doğal yolla meydana gelmezler. Plazmid ile lambda DNA'sının birleştirilmesi ile elde eden hibrit vektör sistemleridir. Yani bir bakteriye ait ve replikasyon orijin bölgesine sahip plasmidle, buna birleştirilmiş lambda fajı yapışkan ucundan (cos, cohesive ends) oluşturulmuşlardır. Cos dizisi vektörün protein kılıf içine paketlenmesi için gerekli sinyal dizisidir. Bunun yanında bir kozmid vektörü bir replikasyon merkezi, bir antibiyotik direnç geni ve çoklu klonlama bölgesi içerirler. Restriksiyon enzimi ile kesilen bir kozmid vektöre 35–50 kb büyüklüğünde DNA parçaları eklenebilir.

Bakteri yapay kromozomları BAC (Bacterial artificial chromosomes) vektörleri

Antibiyotik direnç geni, RE bölgeleri, F faktör genlerini içermektedir. BAC vektörleri büyük DNA fragmentlerini klonlamada ve özellikle büyük genomların sıra dizilerinin eldesinde kullanılırlar. BAC vektörü 300kb'a kadar yabancı DNA'yı içine alabilir.

Maya yapay kromozomu, YAC (Yeast artificial chromosomes) vektörleri

Çok büyük DNA (200-500 kb veya 1–2 Mb) fragmentlerini kabul edebilir. Bir kromozomun önemli öğeleri olan telomerleri, sentromeri ve replikasyon başlangıç noktasını içerirler. 1 Mb DNA taşıyabilir. Maya hücresinde çoğalabilir. İnsan Genom Projesinde kullanılmıştır.

Memeli yapay kromozomu (MAC) vektörleri

Memeli yapay kromozomları, kromozomların fonksiyonel bölgelerini (sentromer, telomer, replikasyon orijini) taşıyan ve hücreden bağımsız olarak çoğalabilen moleküllerdir. MAC yüzlerce kb büyüklüğünde genomik DNA taşıyabilir.

İnsan yapay kromozomu (HAC) vektörleri

HAC'lar, insan DNA dizileri, sentromer dizisi, telomer dizisi ve DNA replikasyon noktasının olması ile gen tedavisi için avantajları olan bir vektördür.

Ekspresyon Vektörleri

Promotör bölgesi bulunan vektörlerdir (plazmid, mekik, vs olabilir). Bir proteini yüksek miktarda üretmek için kullanılır.

rDNA TEKNOLOJİSİNDE MAKAS GÖREVİ YAPAN RESTRIKSİYON ENZİMİ

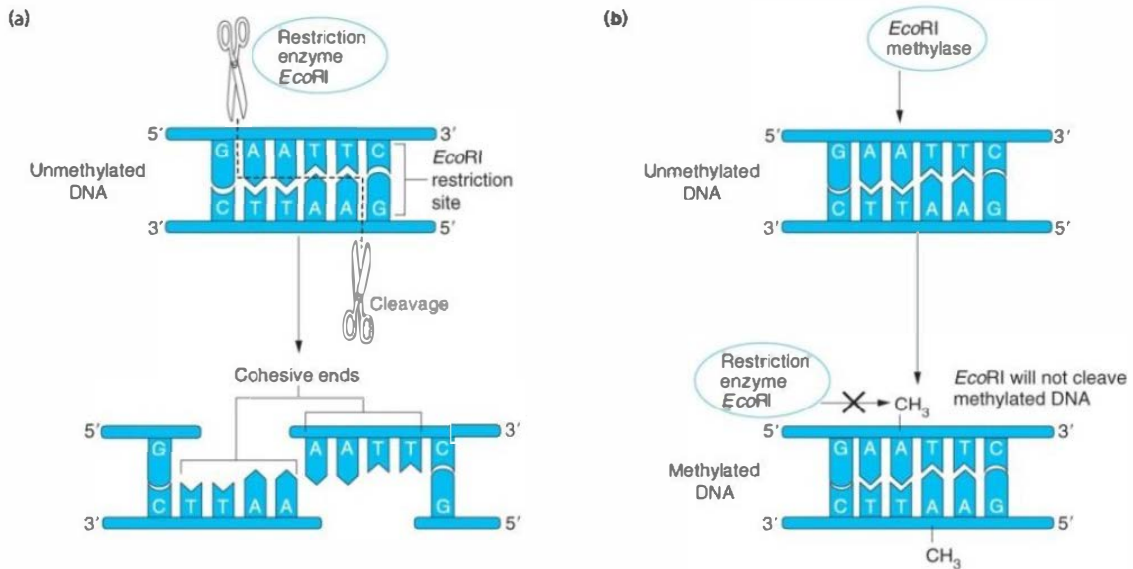
Restriksiyon enzimi (restriksiyon endonükleazı, kesme enzimi, makas veya sınırlama enzimi de denir) çift zincirli DNA moleküllerindeki belli nükleotid dizilerini tanıyan ve her iki zinciri birlikte kesen bir enzim türüdür. Nükleazların adlarını ayrıca bir ön ek 'endo' veya 'ekzo' ilave edilmiştir. Restriksiyon endonükleazlar, bir nükleik asit zincirini iç kısımdan ve belirli bir nükleotit dizisinden kesen nükleazları, restriksiyon ekzonükleazlar ise DNA zincirini uçlardan kesen nükleazları ifade eder.

Restriksiyon enzimleri DNA çift sarmalında kendilerine özgü tanıma dizilimini şeker ve fosfat omurgasından kırar (Şekil 162). Bazı restriksiyon endonükleazlar spesifik tanıma dizilimine ihtiyaç duymazlar.

- Tanıma dizileri bazı restriksiyon enzimleri için DNA zincirinin her ikisinde de aynıdır. Bunlar palindromik diziler olarak adlandırılırlar.
- Restriksiyon enzimleri DNA helixiyapışkan veya küt uçlar meydana getirebilir. Yapışkan uçlar komplementerleriyle birleşme eğilimindedir.

Bu özel enzimler, bakteri ve arkelerde bulunurlar. İlk olarak 1968'de K.W. Wilk, H.O. Smith ve T.S. Kelley tarafından *Haemmophilus influenza* bakterisinden İzole edilen bu ilk enzim Hind II'nin keşfidir. Günümüzde yaklaşık 250 adet farklı bakteri suşundan (ırkından) elde edilmiş 1200'e yakın RE enzimi saptanmıştır. Bu enzimlere genellikle izole edildikleri mikroorganizmayı yansıtan isimler verilir. Bu enzimler adlandırılırken izole edilen bakterinin cins isminin ilk harfi ve tür isminin ilk iki harfi kullanılır. Romen rakamı ise enzimin izolasyon sırası belirtilir. Örneğin EcoRI enzimi (E = cins (*Escherichia*), co = tür (*coli*), R = suş (RY 13) I = Bu mikroorganizmadan izole edilen ilk RE olduğunu belirtir), Hind II (*Haemophilus influenzae* Rd suşu)

Bu enzimler virüslere karşı bir savunma mekanizması olan restriksiyon modifikasyon sistemine aittirler. Bakteri ox içindeki görevleri hücre içine giren yabancı kaynaklı DNA'ları parçalamaktır. Bu işlem sırasında bakterinin kendi DNA'sı zarar görmez çünkü metilasyon enzimi olan metilaz enzimleri restriksiyon enzimlerinin kesim bölgelerine metil grubu ekleyerek (metilasyon) DNA'yı restriksiyon enzimlerin kesiminden korur ve hücrenin kendi DNA'sını parçalamasını önler (Şekil 162).



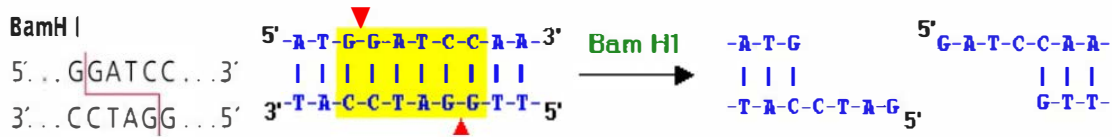
Şekil 162. Makas Görevi Yapan Restriksiyon Enzimi
(Rowland-Goldsmith, 2012)

Bir restriksiyon endonükleazları önce bir DNA molekülünü boydan boya tarar. Kendi tanıma zinciriyle karşılaştığında ona bağlanır ve çift sarmalın her 2 ipliği üzerinde birer adet şeker fosfat bağı keser. Şeker-fosfat omurgasındaki fosfodiester bağlarını keser. H bağlarını kesemez. H bağları fosfodiester bağının kırılmasıyla çözeltideki termal (ısı) hareketinden doğan enerjinin etkisiyle kendiliğinden kırılır. RE enzimlerinin çoğu özgün bir tanıma dizisinden DNA'yı keser ve 3 farklı tipte uç üretir:

1) 5' Yapışkan Uçlar:

Enzim 5' uçtan tek iplikli birkaç nükleotit uzunlukta bir uzantı bırakarak DNA'yı keser (Şekil 163).

Örnek: BamH I (*Bacillus amyloliquefaciens* H)



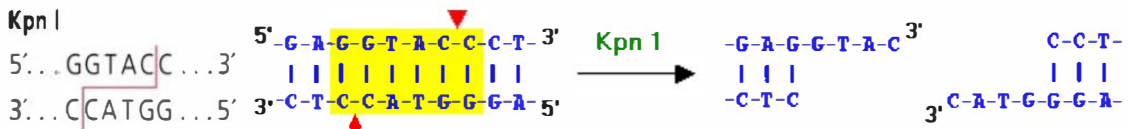
Şekil 163. 5' Yapışkan Uç Oluşumu

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r0260?lang=en®ion=TR>, 2017)

(https://www.slideshare.net/veerender_kambam/dna-cloning-intro, 2012)

2) 3' Yapışkan Uçlar:

Bu kez uzantılar 3' uçta oluşur (Şekil 164). Örneğin: Kpn I (*Klebsiella pneumoniae*)



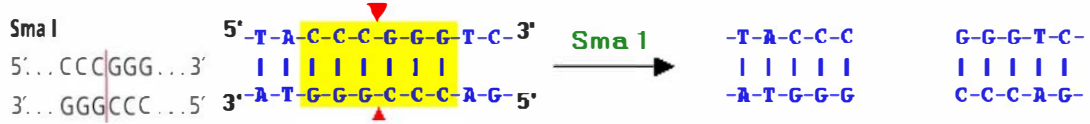
Şekil 164. 3' Yapışkan Uç Oluşumu

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r1258?lang=en®ion=TR>, 2017)

(https://www.slideshare.net/veerender_kambam/dna-cloning-intro, 2012)

3) Küt Uçlar:

Kesimin her 2 ipliği üzerinden aynı noktadan yapılmasıyla uzantısız eşit uçların oluşma durumudur (Şekil 165). Örnek: Sma I (*Serratia marcescens*)



Şekil 165. Küt Uç Oluşumu

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/r4503?lang=en®ion=TR>, 2017)
(https://www.slideshare.net/veerender_kambam/dna-cloning-intro, 2012)

Bazı restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri tablo 10'da verilmiştir.

Tablo 10. Bazı restriksiyon enzimlerinin kesim bölgeleri

Some restriction enzymes			
Enzyme	Source organism	Restriction recognition site in double-stranded DNA	Structure of the cleaved products
(a) <i>EcoRI</i>	<i>Escherichia coli</i>		5' overhang
<i>PstI</i>	<i>Providencia stuartii</i>		3' overhang
<i>SmaI</i>	<i>Serratia marcescens</i>		Blunt ends
(b) <i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i>		Blunt ends
<i>HpaII</i>	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>		5' overhang

(<http://slideplayer.com/slide/7876413/>, 2017)

Bağlama veya ligasyon, rDNA teknolojisinde klonlanacak geni taşıyan DNA parçaları ile vektörün bir enzim aracılığı ile birbirlerine

bağlanması işlemine denir. Bu işlem için ligaz enzimleri görev yapar. Yapışkan uçların ligasyon etkinliği küt uçlara göre oldukça yüksektir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında genellikle yapışkan uçlar tercih edilmektedirler. Klonlama çalışmalarında eğer klonlanacak DNA küt ucu ise kısa çift iplikli adaptör ya da bağlayıcı (linker) moleküller eklenir. Bu moleküller yapışkan uç meydana getiren, vektör DNA ile uyumlu bir restriksiyon enzimi kesim bölgesi içerirler ve çok yüksek DNA konsantrasyonları ile çalışılmasını gerektirir.

GEN KLONLAMA BASAMAKLARI

rDNA teknolojisinin ilk aşaması çalışılan organizma DNA'sı ve vektör DNA'sının izolasyonudur. Daha sonra organizmadan elde edilen DNA'nın ilgili parçasının restriksiyon enzimleriyle kesildikten sonra bakteri plazmiti gibi kendisi çoğalabilen bir taşıyıcı DNA (vektör) içine entegre edilmesidir. Vektör DNA'sı ve içine eklenen DNA parçasının oluşturduğu yeni DNA molekülüne "rekombinant DNA" denir. Daha sonra bu molekül bakteri hücrelerine aktarılarak çok fazla miktarda ilgili genin üretimi sağlanır (Şekil 166). Bunları açacak olursak;

1- Kaynak DNA'nın ve vektör DNA'sının izolasyonu:

rDNA üretiminin ilk aşaması çalışılan organizma DNA'sı ve vektör DNA'sının izolasyonudur. DNA izolasyonu hücre duvarı ve/veya hücre zarının SDS (sodyum dedosil sulfat) gibi deterjanlarla zayıflatılıp parçalanarak DNA'nın açığa çıkarılması, protein ve polisakkaritlerin organik çözücülerle, RNA'nın da RNaz enzimi ile ortamda uzaklaştırılması ve sonrasında DNA'nın tuz ortamında alkol ile çöktürülmesi basamaklarından oluşmaktadır. Vektör DNA'larının izolasyon metotları kullanılan vektör tiplerine göre bazı değişiklikler göstermektedir. En yaygın vektör olan plazmitlerden DNA izolasyonu için kullanılan yöntemler genomik DNA izolasyonunki ile aynıdır. Kaynak DNA PCR ile çoğaltılmış gen veya genler, in vitro koşullarda yapılmış sentetik DNA'lar olabilir. Eğer genomik DNA kaynak ise o zaman DNA restriksiyon enzimleriyle kesilir, belli boyutlarda DNA parçaları içeren karışım elde edilir (Şekil 166).

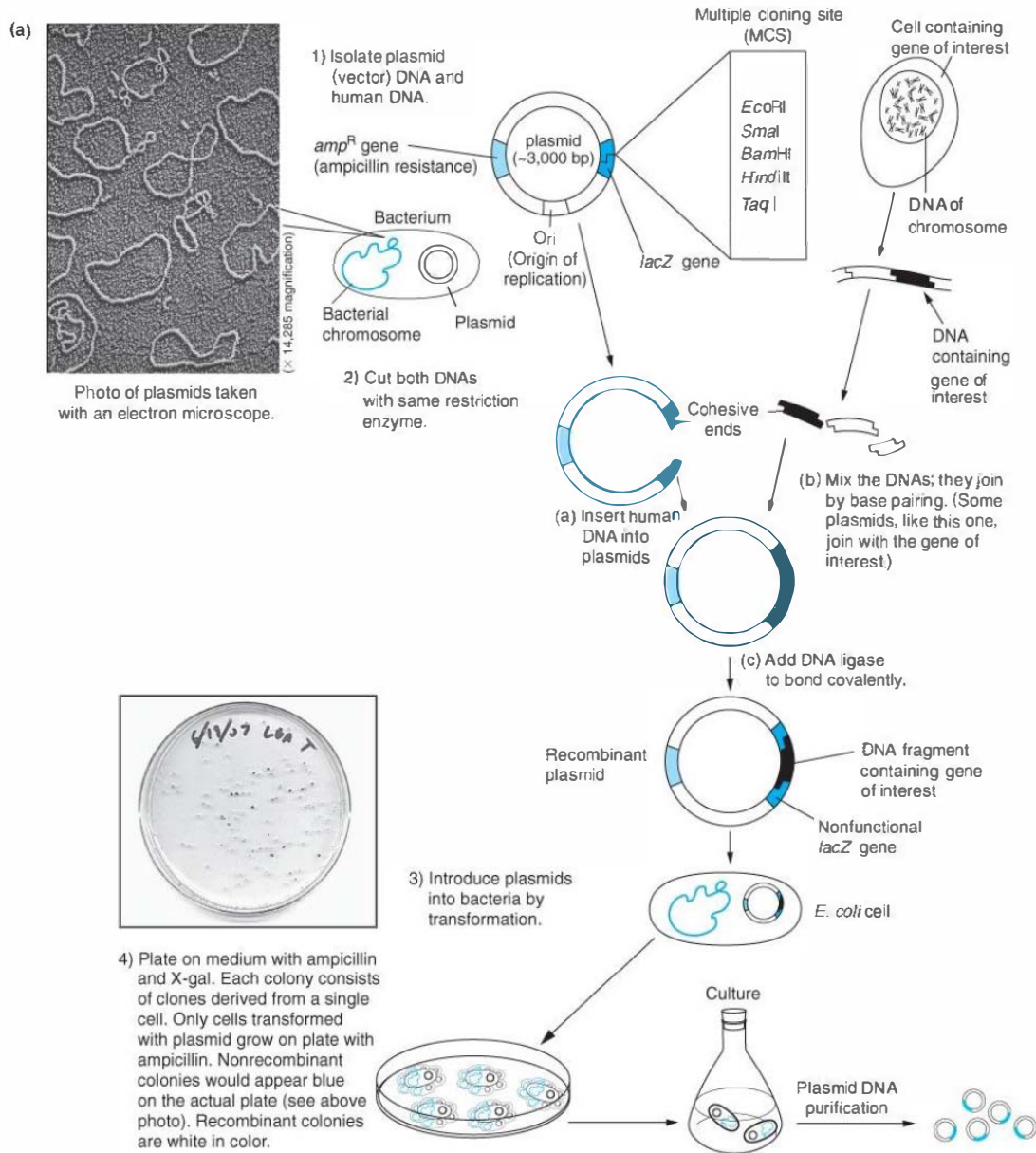
2- Restriksiyon enzimleri ile DNA'nın kesilmesi: Kesim noktaları simetri merkezinde veya dışında olabilir ve buna bağlı olarak da küt veya yapışkan uçlu DNA fragmentleri verirler. RE enzimi DNA çift sarmalının şeker-fosfat omurgasından keser. Genomik DNA fragmentler için hangi RE kullanılmışsa, aynı enzim vektör için de kullanılır. Çünkü vektör DNA'sı ile genomik DNA fragmentleri arasında birleşmenin sağlanabilmesi için bu uçların birbirlerinin komplementeri olması gerekmektedir (Şekil 166).

3- Uygun gen taşıma aracına (Vektör) aktarılması: En çok kullanılan vektör pBR322 plazmittir. Restriksiyon enzim kesimi ile oluşturulmuş aynı yapışkan uç dizisini taşıyan DNA parçaları birbirleri ya da aynı restriksiyon kesim yapılmış başka DNA parçaları ile in vitro şartlarda birleştirilebilir. Bu işlem DNA ligaz enzimleri ile gerçekleştirilir ve ligasyon olarak bilinir. Rekombinant DNA teknolojisinde ligaz enzimi ilgi duyulan DNA parçalarını vektör DNA moleküllerine in vitro şartlarda kovalent bağlarla bağlayarak rekombinant DNA elde edilmesinde kullanılır. DNA ligaz enzimi ATP varlığında birbirine geçici olarak hidrojen bağları ile tutunmuş yapışkan uç taşıyan DNA parçalarından birinin 3' hidroksil ucuyla, vektörün 5' fosfat ucu arasında 3'-5' fosfodiester bağı oluşumunu katalizler. **Rekombinant DNA** (Rekombinant Plasmid) elde edilir (Şekil 166).

4- Rekombinant DNA'nın alıcı hücreye aktarılması: Alıcı hücre olarak bu plasmidlerin ait olduğu uygun konakçı hücreler kullanılır. pBR322 ve pUC için en uygun alıcı *E. coli*'dir. pUB110 plasmidi için ise *B. Subtilis*'tir. Vektör ve genomik DNA segmentleri birleşmesinden oluşan rekombinant plamid, yeteri miktarda konakçı *E. coli* ile birlikte bulundurulduktan sonra, içinde Ca^{+2} iyonları bulunan uygun bir sıvı besiyeri yerine transfer edilirler. *E. coli* 60-90 dakika kadar 37°C'de üretilir. Ortama katılan $CaCl_2$ *E. coli* 'nin yüzeyini, sirküler plasmid DNA'sı için geçirgen hale getirir ve rekombinant plasmid kolayca bakteriye transfer olur. Rekombinant vektörün konakçı bir hücreye aktarılmasında eğer hücre içerisine aktarılan vektör plazmit ise 'transformasyon' aktarılan bir virüs ise "transfeksiyon" denir.

5- İstenilen geni taşıyan *E. coli* 'lerin seçimi (seleksiyon): Sıvı ortamda üretilen saf *E. coli* kültüründen içinde antibiyotiği

içeren katı besi yerlerine üretilirler (Şekil 166). Antibiyotiklere dirençlilik, seçici ortamlar hücre seçiminde etkilidir. Bu durum karşısında, antibiyotikli ortamda üreyen kolonilerden biri seçilerek saf olarak üretilir. Bunlar uygun koşullarda saklanabilir ya da arzu edildiğinde adı geçen geni üreten bir fabrika gibi kullanılabilir. Günümüzde değerli proteinlerin genleri ekspresyon vektörlerine klonlanmış olarak mevcuttur ve bunlar çeşitli firmalardan ücreti ödenerek temin edilebilmektedir.



Şekil 166. rDNA Teknolojisinin Ana Basamakları
(Rowland-Goldsmith, 2012)

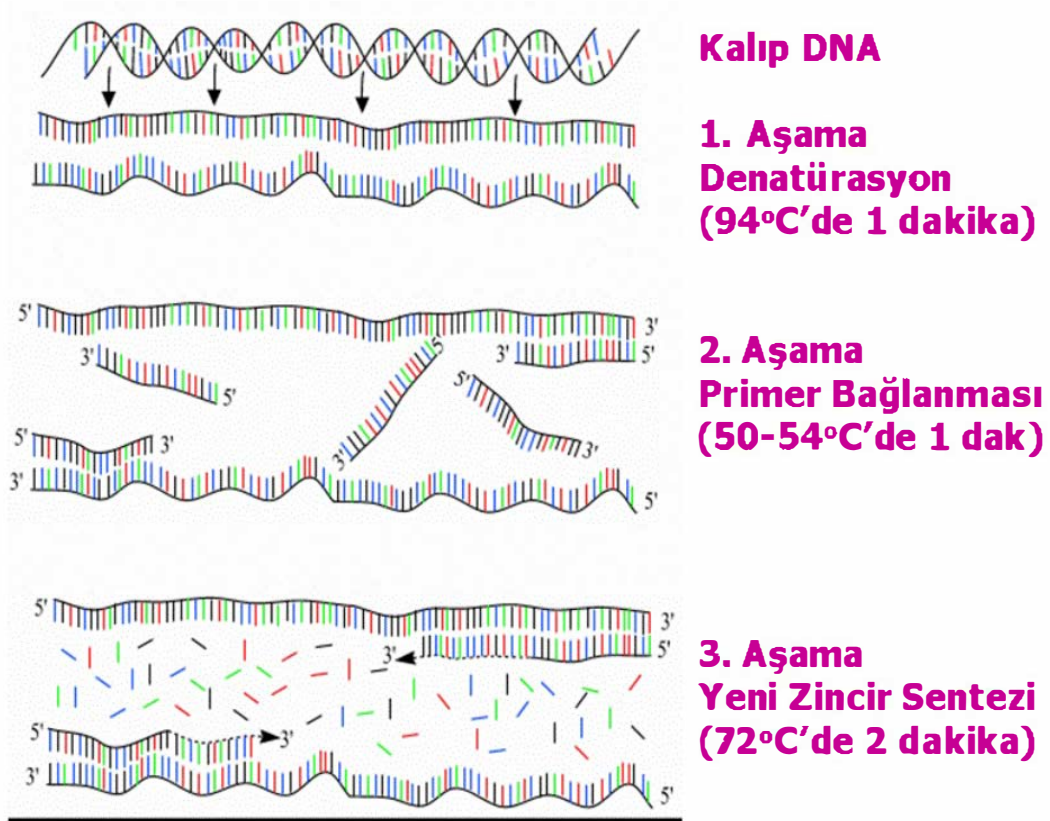
REKOMBİNANT TEKNOLOJİSİNİN KULLANIM ALANLARI

Rekombinant teknolojinin kullanım alanları çok geniştir. Bu teknoloji sayesinde insülin üretimi, farmosötik ürünlerin üretimi, herbisitlere karşı dayanıklı kültür bitkileri, rekombinant aşılar yapıldığı gibi, genetik hastalıkların tedavisinde, adli tıpta kullanılır. Hastalıkların moleküler seviyedeki patolojik tanıları (Diyabet, koroner arter hastalıkları, Alzheimer, şizofreni, Parkinson), Genetik hastalıkların moleküler nedenleri (Thalessemia, Fenilketonuri, Tay-Sacs hastalığı, Hiperkolesterolomi, Kistik fibrozis vd), İlaç sanayisinde, Çevre mühendisliğinde biyolojik savaş süper bakterilerin elde edilmesinde, endüstriyel enzimlerin ve hormonların üretiminde önemli bir yere sahiptir.

Rekombinant DNA Teknolojisinde en büyük buluş 1985 yılında, bir ya da iki hücreden elde edilen DNA materyalinin birkaç saat içerisinde çoğaltılarak genetik tanının konmasını sağlayan Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction: PCR) yönteminin uygulamaya konmasıdır. 1984: Mullis ve arkadaşlarının keşfi, daha sonra Nobel ödülü almışlardır. Bu reaksiyon ile DNA >106 kat çoğaltırabilir. PCR için Sıcaklığa dayanıklı (thermostabil) DNA polimeraz (Taq, Vent, Pfu, vs.), gene özgü oligonükleotidler (primer) ve dNTP'ler ve tampon gereklidir.

Temel 3 aşama 30-35 döngü (cycle) tekrarlanır (Şekil 167):

1. Denatürasyon (90-95°C): Dupleks DNA'nın (çift iplikçikli DNA) yüksek sıcaklıkta tek iplikçiklere ayrılması
2. Hibridizasyon (Annealing) (50-70 °C): Primerlerin uygun sıcaklıkta hedef DNA'ya bağlanması.
3. Amplifikasyon (Extension) (70-75 °C): DNA polimeraz ile primerin 3'OH grubuna nükleotitlerin eklenerek DNA'nın uzatılması.



Şekil 167. Polimeraz Zincir Reaksiyonun Temel Aşamaları

(<https://genotyping.files.wordpress.com/2007/03/pcr.gif>, 2007)

KISIM 12

HÜCRESEL SİNYAL İLETİMİ

Çok hücreli organizmalarda canlılığın devamı hücreler arası haberleşme ağıyla farklı doku ve organlar arasında büyüme, farklılaşma ve metabolizmanın düzenlenmesine bağlıdır. Bir hücre üzerindeki özel bir proteinin komşu hücre üzerindeki reseptörlerine bağlanması komşu hücrenin farklılaşmasına neden olur. Hücreler arasındaki iletişim hücre sinyaliyle gerçekleşir. Hücre ve uyaran tipine bağlı olarak sinyale verilen özel cevap gen ifadesi, enzim aktivitesinin değiştirilmesi, hücre iskelet yapısının düzenlenmesi, DNA sentezinin aktive edilmesi ve hücre ölümlüyle olabilir. Hücre haberleşmesindeki temel prensip çevreden veya diğer bir hücreden alınan uyarının hücre içi bileşenlerine iletilmesidir. Sinyalin hücre içine iletilmesine '**sinyal transdüksiyonu**' denir.

Hücreler arası haberleşme 6 kısımda incelenir;

- 1- Haberci molekülün sentezi
- 2- Sinyal molekülünün salgılanması
- 3- Sinyal molekülünün hedef hücreye iletilmesi
- 4- Sinyal molekülünün özgün bir reseptöre birleşmesi

5- Reseptör sinyal kompleks tarafından hücresel cevabın oluşturulması

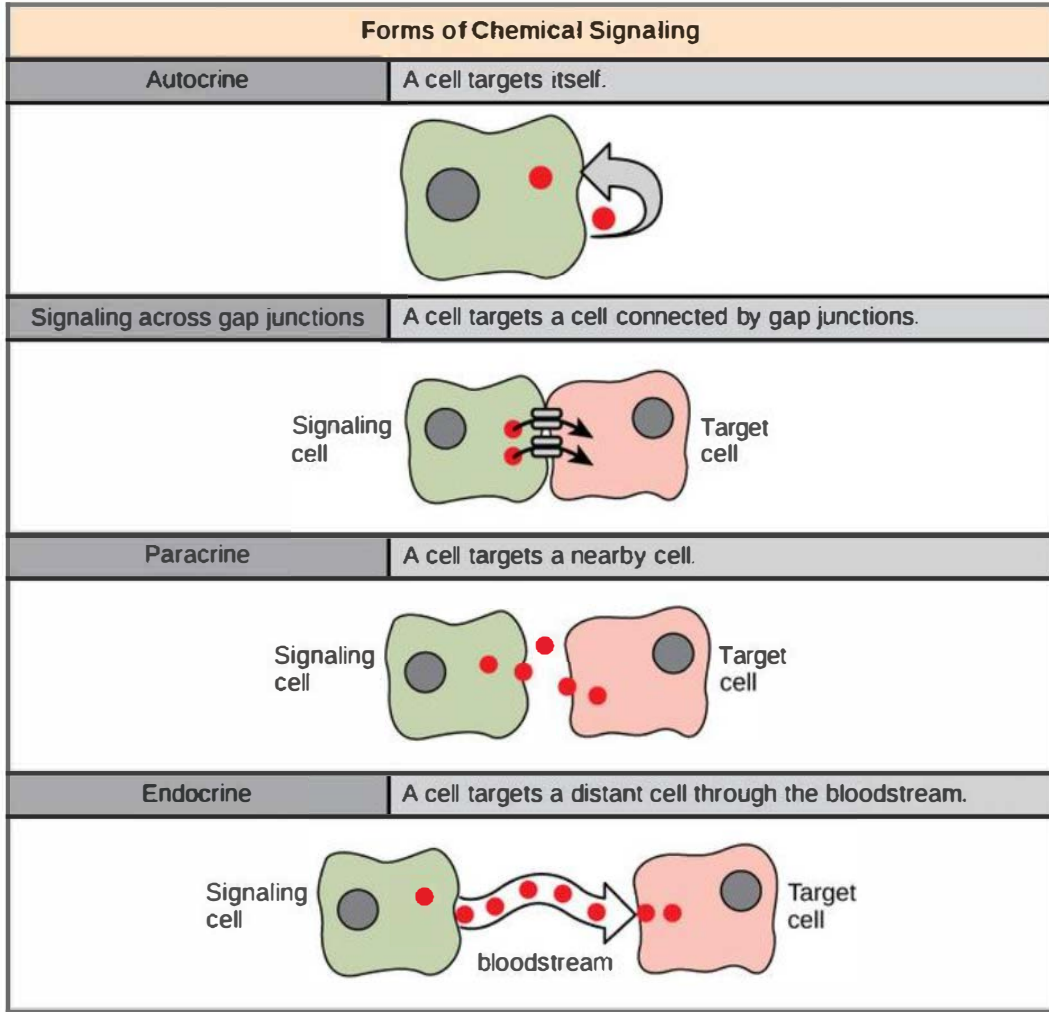
6- Sinyalin ortadan kalkması ve hücresel cevabın sonlanması

Hücre dışı haberleşme hayvanlarda sinyal etkisini mesafesine göre endokrin, parakrin ve otokrin olmak üzere 3'e ayrılır (Şekil 168);

1- Endokrin Sinyal: Sinyal molekülü hormon olarak isimlendirilir. Hormonlar endokrin organların hücreleri tarafından sentezlenir ve kan yoluyla taşınarak kendinden uzak mesafedeki hedef hücrelere etki eder (Şekil 168).

2- Parakrin Sinyal: Sinyal molekülü nörotransmitter olarak isimlendirilir. Burada bir hücre tarafından salgılanan sinyal molekülleri yalnızca kendisine yakın mesafedeki hücrelere etki eder (Şekil 168). Örneğin; bir sinir uyarısını bir sinir hücresinden bir başka sinir hücresine ya da kas hücresine iletimi parakrin sinyaliyle olur.

3- Otokrin Sinyal: Hücreler kendi salgıladıkları kimyasallara cevap oluştururlar (Şekil 168). Birçok büyüme faktörü bu sinyalle etkilenir. Sinyali taşıyan moleküller (hormon, nörotransmitter) 'ligant', bu ligantı kabul eden moleküle 'reseptör (almaç)' denir. Ligantın reseptöre bağlanması sonucu reseptörde yapısal bir değişiklik olur ve ligant reseptör kompleksi oluşur. Ligantların hücre yüzeyindeki reseptörlere bağlanmaları 2. haberci olarak adlandırılan hücre içi sinyal moleküllerinin konsantrasyonunda bir artışa ya da azalışa neden olur. En önemli 2. haberciler; cAMP, cGMP ve Ca^{+2} 'dir.



Şekil 168. Endokrin, Parakrin ve Otokrin Sinyal

(<http://blog.essaycorp.com/what-is-a-cell-signaling/>, 2017)

SİNYAL İLETİMİNDE cAMP'nin ROLÜ

cAMP katalitik bölgesi hücre zarının sitoplazmaya bakan yüzünde bulunan ve integral membran protein olan adenil siklaz enzimi tarafından ATP'den sentezlenir.



Bu molekül bir hormon ya da başka bir liganın reseptöre bağlanarak getirdiği 1. mesajı hücre içine taşır. Hücrede glikoz mobilizasyonu cAMP ile sinyal iletimine bir örnektir (Şekil 169).

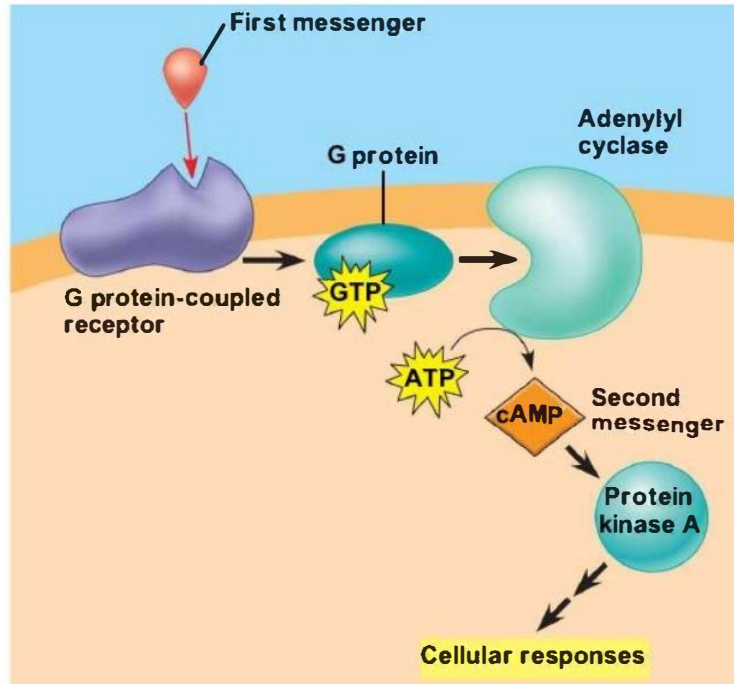
Kanda şeker seviyesinin ayarlanmasında 2 önemli hormon rol almaktadır.

1- Glukagon: Pankreastan salgılanır. Kanda şeker seviyesi düşünce salgılanır. Karaciğerdeki glikojenin yıkımını uyarmaktadır.

2- İnsülin: Pankreastan salgılanır. Kanda şeker seviyesi yüksekince salgılanır. Kas ve karaciğerde glikozu glikojene çevirir.

Glukagon ve insülin zıt etki gösterirler. Glukagon insülinin etkisine ters tepki vermektedir.

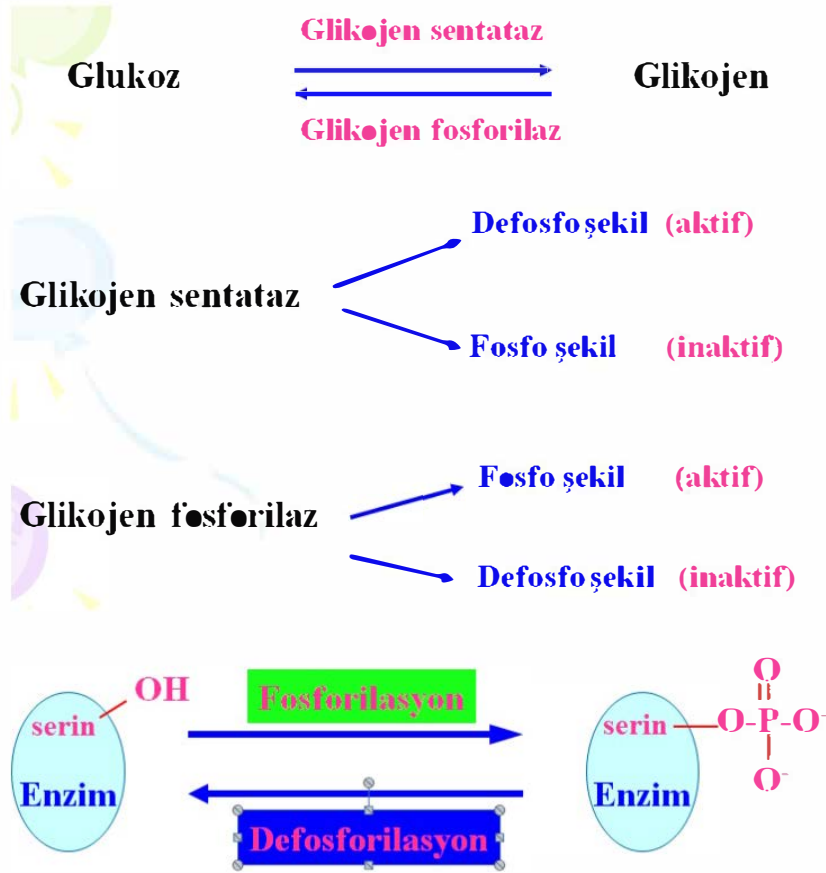
Glikoz mobilizasyonunda ilk olarak hormonun reseptöre (adenilsiklaza) bağlanması ve yapısal bir değişiklikle adenilsiklaza aktif olmasıdır. Sentezlenen cAMP, sitoplazmaya yayılır ve sitoplazmada bulunan protein kinaz A (pKA) olarak isimlendirilen bir enzime bağlanır ve böylece pKA'nın aktif olması sağlanır (Şekil 169). Karaciğer hücrelerinde pKA'nın hedef substratları glikojen mobilizasyonunda rol alan glikojen sentataz ve fosforilaz kinazdır. Glikojenin parçalanmasını fosforilaz, sentezin ise glikojen sentaz sağlar.



Şekil 169. Sinyal İletiminde cAMP'nin Rolü

(<https://www.slideshare.net/jayswan/chapter-11-textbook-presentation>, 2010)

Glikojen sentatazın fosforilasyonu pKA'nın katalitik aktivitesiyle inhibe edilir ve böylece glikozun glikojene dönüşümü engellenir. Buna karşılık fosforilaz kinazın fosforilasyonun aktive edilmesiyle bu enzim aktive edilir ve glikojenin yıkımı uyarılır (Şekil 170). Fosforilaz reaksiyonunda glikoz 1 fosfat, glikoza dönüşür ve bu şekilde kan dolaşımına verilir. Glikojen sentetaza P eklenmezde (defosfo) bu enzim aktiftir ve glukozu glikojen halinde depolar (Şekil 170).



Şekil 170. Fosforilasyon ve Defosforilasyon ile Enzimlerin Aktif ve İnaktif Halleri

(<http://194.27.141.99/dosya-depo/ders-notlari/emel-ulakoglu-zengin/enzimler%20sunum.ppt>, 2017)

KISIM 13

KANSER MOLEKÜLER BİYOLOJİSİ

Kanser, normal büyüme ve farklılaşmayı sağlayan mekanizmalar üzerindeki kontrolün kaybolması nedeniyle değişime uğramış bir hücrenin sınırsız çoğalması sonucu gelişen bir hastalıktır. Kanser hücrenin çoğalmasını farklılaşmasını ve sağ kalımını denetleyen kritik genlerde gerçekleşen değişikliklerden kaynaklanır. Tümör virusları ile yapılan araştırmalar belirli genlerin hücreleri transforme edebildiklerini göstererek kanserin moleküler temelleri hakkında ilk bulguların elde edilmesini sağlamıştır. Buna rağmen insan kanserinin büyük çoğunluğu (yaklaşık % 80'i) virusların etkisiyle değil, radyasyon ya da kimyasal karsinogenler gibi başka nedenlerle ortaya çıkar. Bu yüzden viral onkogenler ile yapılan araştırmaların önemli bir yönü de viruslara bağlı olmayan kanserlerin oluşumunda rol oynayan hücresel onkogenlerin çalışmalarla belirlenmiş olmasıdır. Viral ve hücresel onkogenler arasındaki temel ilişki onkogenik retroviruslar üzerinde yapılan araştırmalar sayesinde tanımlanmıştır.

Canlı organizmalarda hücre çoğalma regülasyonu çeşitli faktörlerin etkisiyle bozulur. Canlının ihtiyacı olmadığı halde herhangi bir dokuda meydana gelen kontrolsüz hücre bölünmesi sayısal olarak hücre artışına ve sonuçta tümör oluşumuna neden olur. Tümörler iyi huylu (benign) ve kötü huylu (malign: kanser) olmak üzere 2'ye ayrılır. Tümör ayrıca kemik, kas ve bağ doku hücrelerinden kaynaklanan '**sarkoma**' deride olduğu gibi epitel doku hücrelerinden kaynaklanan '**karsinoma**' ve kan dokudan kaynaklanan '**lösemi**' olmak üzere 3'e ayrılır. Sayısal

olarak artış gösteren kanser hücreleri artan besin ihtiyaçlarını karşılamak için kan ve lenf yoluyla diğer dokulara yayılırlar. Vücudumuzdaki birçok hücrenin serbest dolaşma izni yoktur. Yani bölündükleri yerde yaşar ve ölürler. Kanser hücreler ise vücut içinde dolaşırlar. Her tümör hücresel DNA molekülündeki bir ya da daha fazla mutasyon sonucu ortaya çıkar. Kanserli hasta grubunun % 20' si kalıtsaldır ve yavru hücrelerde kanserli olur.

Kanser Hücrelerinin Özellikleri

- Kanserleşen hücre üreme kontrolünü kaybetmiştir.
- Kanserleşen hücre dokuya özgü olan yapısal özelliğini ve morfolojik yapısını kaybetmiştir. Kanserleşen hücreler normal hücrelere göre küçük, ancak nukleusları büyüktür.
- Kanserleşen hücrenin metabolizması değişmiştir, şeker alımını artmıştır.
- Kanserleşen hücrede proteinlerin bir kısmı sentezlenemez.
- Kanserleşen hücrenin antijenik özellikleri değişmiştir.
- Kanserleşen hücrenin sitoplazmik hacimleri normal hücrelere oranla daha küçük ve mikroskopta kolaylıkla ayırt edilir.
- Kanserleşen hücrede apoptozis mekanizması engellemiştir.

KANSER OLUŞUMUNDA ETKİLİ OLAN GENLER

Protoonkogenler ve Sellüler (hücresel) Onkogenler (c-onc)

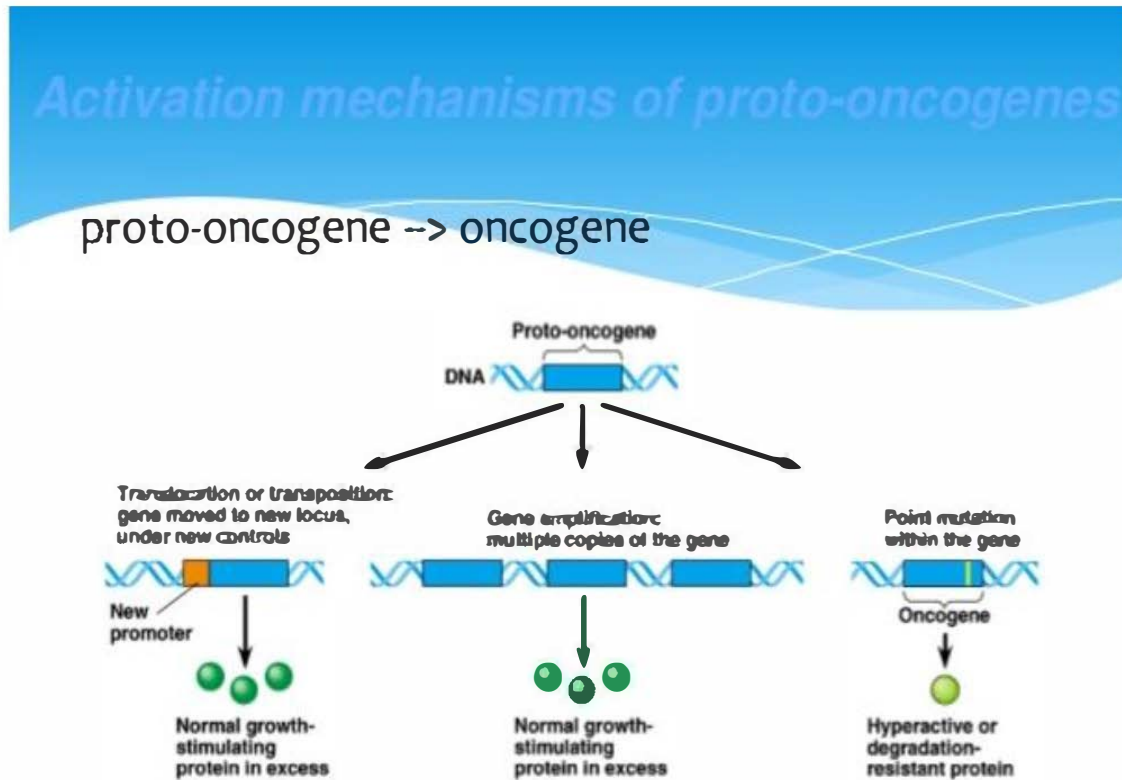
Protoonkogenler hücrelerin büyüme ve farklılaşmasında rol alan büyüme faktörü ile bu büyüme faktörlerinin sinyal iletiminde yer alan proteinleri (reseptörler, sitoplazmik proteinler ve çekirdekte yer alan transkripsiyon faktörleri) kodlayan normal genlerdir.

Normal hücrelerdeki protoonkogenlerin aşırı aktivasyon ve aşırı ekspresyonu sonu sellüler onkogenler (c-onc) meydana gelirler. Protoonkogenlerin aşırı uyarımları birkaç tarzda meydana gelebilir. Bunlar: İnsersiyonal mutagenesis, kromozal transpozisyon (translokasyon), gen

amplifikasyonu, nokta (point) mutasyonu, retroviral (transdüksiyon) aktivasyondur (Şekil 171).

Bu genlerde oluşan bir takım değişiklikler sonucu onkogenler olmaktadır. Diğer bir deyişle onkogenler protoonkogenlerin değişikliğe uğramış homologlarıdır.

Protoonkogenlerin onkogenlere dönüşümü sonucunda büyüme faktörlerinin üretimi artmakta, hücre bölünmesi üzerindeki kontrol kaybolmakta, hücre membranında büyüme faktörü uyarısıyla başlayıp, çekirdeğe ulaşan sinyal ileri sistemi kontrolsüz uyarılmakta, çekirdekte transkripsiyon faktörlerinin sentezi artmakta, hücre kontrolsüz bir şekilde çoğalmaya devam etmektedir.



Şekil 171. Protoonkogenin Onkogene Dönüşmesi

(https://www.slideshare.net/vishakha_99/oncogenes-52480851, 2015)

Başlıca Onkogenler

Erb-B2: Epidermal büyüme faktörü (EGF) için hücre yüzey reseptörünü şifreleyen gen ailesi tarafından kodlanmakta. Gen amplifikasyonu ile aktiflenen erb-B2 onkoproteininde tirozin kinaz sürekli olarak aktiftir ve çekirdeğe sürekli olarak bölünme sinyaller iletmektedir. erb-B2 onkogeninin meme, over ve gastrik kanserle ilişkili olduğu belirlenmiştir (Tablo 11).

ras: ras protoonkogen ailesi hücre membranının iç yüzüne lokalize olmuştur. GTPaz aktivitesine sahiptir ve hücre büyümesinin kontrolünden sorumlu olan p21 proteinini kodlanmaktadır. Mutasyona uğramış ras onkogeninin ürünü olan p 21'in intrinsik GTPaz aktivitesi çok düşüktür. Bu durumda p21 sürekli GTP bağlı aktif formunda kaldığından hücre proliferasyona devam etmektedir (Tablo 11).

myc: Hücre büyümesi ile ilişkili genlerin ekspresyonunu kontrol eden bir transkripsiyon faktörüdür. Anormal myc ekspresyonu anormal büyüme ile ilişkilidir (Tablo 11).

abl: Normalde 9. Kromozomda bulunan abl geni 22. Kromozomda bulunan bcr bölgesi ile birleşmiştir. Bcl-abl geninin ürünü non-reseptör bir tirozin kinazdır. Tirozin kinazlar proliferasyonu uyaran sinyal ileti mekanizmasında görev yaparlar (Tablo 11).

Tablo 11. Bazı Onkogenler

Virus	Name	Species	Tumor	Oncogene
Rous sarcoma	RSV	chicken	sarcoma	<i>src</i>
Harvey murine sarcoma	Ha-MuSV	rat	sarcoma & erythroleukemia	<i>H-ras</i>
Kirsten murine sarcoma	Ki-MuSV	rat	sarcoma & erythroleukemia	<i>K-ras</i>
Moloney murine sarcoma	Mo-MuSV	mouse	sarcoma	<i>mos</i>
FBJ murine osteosarcoma	FBJ-MuSV	mouse	chondrosarcoma	<i>fos</i>
Simian sarcoma	SSV	monkey	sarcoma	<i>sis</i>
Feline sarcoma	PI-FeSV	cat	sarcoma	<i>sis</i>
Feline sarcoma	SM-FeSV	cat	fibrosarcoma	<i>fms</i>
Feline sarcoma	ST-FeSV	cat	fibrosarcoma	<i>fes</i>
Avian sarcoma	ASV-17	chicken	fibrosarcoma	<i>jun</i>
Fujinami sarcoma	FuSV	chicken	sarcoma	<i>fps</i>
Avian myelocytomatosis	MC29	chicken	carcinoma, sarcoma, & myelocytomatosis	<i>myb</i>
Abelson leukemia	MuLV	mouse	B cell lymphoma	<i>abl</i>
Reticuloendotheliosis	REV-T	turkey	lymphatic leukemia	<i>rel</i>
Avian erythroblastosis	AEV	chicken	erythroleukemia & fibrosarcoma	<i>erbB, erbA</i>
Avian myeloblastosis	AMV	chicken	myeloblastic leukemia	<i>myb</i>

(<http://genes.atspace.org/28.3.html>, 2017)

Tümör oluşturan viruslar;

Bazı normal genlerin onkogenlere dönüşebildiği ilk olarak tümör virüsleri ile ilgili çalışmalarda dikkati çekmiştir. Virüs ile enfekte konak hücre genomunda bulunan bazı genlerin viral onkoproteinleri sentezlettiği belirlenmiştir. İnsanlarda ve hayvanlarda tümör oluşturan birçok nedenin arasında biyolojik faktörlerden olan viruslar da (onkojenik virüsler, onkoviruslar) bulunmaktadır.

RNA Virusları: Retrovirusları ve DNA Virusları: Adenoviruslar, herpesviruslar, hepadnaviruslar, papovaviruslar, poxviruslar'dır (Tablo 12).

Tablo 12. Onkogenik DNA ve RNA Virusları

Oncogenic viruses

DNA viruses	RNA viruses
• <i>Herpesviridae</i> – <i>Human Herpes Virus 8 (HHV8)</i> a.k.a Kaposi's sarcoma associated virus – Epstein-Barr virus (EBV) • <i>Papovaviridae</i> – human papilloma virus (HPV) • <i>Hepadnaviridae</i> – hepatitis B virus-(HBV)	• <i>Flaviviridae</i> – (hepatitis C virus HCV) • <i>Retroviridae</i> – Human T-cell lymphotropic virus (HTLV type I)

(<http://slideplayer.com/slide/781355/>, 2017)

Protoonkogenlerin kodladığı proteinler önlerine c (cellular), onkogenlerin kodladığı proteinler ise önlerine viral kaynaklı olduklarını ifade eden v harfi ile izole edildiği virüsü tanımlayan üç harfli bir kelime ile ifade edilmektedir. Örneğin; v-sis Simian Sarkoma virüsüne ait proteini göstermektedir. Örn: Raus sarkoma virüsünün taşıdığı onkogen '**v-src**', hücresel genomdaki benzeri olan gen ise '**c-src**' olarak tanımlanır.

Bazı v-onkogenler, c-onkogenlerden kalitatif olarak farklıdır. c-onkogenler yüksek seviyelerde bile aktif değilken v-onc' ler düşük protein seviyelerinde bile onkogeniktir.

Viral enfeksiyon sırasında bazen bir protoonkogenin DNA dizisi virüs tarafından kopyalanır ve kendi genomuna yerleştirilir. Tekrarlayan viral enfeksiyonlar sırasında bu genin bazı noktaları mutasyona uğrayabilir. Bunu takip eden viral enfeksiyon sırasında bu viral onkogen ifade edildiğinde sentezlenen anormal protein konak hücrenin normal hücre büyümesini etkileyerek, hücreyi bir tümör hücresine dönüştürebilmektedir. Onkogenler hücrenin malign değişimine yol açan çeşitli proteinlerin sentezinden sorumludur. Onkogenlerin ürünleri olan onkoproteinler hücrede sürekli olarak etkin kalmakta, inaktive olamamaktadır.

Tümör Supresör Genler (Antionkogenler, Onkosupresör Genler)

Hücre çoğalmasını kontrol altında tutan genlerdir. Etkilerini; bozulmuş hücre döngüsünün devamını engelleyerek, gerekli durumlarda hücreleri apoptozise yönlendirerek, hücre içerisinde DNA replikasyonu ve tamiri ile segregasyonun hatasız gerçekleşmesini kontrol altında tutarak, mutasyon oranlarının düşük seviyede tutulmasını ve genomun stabil kalmasını sağlayarak gösterirler.

Proliferasyonu doğrudan baskılayan tümör süpresör genlere 'bekçi' (gatekeeper) tipi genler denmektedir. Bekçiler hücre çevrimini (siklusunu) denetlerler, hücreyi apoptozise yönlendiren genlerde bu gruptadır.

Bu genlerin kodladığı proteinler, protoonkogenlerin sentezlerini spesifiğe ettikleri proteinlerin görevlerini kontrol ederek, bunların normal limitler içinde etkinlik göstermelerini sağlarlar ve protoonkogenlerin aşırı uyarım ve ekspresyonlarını önlerler. Böyle aktivite gösteren özel genlere tümör supresör genler (onkostatik genler, antionkogenler veya üreme supresör genleri) adları verilmektedir. Eğer bu genlerde mutasyonlar ortaya çıkarsa, bunların inaktivasyonuna veya normal fonksiyonlarının bozulmasına yol açarak kodladıkları regülatör proteinlerin de non fonksiyonel olmalarına neden olur ve kontrol mekanizması işleyemez hale gelir. Bu olgunun sonunda, protoonkogenlerin devamlı üreme proteinle-

ri senezleri nedeniyle hücreler sınırsız ve kontrolsüz ürerler ve tümör gelişimine sebep olurlar.

Tümör supresör genler tarafından spesifiğe edilen tümör supresör proteinlerin (onkostatik proteinler) fonksiyonel olabilmeleri için, bunların da hücre yüzeylerinde spesifik reseptörlere, sinyal transdüserlerine, nükleer transkripsiyon regülatör faktörlerine gereksinimleri bulunmaktadır.

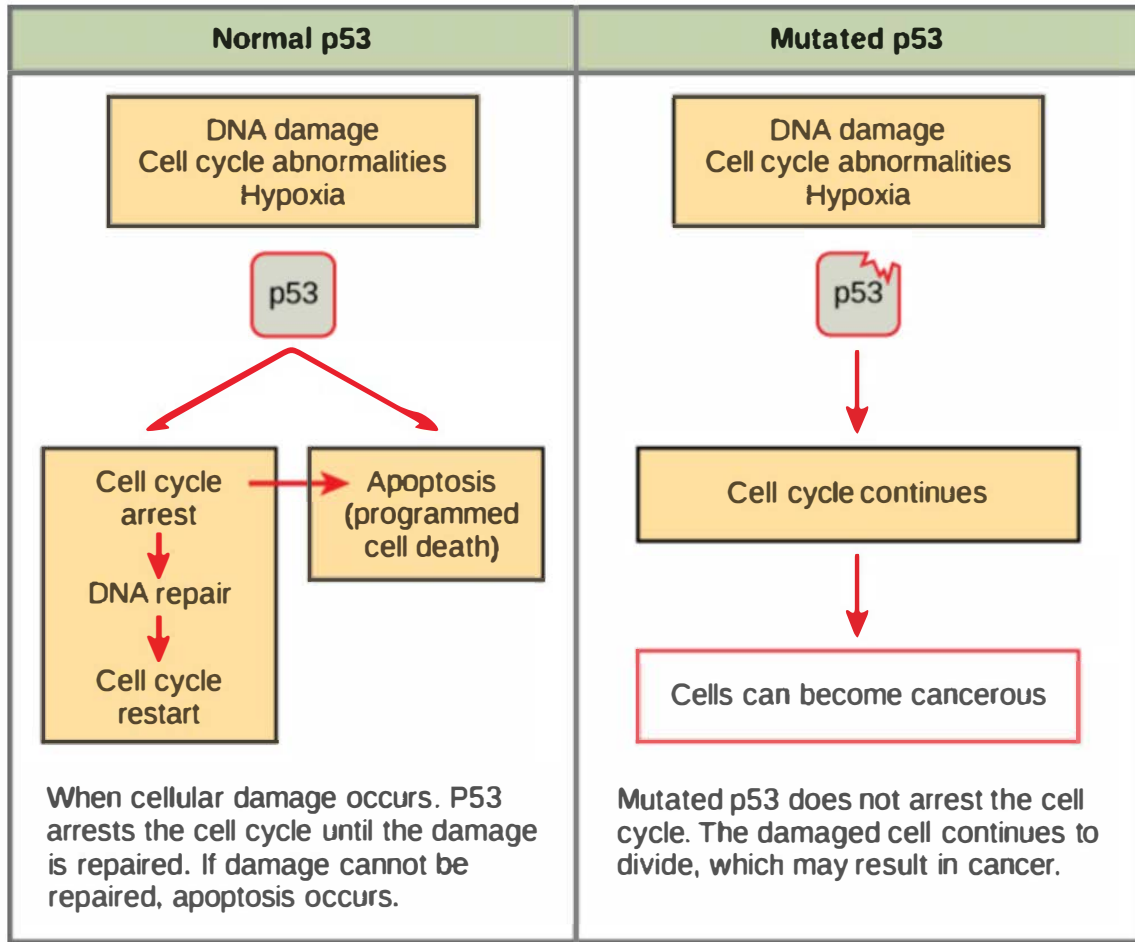
Tümör supresör genlerin inaktivasyonları, dolaylı olarak, proto-onkogenlerin kontrolsüz kalmalarına ve devamlı üreme proteini sentezlerine yol açarlar. İnsanlarda saptanan başlıca onkostatik genler arasında, Rb (13q14), P53(17p13.1), APC (5q21), WT-1 (11p13) gibi genler bulunmaktadır. Bunlardan p53 geni üzerinde dermatoloji alanında fazlaca çalışmalar yapılmıştır. P53 proteini bir transkripsiyon faktörüdür ve hücre döngüsünün önemli bir düzenleyicisidir. Mutasyonla ya da DNA tümör virüsünün onkogen proteini tarafından inaktive edildiğinde, hücre döngüsü düzeni bozulur ve tümör gelişebilir (Şekil 172).

Hücre DNA'sının zedelenmesi sonucunda sentezlenen protein 53 (p53), zedelenme bölgesine etkinlik göstererek hücre üremesini G1 fazında tutarak aşırı üremeyi kontrol eder ve DNA'daki bozukluk giderilince de bu protein ayrışarak etkinliği sona erer. Bu fonksiyon, gen de oluşan mutasyonlarla kaybolur ve sonunda hücre transformasyonları ve deri kanserleri meydana gelir.

Bu genlerde meydana gelen mutasyonlar, hücre ölümlerinin kontrol dışında kalmalarına ve ölümlerinin kontrolsüz hale gelmelerine yol açmaktadırlar (Şekil 172).

Bu genlerin mutasyona uğramasıyla onkogenler meydana gelir. TSG genlerinden en iyi bilinenni 17. Kromozomda bulunan p53 adı verilen gendir. Bu genden sentezlenen proteinin ismi (p53 proteini) normal formu hücre siklusunu düzenlemek üzere DNA molekülüne bağlanan bir transkripsiyon faktörüdür. p53 geninde ve dolayısıyla proteininde oluşacak bir mutasyon sonucunda G1 fazında hazırlık dönemi tamamlamadan S fazına geçiş olur. Yani kromozom yapılıması tamamlanmadan

replikasyon başlatır. Özellikle sigara dumanında bulunan ‘bezopiren’ ve kuru yemişlerdeki ‘aflotoksin’ maddesi p53’ün mutasyonunda önemli rol oynar. Onkogenler kanser hücrelerindeki kontrolsüz çoğalmayı başlatan faktörlerdir. İlk kez RNA virüslerinde belirlenmiştir. Onkogenlerin büyük bir bölümü hücre büyümesi, çoğalması ve farklılaşma kontrolüyle ilişkili ‘protoonkogen’ denen normal genlerin mutasyona uğramış formudur. Onkogenler sentezlediği proteinlere ise ‘onkoprotein’ denir.



Şekil 172. Normal ve Mutasyona Uğramış P53’ün Ektisi

(<https://courses.lumenlearning.com/boundless-biology/chapter/cancer-and-the-cell-cycle/>, 2017)

KAYNAKLAR

- Bardakçı F., Ülger C. (2015). Genomlar 3. (Genomes 3, Brown TA.), 3. Basımdan Çeviri, Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Bardakçı F., Yenidünya AF., Yılmaz N. (2009). Gen Klonlama ve DNA analizi (Gene Cloning and DNA analysis, Brown TA.), 5. Baskıdan çeviri, Nobel Yayıncılık, Ankara.
- Becker WM., Kleinsmith LJ., Hardin J.(2000).The World of the Cell, 4th Edition. Adison Wesley Longman Inc., San Francisco.
- Bolsover SR., Shephard EA., White HA., Hyams JS.(2011).Cell Biology: A Short Course. Publisher: John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom.
- Büber E., Açıan NL. (2004). Ribozom Dışı Yolla Sentezlenen Biyoaktif Peptidler. Hacettepe Tıp Dergisi, 35: 43-48.
- Darnel J., Lodish H., Baltimore D. (1990). Molecular Cell Biology, Second Edition. Published by Scientific American Books.
- Dilsiz N.(2009). Moleküler Biyoloji. Genişletilmiş İkinci Baskı, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Geçkil H., Özmen M., Yeşilada Ö.(2011). Moleküler Hücre Biyolojisi (Molecular Cell Biology. Lodish H., et al.). 6 Baskıdan Çeviri. Palme yayıncılık, Ankara.

- Gözükara E. (2011). Biyokimya. Genişletilmiş 5.Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul.
- Madigan MT., Martinko JM., Parker J. (2000). Brock Biology of Microorganisms, Ninth Edition. Prentice-Hall Inc press, London.
- Öner C.(2002). Genetik Kavramlar. (Concepts of Genetics, Klug WS and Cummings MR.), 6. Baskıdan Çeviri, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Özcan B.(2004). Türkiye'den Halofilik Arkebakterilerin İzolasyonu ve Karakterizasyonu, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara.
- Plopper G. (2016). Principles of Cell Biology, Second Edition, Jones & Bartlett Learning, Navigate 2, Mobile-Ready Course Materials. eBook.
- Plopper G., Sharp D., Sikorski E. (2015). Lewin's CELLS, Third Edition. Publisher: Jones & Bartlett Learning, Burlington.
- Rathoure AK and Srivastava M. (2015). Cell Biology and Genetics. Published by Daya Publishing House, New Delhi.
- Rowland-Goldsmith M. (2012). Recombinant DNA Technology and Genomics, In: Introduction to Biotechnology, 3rd Edition, William J. Thieman WJ,., Palladino MA, Publisher: Pearson.
- Watson JD., Baker TA., Bell SP., Gann A., Levine M., Losick R. (2013). Molecular Biology of the Gene. 7th Edition, Pearson Press, Boston.
- Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B. (2010). Moleküler Biyoloji. Geliştirilmiş 2. Baskı, Nobel Yayıncılık, Ankara.

