

MOLEKÜLER GENETİK



Doç. Dr. Haydar KARAKAYA

Ondokuz Mayıs Üniversitesi

Fen Edebiyat Fakültesi

Biyoloji Bölümü

SAMSUN, 2023

İÇİNDEKİLER

1 GEN FONKSİYONU.....	3
1.1 Komplementasyon Testi ile Genlerin Tanımlanması.....	3
1.2 Enzim Yapısının Genler Tarafından Kontrolü.....	4
1.3 İnsanlarda Genetik Nedenli Enzim Eksiklikleri.....	7
1.4 Protein Yapısının Genler Tarafından Kontrolü.....	9
2 DNA: GENETİK MATERYAL.....	11
2.1 Genetik Materyal Tartışmaları (1900-1944).....	11
2.2 DNA'nın Genetik Materyal Olduğunu Gösteren Deneysel Kanıtlar.....	11
2.2.1 Prokaryotlar ve virüslerle gerçekleştirilen deneyler.....	11
2.2.1.1 Transformasyon çalışmaları.....	12
2.2.1.2 Hershey-Chase deneyi.....	14
2.2.2 Ökaryotlarda dolaylı ve doğrudan kanıtlar.....	16
2.2.3 Genetik materyal olarak RNA.....	17
3 NÜKLEİK ASİTLER: YAPI VE FONKSİYON.....	18
3.1 Genetik Maddenin Fonksiyonları.....	18
3.2 Nükleotitler.....	19
3.3 DNA'nın Fiziksel Yapısı.....	20
3.4 DNA'nın Kromozomlarda Organizasyonu.....	21
3.4.1 Bakteriyel kromozomlar.....	21
3.4.2 Ökaryotik kromozomların yapısal özellikleri.....	23
3.4.3 Ökaryotik kromozomların moleküler yapısı.....	24
3.4.4 Sentromerler ve telomerler.....	26
3.4.5 Ökaryotik kromozomlarda tek (emsalsiz) ve tekrarlayan DNA dizileri.....	27
4 DNA REPLİKASYONU.....	28
4.1 Prokaryotlarda DNA Replikasyonu.....	28
4.1.1 Virüslerde replikasyon.....	29
4.2 Ökaryotlarda DNA Replikasyonu.....	30
4.2.1 Ökaryotlarda kromozomların uçlarının replikasyonu.....	32
5 TRANSKRİPSİYON VE RNA İŞLEME.....	33
5.1 Prokaryotlarda Transkripsiyon.....	33
5.2 Ökaryotlarda Transkripsiyon.....	34
5.3 Prokaryotik ve Ökaryotik mRNA'lar.....	35
5.4 Ribozomal RNA'nın Transkripsiyonu.....	37
5.5 Transfer RNA'nın Transkripsiyonu.....	37
6 GENETİK ŞİFRE VE GENETİK MESAJIN TRANSLASYONU.....	39
6.1 Genetik Şifre (Kod).....	39
6.2 Genetik Mesajın Translasyonu.....	41
6.2.1 Translasyonun başlaması.....	41
6.2.2 Uzama ve sonlanma.....	43
6.2.3 Proteinlerin görev yerlerine transferi.....	43
7 GEN MUTASYONLARI.....	45
7.1 Mutasyonların Tanımlanması.....	45
7.2 Gen Mutasyonu Tipleri.....	46
7.3 Mutasyonların Nedenleri.....	48
7.3.1 Kendiliğinden (spontan) mutasyonlar.....	48
7.3.2 Uyarılmış mutasyonların nedenleri.....	49
7.4 DNA Tamir Mekanizmaları.....	50
7.5 Mutasyonların İzolasyonunda Görüntüleme Yöntemleri.....	50
7.5.1 Besin mutantları.....	50
7.5.2 Şartlı mutasyonlar.....	51

8	GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ	52
8.1	Bakterilerde Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	52
8.1.1	<i>E.coli</i> 'de laktoz genlerinin ekspresyonunun düzenlenişi	52
8.1.2	<i>lac</i> mutantları	55
8.1.3	<i>E. coli</i> 'nin triptofan operonu	56
8.1.4	İkili pozitif ve negatif kontrol: Arabinoz operonu	57
8.1.5	Prokaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde özel durumlar	58
8.2	Ökaryotlarda Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi	59
8.2.1	Ökaryotlarda gen ekspresyon kontrol seviyeleri	59
8.2.2	Transkripsiyonel Kontrol	60
8.2.3	Ökaryotik gen düzenlenmesinde kromatinin rolü	62
8.2.4	Hayvanlarda gen ekspresyonunun steroid hormonlarla düzenlenmesi	63
8.2.5	Ökaryotlarda gen düzenlenmesine genel bakış	66
9	REKOMBİNANT DNA VE İNSAN GENOM PROJESİ	67
9.1	Rekombinant DNA Teknolojisi	67
9.2	Genomik	69
9.2.1	İnsan genomundan çıkarılan bilgiler	70
10	DİNAMİK GENOM: TRANSPOZİBİL ELEMENTLER	73
10.1	Mısırdaki Ds Elementleri	73
10.2	Prokaryotlarda Transpozibil Elementler	75
10.2.1	Prokaryotik transpozonlar	75
10.3	Ökaryotlarda Transpozibil Elementler	77
10.3.1	Retrotranspozonlar	77
10.3.2	DNA Transpozonları	79
10.4	Dinamik Genom: Beklentinin Üzerinde Transpozibil Element	80
10.5	Genomik Savaş Alanı	82
11	HÜCRE SAYISININ GENETİK DÜZENLENMESİ: NORMAL VE KANSER HÜCRELER	83
11.1	Kanser: Hatalı Hücre Sayısının Düzenlenişinin Genetik Temelleri	85
11.2	Kanser Hücresinin Normal Hücreden Farkı	85
11.3	Kanser Hücrelerinde Mutasyon	86
11.3.1	Onkogen sınıfları	87
11.3.1.1	Hücre içi bir sinyal taşıyıcıda nokta mutasyon	88
11.3.1.2	Bir apoptosis baskılayıcının yanlış ekspresyonuna neden olan gen füzyonu	88
11.3.2	Tümör baskılayıcı gen sınıfı	89
11.3.2.1	Hücre çoğalmasını durduran bir proteinin nakavtı	89
11.3.2.2	Çoğalmayı durduran ve apoptosisi uyaran bir proteinin nakavtı	90
11.4	Kanser tanısı ve tedavisinde genomik yaklaşımlar	91
11.5	Kanserin Kompleksliği	91
	KAYNAKLAR	93

1 GEN FONKSİYONU

Klasik genetikte genlerin belli bir fenotipi oluşturduğu ve kromozomlarla beraber yeni nesillere taşındığı kabul edilir; bu taşınma sırasında işleyen kurallar incelenir. Bu bağlamda gen, soyut bir kimlik olarak ele alınır. Bunun aksine moleküler genetikte genlerin somut olarak ne olduğu ve genlerle kontrol ettikleri fenotipler arasındaki doğrudan ilişkinin nasıl gerçekleştiği incelenir. Bu bölümde gen ile fonksiyon arasındaki ilişki incelenecektir. Öncelikle belli bir fonksiyonu yürüten fonksiyon birimleri veya sistronlar komplementasyon testi ile tanımlanacaktır. Daha sonra da bir gen ürününün (protein, polipeptit) fenotipin belirlenmesindeki fonksiyonu incelenecektir.

1.1 Komplementasyon Testi ile Genlerin Tanımlanması

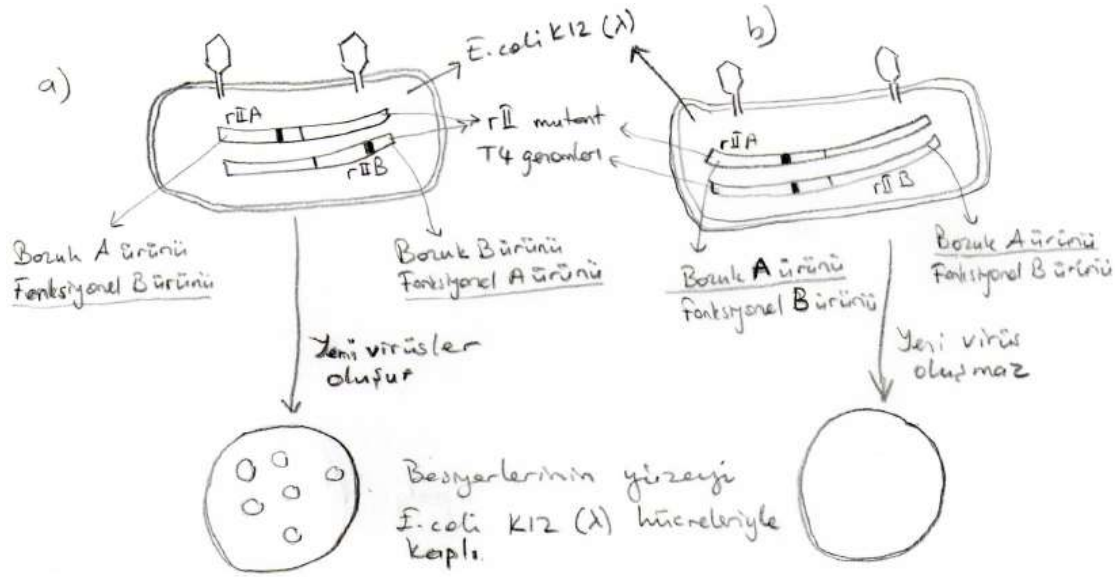
Klasik bakış açısı ile *gen bir fonksiyon birimidir, yani her gen bir fonksiyonu yönetir*. Benzer 1950'li yıllarda bakteriyofaj T4 genomunun *rII* bölgesinin bu klasik bakış açısına uygunluğunu belirlemek üzere deneyler yapmıştır. Bu deneylerde Edward Lewis'in *Drosophila*'da fonksiyonel gen birimlerinin özelliklerini incelemek üzere geliştirdiği **cis-trans testi** veya **komplementasyon testi** yaklaşımını bakteriyofajlara uyarladı.

Komplementasyon testi aynı fenotipi etkileyen mutasyonların ne kadar fonksiyon biriminden (genden) meydana geldiğini belirlemek için uygulanır. *rII* mutantlarıyla ilgili çalışmada, tek olduklarında *E. coli* K12(λ) suşunda çoğalamayan iki *rII* mutant fajının her ikisinin birlikte bu suşa verildiğinde, birlikte çalışıp projeni virüsler oluşturup oluşturamadığı incelendi. Eğer projeni fajlar üretilirse iki mutantın birbirini tamamladığı (komplemente ettiği) söylenir. Bunun yorumu şöyledir: Bu mutantlardaki mutasyonların her biri farklı genler (fonksiyon birimleri) içindedir yani her bir gen farklı bir fonksiyon birimini kodluyor olmalıdır. Her bir mutant, fonksiyon için gerekli olan iki üründen sadece birini üretiyor olmalıdır (Şekil 1.1a). Eğer hala projeni virüsler oluşturulamadıysa mutantlar birbirini tamamlayamazlar (komplementasyon gerçekleşmez). Bu sonuç her iki mutasyonun da aynı fonksiyon birimi (gen) içinde olduğunu gösterir. Burada her iki mutant da defektif (bozuk) ürünü üretiyor demektir, bakteriyofaj döngüsü ilerleyemez ve projeni virüsler oluşturulamaz (Şekil 1.1b).

Bir komplementasyon testinde eğer iki mutasyon farklı genomların üzerinde ise, bu mutasyonların konfigürasyonuna **trans konfigürasyonu** denir (Şekil 1.1a ve b). Dolayısıyla mutasyonlar trans durumunda birbirini tamamlayamıyorsa (komplementasyon gerçekleşmiyorsa) aynı fonksiyonel birim üzerindedirler. Eğer incelenen her iki mutasyon da aynı kromozom üzerindeyse mutasyonların konfigürasyonuna **cis konfigürasyonu** denir. Bu cis ve trans durumu nedeniyle komplementasyon testlerine **cis-trans testi** de denir.

Benzer (1955), cis-trans testleri sonucuna dayanarak genetik fonksiyon birimini **sistron** olarak isimlendirmiştir: Bir fonksiyonu yürüten genetik birime **sistron** denir. Bu tarihten sonra sistron teriminin gen terimi yerine yaygın şekilde kullanılma eğilimi yaygınlaşmıştır. Bu gün için gen terimi daha yaygın olarak kullanılır. Sonuçta gen de sistron da genetik fonksiyon birimini ifade etmektedir. T4 *rII* lokusundaki bu iki fonksiyon birimini, *rIIA* ve *rIIB* sistronları veya genleri olarak ifade etmek daha uygundur. Tahminen

bu genlerin ürünleri *E. coli* K12(λ) suşunda T4 bakteriyofajının çoğalabilmesi için gerekli olan süreçlerde iş görürler. Genetik olarak *rIIA* sistronu 6 hb ve 800 baz çifti (bp) uzunlukta iken *rIIB* sistronu 4 hb ve 500 bp uzunlukta.



Şekil 1.1: Bakteriyofaj T4'ün *rII* bölgesindeki fonksiyon birimlerini belirlemek üzere uygulanan komplementasyon testi. *E. coli* K12(λ) suşu farklı T4 *rII* mutantlarıyla enfekte edilmiştir. a) Komplementasyon gerçekleşir. b) Komplementasyon gerçekleşmez.

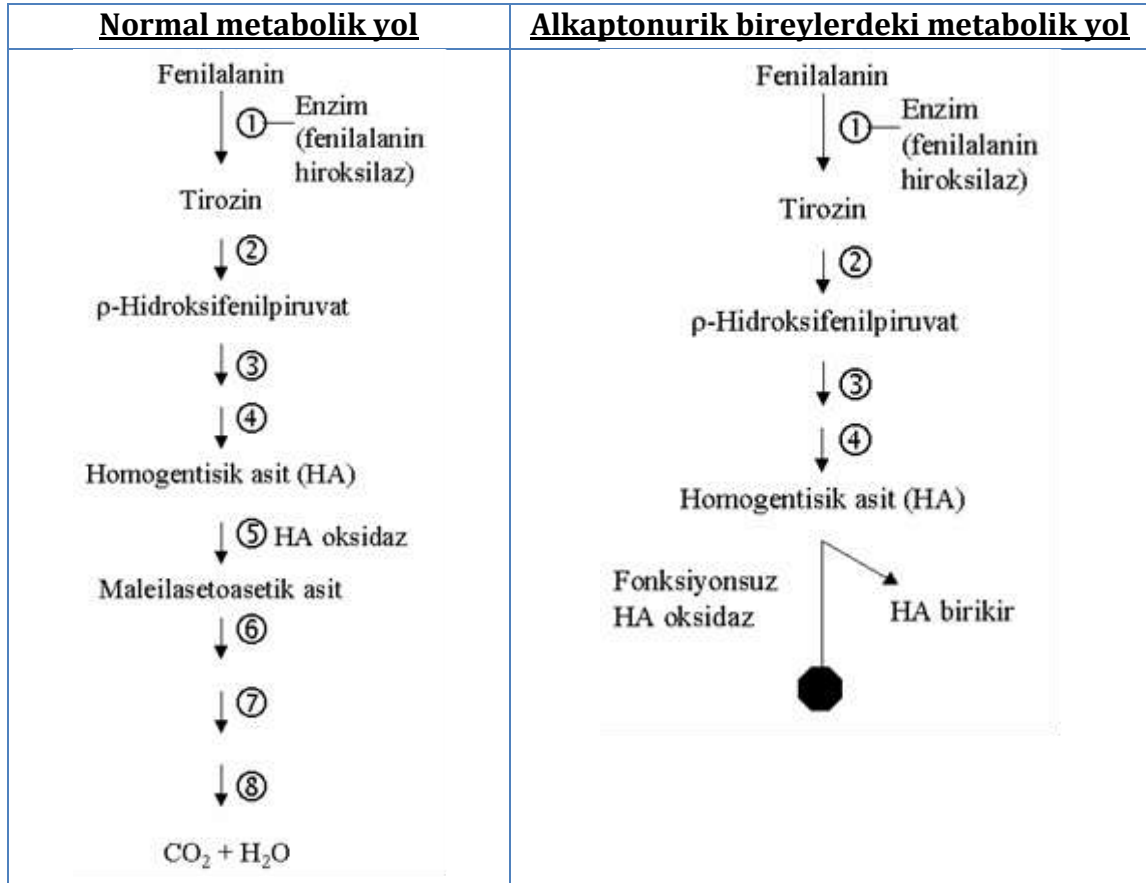
Komplementasyon testi aynı fenotipe ait mutantların fonksiyonel birimlerini (komplementasyon grubu-gen) tanımlamak için kullanılır. Birbirini tamamlayamayan mutasyonlar aynı fonksiyon birimi (sistron, gen) içindedir.

Komplementasyon testinin esası daima aynıdır, sadece organizmaya bağlı pratik ayrıntılarda farklılıklar vardır. Diploit organizmalarda komplementasyonu düşünelim. İki saf döl (ilgili allel çiftleri bakımından homozigot) mutant *Drosophila melanogaster* suşu, (yabani tip grimsi sarı vücut rengi yerine) siyah vücut rengine sahiptirler. Bu iki sinek çaprazlandığında bütün F1 sinekleri yabani tip grimsi sarı vücut rengine sahiptir. Bu veri nasıl açıklanabilir? En basit açıklama her ikisi de vücut rengi fenotipinin oluşmasında görev yapan iki gen içindeki mutasyonlar arasında meydana gelen komplementasyondur. Yani resesif otozomal gen eboni (*e*) homozigot durumda siyah rengi oluşturur. Diğer bir otozom üzerindeki farklı bir resesif gen siyah (*b*) de homozigot durumda siyah vücut rengi oluşturur. Her iki mutant da homozigot olduğuna göre genotipik olarak $e/eb^+/b^+$ ve $e^+/e^+b/b$, ve fenotipik olarak siyah olacaklardır. F1 genotipi $e^+/eb^+/b$ olacaktır. Bu durum *rII* sistron deneylerindeki trans konfigurasyonunu ile aynıdır. F1 yabani tip vücut rengine sahiptir, çünkü komplementasyon gerçekleşmiştir.

1.2 Enzim Yapısının Genler Tarafından Kontrolü

İngiliz doktor Garrod alkaptonuri hastalığı üzerine araştırmalar yapmıştır. Bu hastalarda idrar havayla temas ettiğinde siyahlaşmaktadır. Garrod gözlemine dayanarak hastalığın genetik olarak kontrol edildiğine karar vermiştir: Yine alkaptonuri hastalarının idrarla-

rında homogentisik asit (HA) bulunduğunu ve HA'in havayla temas ettiğinde siyah renge dönüştüğünü belirlemiştir. Garrod araştırmalarının sonucunda normal insanların HA'i metabolize ederken alkaptonuriklerin metabolize edemediklerini öne sürmüştür.



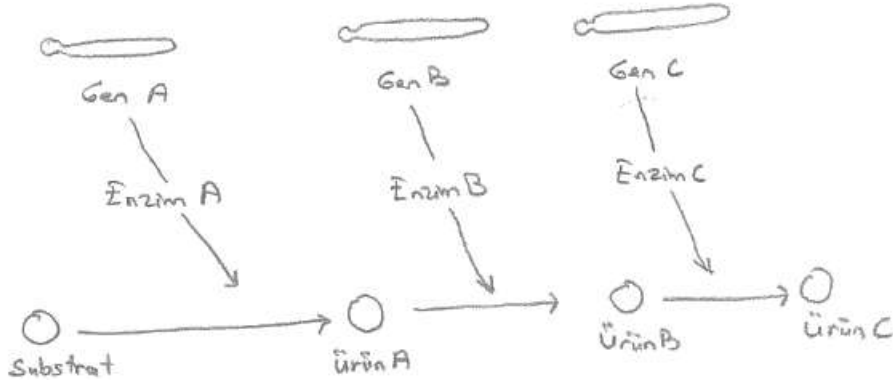
Şekil 1.2: Fenil alaninin metabolize edildiği yol ve alkaptonuriklerde bu yolun durdurulması.

Normal bireylerde bir seri gen tarafından kodlanan enzimler, fenilalaninin metabolize edildiği metabolik yoldaki basamakları katalizlerler. Garrod, alkaptonuri hastalarında, otozomda yer alan HA oksidaz genindeki bir resesif mutasyonun HA oksidazın fonksiyonsuzlaşmasına neden olduğunu ileri sürmüştür (Şekil 1.2'ye bakınız).

Garrod diğer üç hastalığı daha incelemiş ve bu hastalıkların da birer metabolik yolun bloke edilmesinden kaynaklandığını söylemiş, olayı **içsel metabolizma hatası** olarak adlandırmıştır. Ancak o zamanın bilim çevreleri ve hekimler bu sonuçlara itibar etmemişlerdir.

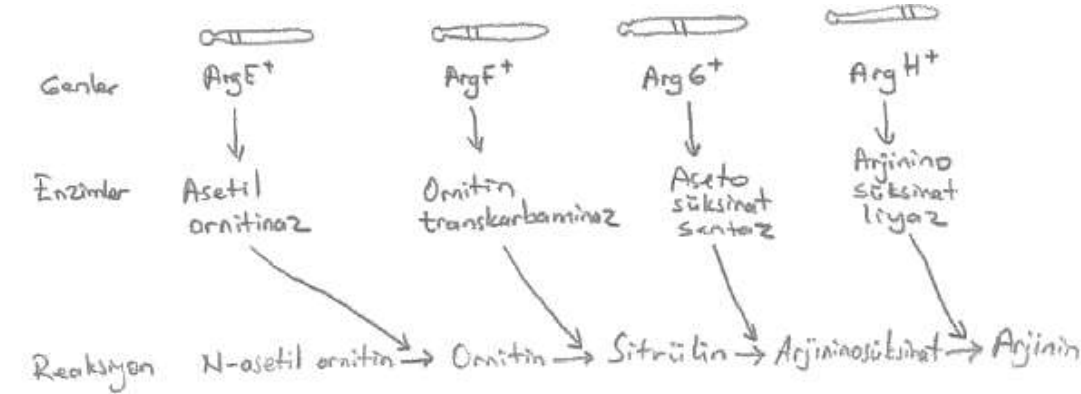
Bir gen ile enzim arasındaki ilişkiyi bilim alemine kabul ettirecek deneyler Beadle ve Tatum tarafından *Neurospora crassa* ile gerçekleştirilmiştir. Deney sonuçları 1942 yılında yayınlanmıştır. Beadle ve Tatum elde ettikleri besin mutanti *N. crassa* hücreleriyle çalışarak Şekil 1.3'te gösterilen bir modelle bir metabolik yolda görev alan enzimlerle genleri ilişkilendirmişlerdir.

Araştırmacılar gen A'da meydana gelen mutasyon sonucu öncü substratın hiç kullanılmadığını belirlediler. Gen B'de meydana gelen mutasyon, ara ürün A'nın birikimine, gen C'deki mutasyon ise ara ürün B'nin birikimine neden olur.



Şekil 1.3: Bir öncü substratın her biri bir enzim tarafından katalizlenen üç basamak sonucunda son ürün C'ye dönüştürüldüğü hipotetik biyokimyasal yol. Her enzim bir gen tarafından kodlanır.

Beadle ve Tatum deneylerini biraz daha geliştirerek her bir mutanta, mutant enzimin normal formunun oluşturduğu ara ürünü vererek gelişmelerini sağlamışlardır. Sözgelimi ornitin transkarbaminaz mutanlığı bir suş N-asetilornitinden başlayarak arjinin sentezini gerçekleştiremez (Şekil 1.3'e bakınız). Ancak besin ortamına sitrulin verildiğinde arjinin sentezlenebilir ve mutant suş arjinin içermeyen minimal besin ortamlarında üreyebilirler. Bu durumda *ArgF⁺* geninde meydana gelen bir mutasyon bir metabolik basamağı katalizleyen fonksiyonel bir enzimin oluşmasını engellemiştir.



Şekil 1.4: Arjinin biyosentetik yolu. *N crassa*'da her reaksiyonu katalizleyen enzimleri kodlayan dört gen mevcuttur. Genler farklı kromozomlarda yer alır.

Sonuçta Beadle ve Tatum metabolik yollarda her bir basamağın bir enzim tarafından yürütüldüğü ve her bir enzimin bir gen tarafından kodlandığını ortaya attılar. Bu sonuç **bir gen-bir enzim hipotezi** olarak bilinir. Ancak burada göz ardı edilmemesi gereken bir nokta, bazı enzimlerin birden fazla farklı polipeptitin bir araya gelmesiyle meydana geldiğidir. Böyle bir durumda birden fazla gen bir enzimin oluşmasında rol almaktadır. Sonuç olarak bir gen-bir enzim hipotezi de gen kavramını tam olarak açıklamak için yeterli değildir. İleriki bölümlerde gen kavramının moleküler boyutları tartışılmaya devam edilecektir.

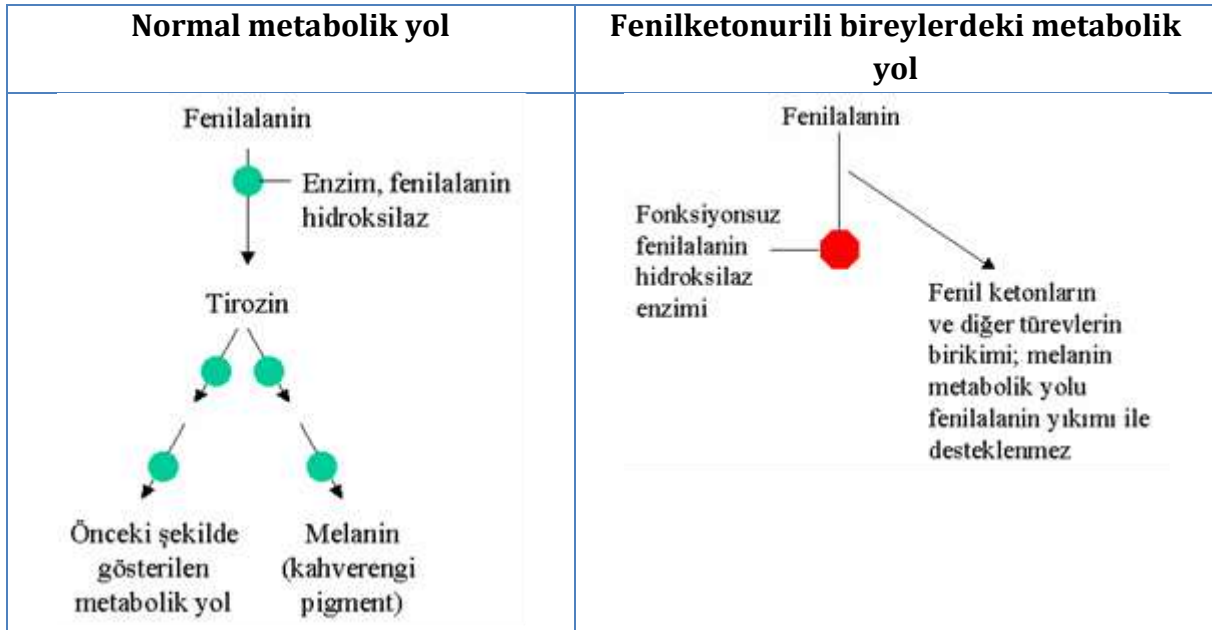
1.3 İnsanlarda Genetik Nedenli Enzim Eksiklikleri

Bir çok insan hastalığı tek bir gen üzerinde meydana gelen bir gen mutasyonu sonucunda meydana gelir. Böyle bir mutasyon tek bir anormalliğe veya çok sayıda anormalliğe neden olabilir. Aşağıdaki Tablo 1.1'de bu hastalıklardan bazıları seçilerek verilmiştir. Bunlardan sadece ikisi, fenilketonuri ve albinizm incelenecektir.

Tablo 1.1: Tek gen mutasyonlarıyla meydana gelen bazı insan genetik hastalıkları

Genetik Bozukluk	Enzim Eksikliği
Albinizm	Tirozinaz
Alkaptonuri	Homogentisik asit oksidaz
Disakkarit intoleransı	İnvertaz
Fenilketonuri	Fenilalanin hidroksilaz
Fruktosuri	Karaciğer fruktokinaz
G6PD eksikliği (Akdeniz anemisi)	Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz
Gut (primer)	Hipoksantin fosforibosil transferaz
Hemolitik anemi	Glutation peroksidaz Heksokinaz Piruvat kinaz
İmmün yetmezlik	Adenozin deaminaz
İntestinal laktaz eksikliği (ergin)	Laktaz
Kseroderma pigmentozum	DNA-spesifik endonükleaz

Fenilketonuri: Alkaptonuri gibi fenilketonuri (PKU) de içsel metabolik hatadan kaynaklanır. Çok büyük oranda 1. kromozom üzerindeki bir resesif mutasyon sonucu oluşur, bireyler homozigot mutant olmadıkça karakteri göstermezler (Şekil 1.5).

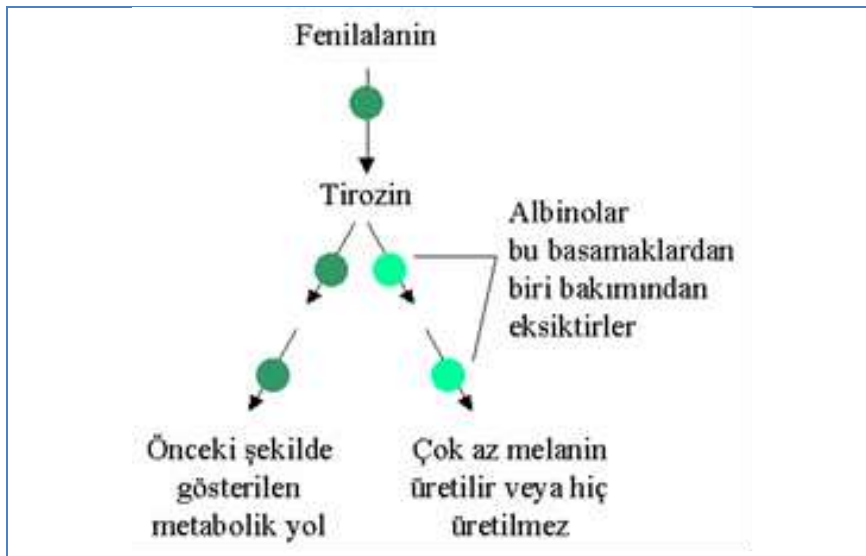


Şekil 1.5: Normal ve fenilketonurik bireylerde fenilalanin-tirozin metabolik yolu.

Fenilalanin esasi amino asitlerden birisidir (diyetle alınmak zorundadır, vücutta sentezlenemez). Proteinlerimizin yapısına katılır ancak fazla miktarları zararlıdır. Vücuttaki fazla fenilalanin, tirozine dönüştürülerek zararlı etkisi yok edilir. Fenilketonurik olarak doğan bir bebek ciddi problemlerle karşı karşıyadır. Böyle bir bebeğin besinlerle aldığı fazla fenilalanin idrarla atılamaz, enzimatik olarak yıkılamaz ve vücutta birikir (Doğum öncesinde fetüs nasıl korunur?). Biriken bu fenilalanin, ikincil bir metabolik yolla fenil piruvik asite dönüştürülür. Fenil piruvik asit merkez sinir sistemi hücrelerini etkiler ve çok ciddi semptomlar oluşur: İleri mental gerilik, yavaş gelişme ve erken ölüm.

Bir fenolketonurik birey tirozin de sentezleyemez. Bu amino asit protein sentezinde, tiroksin ve adrenalin hormonları ve deri melanin pigmentinin sentezinde kullanılır. Tirozin diyetle de alınır. Ancak fenolketonurik bireylerde tirozinin diyet dışındaki diğer kaynağı yani fenilalanin yıkımı ile sağlanan kaynak engellenmiş durumdadır. Bu durumda yeterli melanin sentezlenemediğinden bu bireylerin derileri daha uçuk ve gözleri mavidir (kahverengi göz rengi genine sahiptirler, fenokopi!). Ayrıca daha düşük adrenalin seviyelerine sahiptirler.

Albinizm: Albinizm de otozomal resesif bir mutasyonun sonucu oluşur. Mutasyon, tirozinden kahverengi pigment melaninin sentezlenmesinden sorumlu enzimi kodlayan bir geni etkiler. Melanin sentezlenemediği için albino bireyler beyaz deri, beyaz saç, kırmızı göze sahip olurlar yani iriste pigment yoktur. Melanin ultraviyole ışınlarını emerek derinin bu ışınların zararlı etkisinden korunmasında görev yapar. Dolayısıyla albino bireyler son derece duyarlıdır. Metabolik basamağın blokajı ara ürün (tirozin) birikimi fenilketonuride olduğu gibi bir problem oluşturmaz. İki biyokimyasal basamaktan biri bloke edilerek albinizm oluşabileceğinden iki tip albinizm mevcut olabilir (Şekil 1.6). Farklı tip albinizme sahip iki bireyin evliliğinden normal çocuklar doğabilir (komplementasyon!).



Şekil 1.6: Albino ve normal bireylerde fenilalanin-tirozin metabolik yolu.

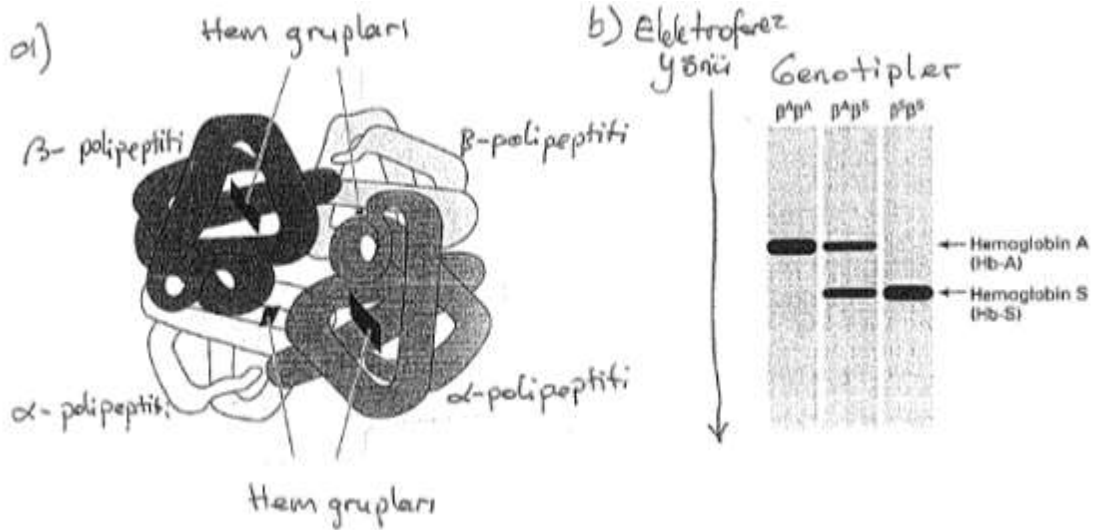
1.4 Protein Yapısının Genler Tarafından Kontrolü

Bütün proteinler enzim olmadıklarına göre genlerin tam fonksiyonlarını anlamak üzere hemoglobin gibi enzim olmayan yapısal proteinlerle genler arasındaki ilişkiyi de incelememiz gerekir. Orak hücre anemisi, genlerin yapısal proteinleri kontrolüne örnek olarak incelenecektir.

Orak hücre anemisi: Orak hücre anemisi kanda oksijen taşıyan hemoglobin proteininde tek bir amino asit değişikliğine dayanan bir genetik insan hastalığıdır. İlk defa 1910 yılında Herrick hasta bireylerde düşük oksijen basıncında alyuvarların tipik disk yapısını kaybederek orak şeklinde bir yapıya dönüştüğünü belirlemiştir. Orak hücreleri normal hücrelerden daha dayanıksızdır. Ayrıca esneklikleri de zayıftır. Bunun sonucu olarak kılcal damarlara ulaştıklarında tıkanmalara neden olurlar ve ilgili dokuda oksijen yetersizliği oluşur. Oksijen yetersizliği genellikle ekstremitelerde oluşsa da kalp, akciğer, beyin, böbrekler, sindirim kanalı, kaslar ve eklemler de oksijen eksikliğine maruz kalabilmekte ve zarar görmektedir. Dolayısıyla hastalar kalp yetmezliği, zatürre, kas erimesi, böbrek yetmezliği, karın ağrısı ve romatizma gibi sağlık problemleri yaşarlar.

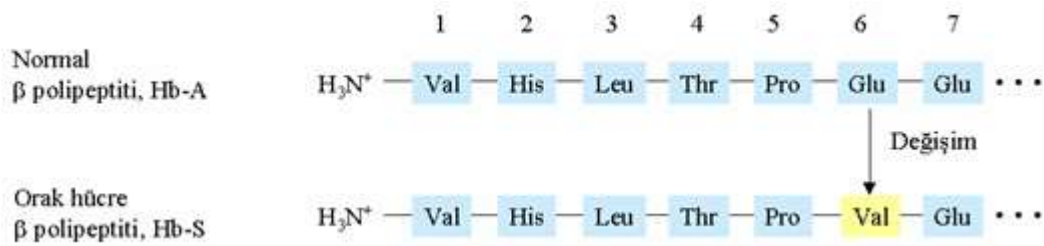
Orak hücre anemisi hemoglobin molekülündeki değişikliklerden kaynaklanır. Hemoglobin iki farklı gen tarafından kodlanır. Genlerden biri tarafından kodlanan iki α polipeptiti ve diğer gen (β -globin geni) tarafından kodlanan iki β -polipeptitinden oluşur (Şekil 1.7a). Bu yapıdaki hemoglobin Hb-A olarak bilinir. **Orak hücre anemisi** durumunda ise α polipeptitleri normaldir ancak β -globin geni homozigot mutant olarak bulunur ($\beta^S\beta^S$). Bu tip hemoglobin Hb-S olarak adlandırılır. Mutant allel β^S ile yabani tip allel β^A eşbaskındırlar. Dolayısıyla heterozigot **bireyler**, ($\beta^A\beta^S$), iki normal α polipeptiti, bir normal β polipeptiti ve bir de mutant β polipeptiti taşırlar. (*Tek tek hemoglobin molekülleri ele alındığında bir hemoglobin molekülü tek tip β zinciri taşır: normal veya mutant!). Eşbaskın $\beta^A\beta^S$ heterozigot bireyler **orak hücre karakteri** gösterirler. Orak hücre karakteri gösteren heterozigot bireylerde normal şartlarda anemiklerdeki ($\beta^S\beta^S$) semptomlar görülmez, ancak oksijen seviyesi ani olarak düştüğünde (sözelimi havalanan bir uçakta) alyuvarlar oraklaşabilmekte ve tipik anemi belirtileri görülebilmektedir.

Pouling 1950'lerde moleküllerin elektrik özelliğine göre ayrılması amacıyla uygulanan özel elektroforetik yöntemlerle, farklı tip hemoglobin polipeptit zincirlerini ayırmıştır (Şekil 1.7b). $\beta^A\beta^A$ normal bireylerine ait β zincirlerinin, elektroforetik ortamda, $\beta^S\beta^S$ anemik bireylerinkine göre daha yavaş ilerlediği görülmüştür. $\beta^A\beta^S$ (heterozigot, orak hücre karakterli) **bireylerde** ise her iki tip polipeptitin de mevcut olduğu görülmüştür. Pouling bu sonuçlara dayanarak orak hücre anemisinin hemoglobin molekülünün kimyasal yapısını değiştiren bir mutasyondan kaynaklandığı sonucuna varmıştır. Bu yargı protein yapısının genler tarafından kontrol edildiği görüşü için güçlü bir kanıt olarak kabul görmüştür.



Şekil 1.7: a) Hemoglobin molekülü, b) anemik, heterozigot ve normal bireylerde farklı hemoglobin polipeptit molekülleri.

β zincirindeki gerçek moleküler değişikliğin ne olduğu 1957 yılında Ingram tarafından belirlenmiştir. Hb-A ($\beta^A\beta^A$) ve Hb-S ($\beta^S\beta^S$)'nin amino asit dizisi belirlenmiştir. β zincirinin amino ucundan itibaren altıncı amino asitte bir değişikliğin olduğu belirlenmiştir. Bu pozisyondaki asidik glutamik asit nötral valine değişmiştir (Şekil 1.8). Bu özel değişim β zincirinin farklı bir şekilde katlanmasına neden olmuştur. Bu katlanma şekli bu bireylerde alyuvarların orak şekline dönüşmesine neden olmaktadır. β -globin genindeki tek bir baz çifti değişimi ile glutamik asit kodonu valin kodonuna değişmektedir. Bu sonuçlar yapısal proteinleri oluşturan bir polipeptit zincirinin amino asit dizisinin genler tarafından kontrol edildiğini gösterir.



Şekil 1.8: Hemoglobinin β polipeptitinin normal ve mutant formlarının ilk yedi amino asit dizisi.

Genin, bu veriler ışığında bir proteini değil bir polipeptiti kodlayan DNA bölgeleri olduğu görülmektedir. Bu durumda gen için **bir gen-bir polipeptit** tanımı daha etkili bir yaklaşım olacaktır. Ancak ökaryotların bazılarında belli bir gen bölgesinden birden fazla polipeptitin kodlandığı da bilinmektedir.

2 DNA: GENETİK MATERYAL

Bu bölüme kadar kromozomlar üzerinde bulunan genlerin fenotipik özellikleri kontrol ettiğini varsayarak kromozom ve genlerin gametler aracılığı ile yeni nesillere geçiş yolları incelendi. Mantık olarak genler üzerinde bir çeşit bilgi mevcut olmalıdır. Yeni nesillere aktarıldığında yavruların karakterlerini etkileyen bu bilgi **genetik bilgi** olarak isimlendirilir. Aynı bilginin yavruların ergin formuna dönüşünü de yönettiği sonucuna ulaşabiliriz.

1944'e kadar hücrenin genetik materyalini oluşturan yapının ve dolayısıyla genetik bilginin taşındığı materyalin ne olduğu bilinmemektedir. Bu yapının kromozomlarla ve kromozom birimleri olan genlerle ilgili olduğu tahmin edilmekteydi. Ancak kromozomların da DNA ve proteinlerden meydana gelmesi nedeni ile hangi molekülün genetik materyal olduğu bilinmemektedir. 1944, DNA'nın genetik materyal olduğu ve kalıtım sürecinin temel bilgi kaynağı olduğunu gösteren ilk deneysel araştırma sonucunun açıklandığı bir yıl olmuştur. Bu bölümde DNA ve istisna durumlarda RNA'nın genetik bilgiyi taşıdığını gösteren çalışmalar özetlenecektir.

2.1 Genetik Materyal Tartışmaları (1900-1944)

Kalıtım düşüncesi varolduğundan bu yana genetik materyalin fiziksel olarak nesilden nesile aktarıldığı kabul görmüştür. Biyomoleküller üzerinde yapılan öncü kimyasal araştırmalar sonucu genetik materyal olmaya aday iki molekül, DNA ve proteinler önerildi ise de başlangıçta proteinler daha ağırlıklı olarak kabul görmüştür. Bunun farklı nedenleri vardır. Her şeyden önce hücre içinde proteinler boldur. Diğer yandan nükleik asitlerin yapısını açıklamak üzere sunulmuş olan model genetik çeşitliliği açıklayamamaktaydı (tetranükleotit temel yapısı modeli). Ayrıca 1940'lar öncesinde aktarım genetiği ve mutasyonlar üzerine yoğunlaşıldığından genetik materyalin kimliği üzerinde fazla durulmamıştı. 1940'larda tetranükleotit modelinin doğru olmadığı ortaya çıkınca araştırmaların seyri temelden değişti ve kalıtsal materyalin DNA olduğunu gösteren araştırmalar gerçekleştirildi.

2.2 DNA'nın Genetik Materyal Olduğunu Gösteren Deneysel Kanıtlar

2.2.1 Prokaryotlar ve virüslerle gerçekleştirilen deneyler

O. Avery, C. MacLeod ve M. McCarthy tarafından 1944 yılında yayınlanan, bakterilerde transformasyonun özellikleri ile ilgili makale DNA'nın genetik materyal olduğunun kabulünün başlangıcı olmuştur. Bu makale biyolojinin sıçramalar yapmasını sağlayan üç makaleden biri olarak kabul edilir. Diğerleri Darwin'in evolüsyon teorisini ve Mendel'in kalıtım (aktarım) genetiğinin kurallarını ortaya koyduğu makaleleridir.

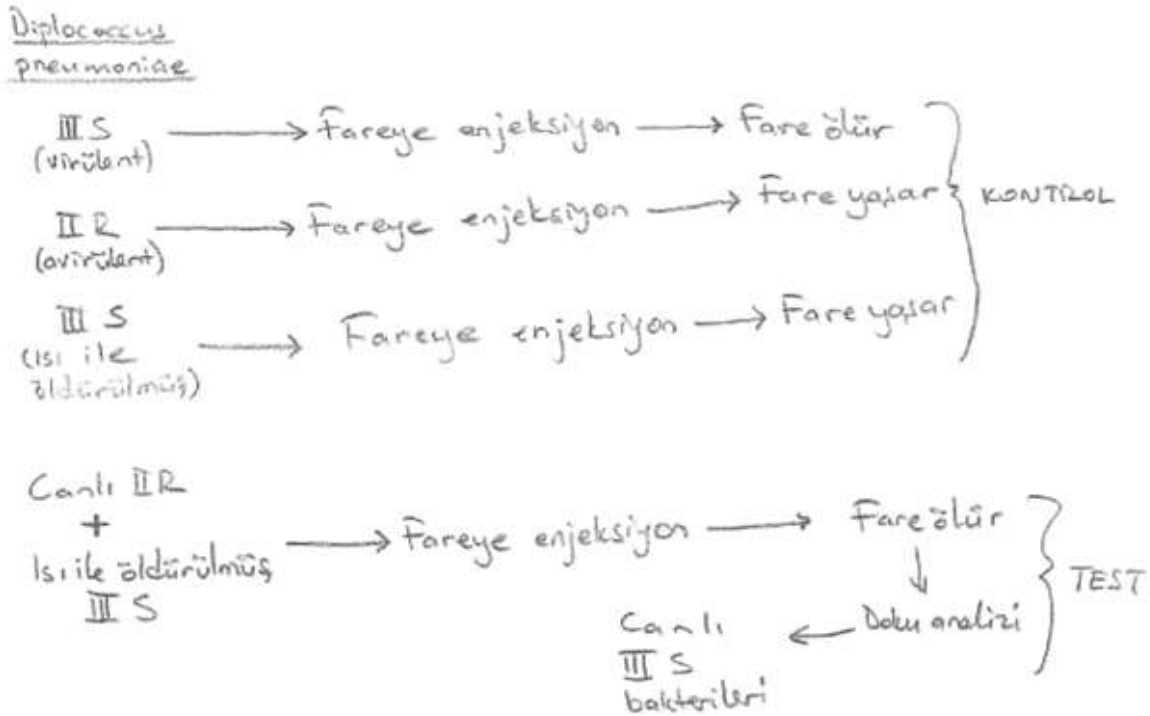
DNA'nın genetik materyal olduğuna ilişkin çalışmalar öncelikle prokaryotik organizmalar olan bakteriler ve bakterileri enfekte eden virüsler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tercihin bazı nedenleri vardır: Her şeyden önce saatler içinde hayat döngülerini tamamladıkları için hızlı gelişir ve çoğalırlar. Deneysel olarak manipüle edilebilirler,

mutasyonlar kolayca uyarılabilir ve seçilebilir. Bu nedenlerle bu tip deneyler için idealdirler.

2.2.1.1 Transformasyon çalışmaları

Avery ve arkadaşlarından önce bazı öncü çalışmalar gerçekleştirilmiştir. 1927 yılında İngiliz Sağlık Bakanlığı doktorlarından F. Griffith tarafından ilk çalışmalar yapılmıştır. Griffith, *Diplococcus pneumoniae* (*Streptococcus* sp.) bakterisiyle bir seri deney yapmıştır. İnsanlar ve farelerin de dahil olduğu bazı omurgalılarda zatürreye neden olan *D. pneumoniae* suşları virüent; hastalığa neden olmayan suşlar da avirüent suşlardır. Virülens (hastalık yapma yeteneği) polisakkarit bir kapsülün varlığı ile ilgilidir. Kapsülsüz suşlara ait bakteriler fagositler tarafından yutularak yok edilirken kapsüllü suşlara ait bakteriler fagositler tarafından yutulamazlar, vücutta çoğalır ve zatürreye neden olurlar. Diğer bir özellik olarak kapsüllü suşlar agar kültürlerde ürettiğinde pürüzsüz (smooth = S) koloniler, kapsülsüzler ise pürüzlü koloniler oluştururlar. Her bir *Diplococcus* suşu ayrıca farklı bir serolojik tipe de sahiptir. Griffith tip II ve tip III ile çalışmıştır.

Griffith canlı avirüent suşları (IIR) fareye enjekte ettiğinde zatürre oluşmadığı, ancak canlı virüent suşları enjekte ettiğinde (IIIS) farelerin zatürreden öldüğünü belirlemiştir. IIIS suşuna ait bakterileri kaynatarak öldürdükten sonra farelere enjekte ettiğinde farelerin hasta olmadığını belirlemiştir. Daha sonra sıcaklıkla öldürülmüş IIIS bakterileriyle canlı avirüent IIR bakterilerini karıştırmış ve fareye enjekte etmiştir. Ölme-yeceği beklentisinin aksine farenin hastalandığı ve öldüğü görülmüştür (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Griffith'in transformasyon deneyi.

Bu sonucun deneysel bir hatadan mı kaynaklandığını belirlemek üzere ölen farenin dokularından bakterileri izole etmiş ve bu bakterilerin orijinal IIIS bakterileri ile

aynı olduğunu görmüştür. Sonuç olarak, “sıcaklıkla öldürülmüş IIS bakterilerinin, avirülent IIR bakterilerini IIS virü lent formuna dönüştürdüğünü” ileri sürmüştür. Bu olayı da **transformasyon** olarak adlandırmıştır. Tek başına kapsülün hastalık oluşturmadığını bilmesine rağmen (ölü IIS bakterileri hastalık yapmaz!) transformasyona neden olan şeyin polisakkarit kapsülün bir parçası veya kapsül sentezi için gerekli bir molekül olduğu önerisinde bulunmuştur. Böylece deneylerinin sonucunu doğru bir şekilde ifade edememiştir.

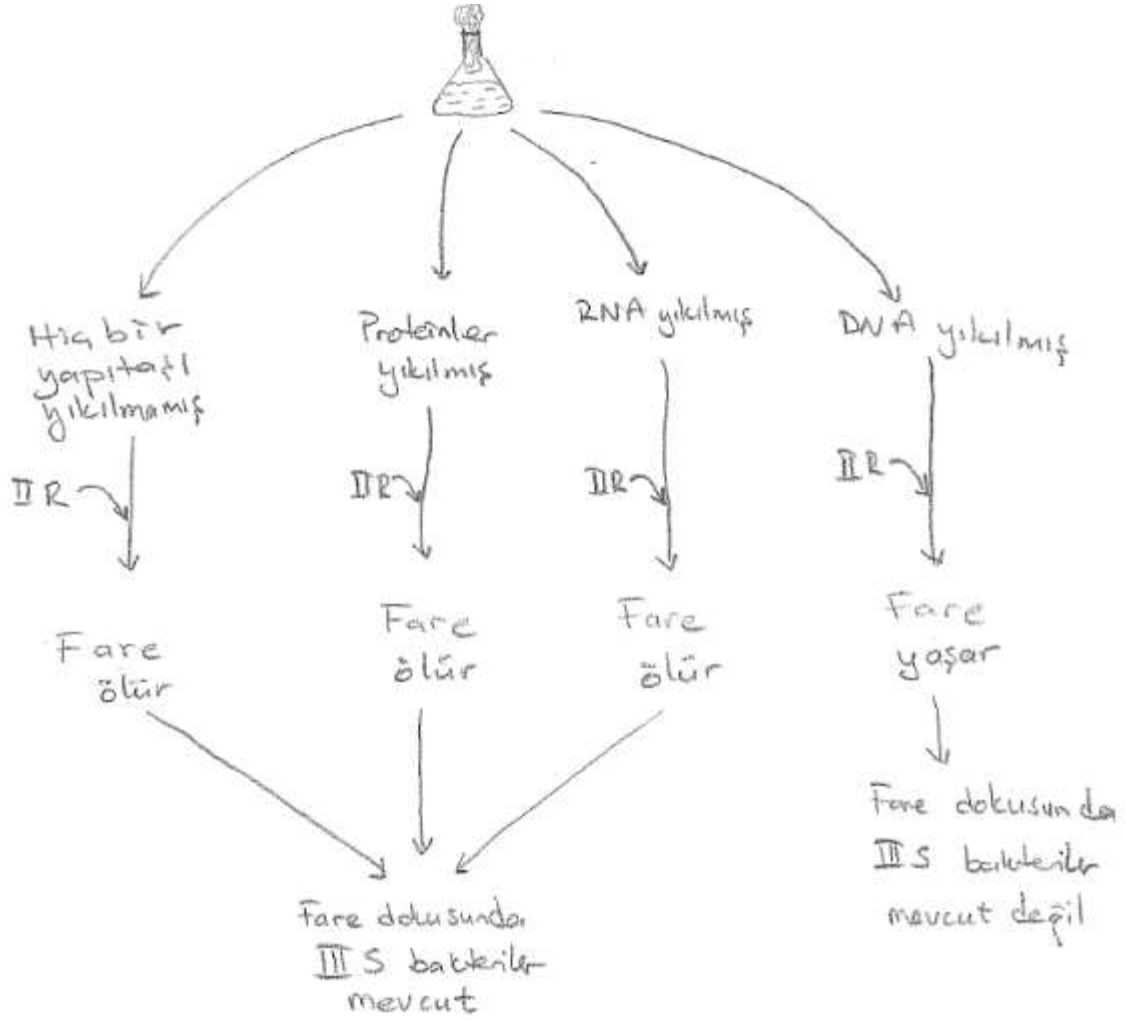
Griffith, çalışmalarının sonucunu tam doğrulukta ifade edemediyse de diğer araştırmacılara önemli bir birikim sunmuştur. Takip eden çalışmalarda transformasyonun farelere enjeksiyon yapılmaksızın *in vitro*da (test tüpünde) de gerçekleştiği, transformasyon için tam hücrelere ihtiyaç olmadığı, hücresel parçaların da yeterli olduğu sonuçlarına ulaşılmıştır. Sonuçta da transformasyonun bir molekül tarafından gerçekleştirildiği genel kanısı hakim olmuştur.

Avery, MacLeod ve McCarthy 1944 yılında moleküler genetik alanının klasik bir makalesi olarak kabul edilen 10 yıllık çalışmalarının sonuçlarına yayınladılar. Bu makalede transformasyona neden olan molekülü oldukça saf bir şekilde izole ettiklerini, bu molekülün şüpheye yer bırakmayacak bir şekilde DNA olduğunu bildirdiler. Bu araştırmacılar büyük miktarlarda IIS suşu üreterek santrifügasyon ile hücreleri yoğunlaştırdıktan sonra parçaladılar. Bu kaba hücre parçacıklarını süzerek bir hücre süzüntüsü (filtrat) elde ettiler. Bu süzüntü ile yaptıkları denemede transformasyonun gerçekleştiğini belirlediler. Proteinleri ve polisakkaritleri uzaklaştırıcı işlemler uygulandıktan sonra dahi süzüntünün hala transformasyonu gerçekleştirebildiğini gördüler. Daha sonra süzüntüden etanol ile çöktürerek elde ettikleri nükleik asitlerle yaptıkları denemede de transformasyonun gerçekleştiğini gördüler. Sonuçta transformasyona neden olan molekülün nükleik asitler olduğu sonucuna vardılar ve bu sonucu şüpheye yer bırakmaksızın göstermek üzere incelikli bir şekilde tasarlanmış bir seri deney gerçekleştirdiler.

IIS hücrelerden elde ettikleri süzüntü stokundan bir miktar alarak proteazlarla muamele ettiler. Daha sonra bu süzüntüyü IIR canlı bakteri hücreleri ile karıştırıp fareye enjekte ettiler ve fareler hastalanarak öldü. Bu sonuç transformasyona proteinlerin neden olmadığını göstermektedir (Şekil 2.2). Stoktan aldıkları diğer bir miktar süzüntüyü bu sefer RNA'yı parçalayan RNAaz enzimi ile muamele ettiler. Yine IIR bakterileri ile bu süzüntü karıştırılıp fareye enjekte edildiğinde farelerin hastalanarak öldüğünü gözlediler. Buradaki sonuç RNA'nın da transformasyona neden olmadığıdır. Son olarak süzüntü DNA'yı parçalayan DNAaz enzimi ile muamele edilip IIR bakterileri ile karıştırılarak farelere enjekte edildiğinde farelerin hastalanmadığını belirlediler. Her deneme sonrasında ölü ve canlı farelerden S suşları aranmış, ölü farelerin tamamından canlı S suşları elde edilmiştir. Buradan çıkarılacak sonuç DNA'nın transformasyona neden olan molekül olduğudur.

Avery ve arkadaşları çalışmalarının genetik ve biyokimyasal boyutlarını da tanımlamışlardır. IIS bakterilerinden elde edilen DNA'nın IIR bakterilerinde bir seri enzimatik reaksiyonu koordine ederek IIS tipi polisakkarit kapsül üretimini sağladığı sonucuna ulaştılar. Ayrıca transforme olan bu hücrelerin virü lent özelliklerini nesiller boyu devam ettirdiklerini belirlediler ve transformasyonun kalıtlanabilir olduğunu ve

transformasyon sürecinin genetik bilgiyi etkilediği sonucuna vardılar. Bakterilerde birçok karakter transforme olabilmektedir.



Şekil 2.2: Avery ve arkadaşlarının DNA'nın, transformasyona neden olan molekül olduğunu gösteren deney düzeniği.

2.2.1.2 Hershey-Chase deneyi

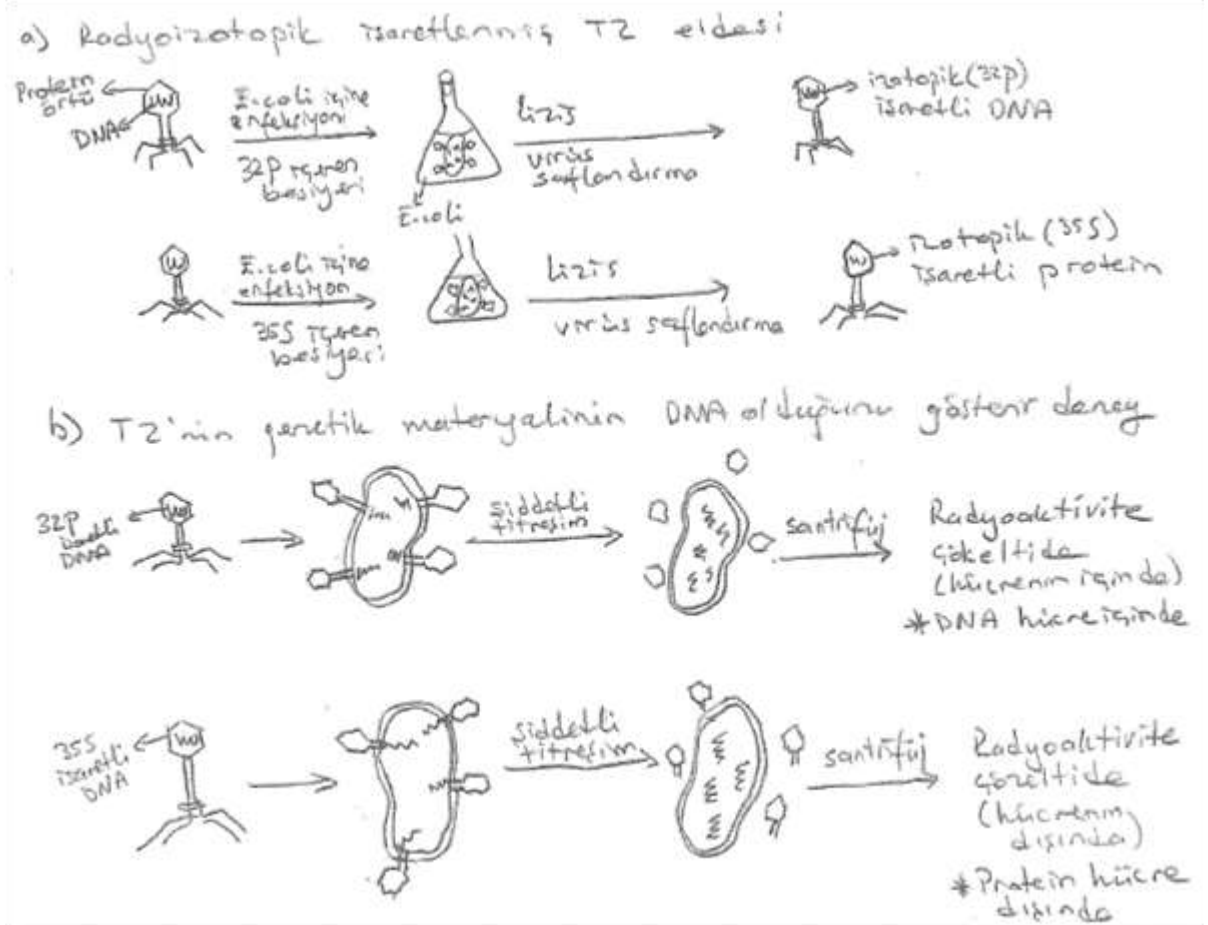
DNA'nın genetik materyal olduğunu destekleyici ikinci önemli kanıt bakteriyofaj T2 ile yapılan çalışmalardan sağlandı. Bu virüs bakteriyofaj veya kısaca faj olarak adlandırılır, Escherichia coli bakterisini konak olarak kullanırlar. Virüs parçacığı öz kısmında bulunan bir DNA ve bu DNA'yı saran protein örtüden meydana gelir.

1952 yılında Hershey ve Chase, faj çoğalmasını sağlayan olayları açıklamak üzere tasarladıkları deneylerin sonuçlarını yayınladılar. Faj proteinlerinin ve nükleik asitinin bakteri hücresi ile ilişki içinde, faj çoğalmasındaki rollerini araştırdılar. Deneylere başlamadan önce T-2 hakkında şu verilere sahiptiler:

1. T2 fajı %50 protein ve %50 nükleik asitten meydana gelir.
2. Enfeksiyon, fajın kuyruk iplikçığı ile bakteri hücre yüzeyine tutunması ile başlar.
3. Yeni virüs üretimi bakteri hücresi içinde gerçekleşir.

Bu verilerden hareketle fajın molekül yapı veya yapılarının, yani DNA ve/veya proteinin bakteri hücresine gireceği ve viral çoğalmayı yöneteceği kesindir. Hangisi,

DNA mı yoksa protein mi yada her ikisi birden mi hücreye girecektir? Bu sorunun cevabını araştırmacılar radyoizotopları kullanarak aramışlardır. DNA fosfor içerir kükürt içermez, proteinler ise kükürt içerir fosfat içermez (normal şartlarda!). Eğer iki grup *E. coli* hücresi (kültür) ayrı ayrı üretilirken kültürlerden birinin bulunduğu ortama (besin ortamına) ^{32}P , diğer kültürün bulunduğu ortama da ^{35}S konulursa ve sonra her iki kültür de T2 ile enfekte edilirse, üretilecek virüslerin bir grubunun DNA'sı ^{32}P ile diğer grup virüsün proteinini de ^{35}S ile radyoizotopik olarak işaretlenmiş olacaktır. Bu iki kültürden T2 fajları izole edilerek her biri ayrı birer radyoizotop içermeyen *E.coli* kültürü ile karıştırılarak hücrelere tutunmaları beklenmiştir. Enfeksiyon için belli bir süre beklendikten sonra hızlı titreşimlerle virüs parçacığının hücrelerden ayrılması sağlanmıştır. Her iki kültür santrifügasyona tabi tutulmuş ve çökelti ile çözeltideki radyoizotoplar takip edilmiştir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3: *E.coli* hücreleri içinde T2 faj üretiminden proteinlerin değil viral DNA'nın sorumlu olduğunu gösteren Hershey-Chase deneyinin ana hatları.

^{32}P ile DNA'sı işaretlenen T2 ile enfekte edilen kültürde eğer radyoaktivite hücrelerin oluşturduğu çökelti içinde ise DNA hücreye girmiş, çözeltide ise girmemiş demektir. Deney sonuçları radyoaktivitenin çökeltide olduğunu göstermiştir, dolayısıyla viral DNA hücreye girmiştir. Öbür yandan ^{35}S ile işaretlenmiş T2 ile enfekte edilen kültürde eğer radyoaktivite çökeltide ise viral proteinler hücreye girmiş, çözeltide ise girmemiş demektir. Deney sonuçları radyoaktivitenin çözeltide olduğunu yani viral proteinlerin

hücreye girmediğini göstermiştir. Çöktürülen hücreler gelişmeye bırakıldığında viral enfeksiyon devam etmiş ve yeni virüs parçacıkları üretilmiştir.

Hershey ve Chase bu sonuçları proteinlerin hücrenin dışında kaldığı için yeni virüs parçacıkları üretimine katılmadığı şeklinde yorumladılar. Öbür yandan DNA'nın hücre içine girdiği ve virüs çoğalmasını sağladığını göstermişlerdir. Böylece T2 fajında genetik materyalin protein değil DNA olduğu gösterilmiştir.

Avery ve arkadaşlarının çalışmaları ile beraber Hershey ve Chase'in yaptığı bu çalışma genetikçilerin çoğunu DNA'nın kalıttan sorumlu molekül olduğuna ikna etmiştir. Bu temel kabule dayanarak birçok araştırma yürütülmüş ve kalıtımın moleküler esasları belirlenmiştir. Bu çalışmalardan birisi çok net bir şekilde bütün genetik bilginin DNA üzerinde olduğunu göstermiştir. 1960 yılında Guthrie ve Sinsheimer bakteriyofaj ϕ X174 DNA'sını saflandırmışlar, bu saf virüs DNA'sını, hücre duvarı enzimatik olarak parçalanmış *E. coli* (protoplast) hücreleri ile karıştırmışlardır. Bu hücrelerde tam ϕ X174 virüs parçacıkları üretilmiştir. Sadece DNA'dan başlayarak tam bir virüs parçacığının oluşması virüsün bütün genetik bilgisinin DNA üzerinde olduğunu göstermiştir.

2.2.2 Ökaryotlarda dolaylı ve doğrudan kanıtlar

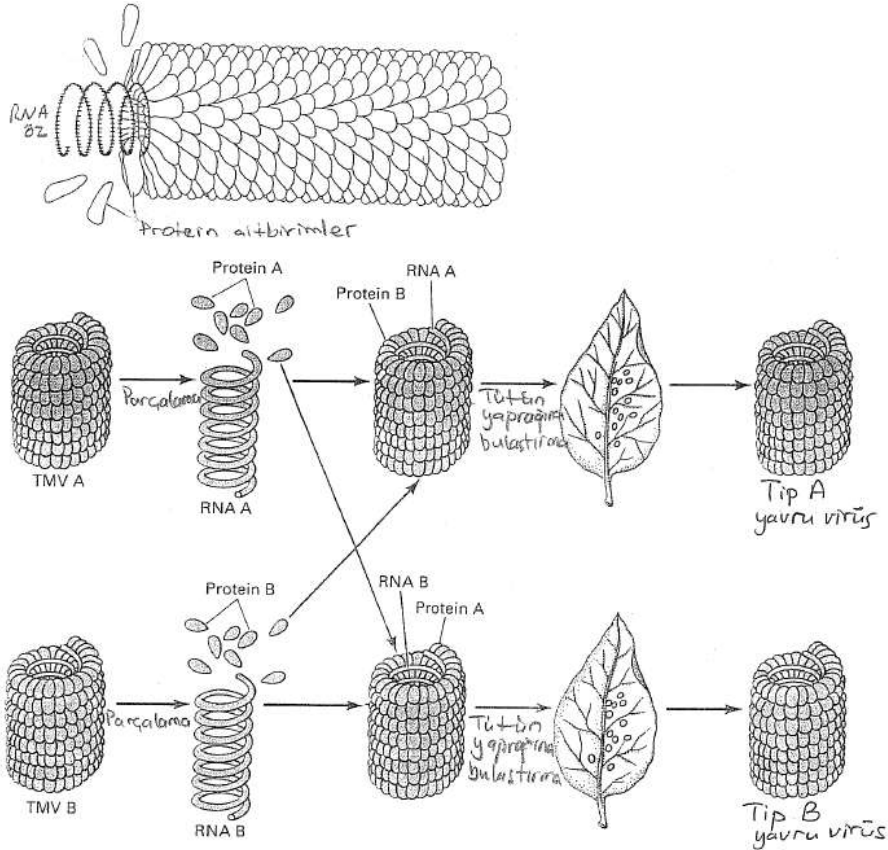
Yapılan bu deneyler prokaryotlar ve virüsler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. O zamanlarda ökaryotlarda doğrudan transformasyon gerçekleştirerek sonuçları gözlemek mümkün olmadığından DNA'nın kalıtsal materyal olduğuna ilişkin genellikle dolaylı deliller mevcuttu: Mutasyonlarla karakterler değişikliğe uğramaktadır, dolayısıyla mutasyonlar genetik materyali etkiliyor olmalıdır. En fazla mutasyon oranı 260 nm dalga boyunda sağlanır. Dolayısıyla 260 nm'de en fazla absorpsiyon yapan molekül etkileniyor ve mutasyona uğruyor demektir. 260 nm'de DNA ve RNA maksimum absorpsiyon gösterirken proteinler 280 nm'de maksimum absorpsiyon gösterir. Dolayısıyla mutasyona uğrayan ve genetik materyal olan molekül DNA veya RNA olmalıdır, protein olamaz.

Şu an için ökaryotlarda DNA'nın genetik materyal olduğuna itiraz için herhangi bir neden olmamakla beraber, rekombinant DNA araştırmaları doğrudan deliller de sağlar. İnsan insülin geni (insülin proteinini kodlar) klonlanarak *E.coli*'ye transfer edildiğinde bu organizmalara, sahip olmadıkları insülin proteini üretme yeteneğini kazandırır ve bu yetenek nesiller boyu kalıtlanır. Dolayısıyla bu özellik insülin geni tarafından kazandırılmıştır. Yine spesifik genlerin milyonlarca kopyası kurbağa *Xenopus leavis* oositlerine enjekte edilmiş ve bu oosit genomunda bulunmayan ilgili genlerin ürünlerinin üretildiği belirlenmiştir. Yine insan β globin geni (DNA) döllenen fare yumurtasına enjekte edilmiş ve gelişen fare normalde sahip olmadığı β globin proteinine sahip olmuş ve bu özellik yavrularına da aktarılmıştır. Bu fareler, genomuna dışardan gen veya genler eklenmiş organizmalar **transgenik** olarak adlandırılır. Yine ratların gelişme hormonu geni fare yumurtalarına nakledilmiştir, gelişen farelerin normal hemcinslerinden iki kat daha büyük oldukları ve bu özelliğin yeni nesillere aktarıldığı belirlenmiştir. Bütün bunlar ökaryotlarda da DNA'nın genetik materyal olduğunu ispatlamaktadır.

2.2.3 Genetik materyal olarak RNA

Bazı virüsler DNA yerine RNA içeren bir öz taşırlar. Bu durumda bu virüslerin genetik materyalinin DNA yerine RNA olması beklenebilir. 1956 yılında tütün mozaik virüsü (TMV)'nün saflandırılmış RNA'sı tütün yapraklarına muamele edilmiş, sonuçta normal virüs parçacığı gibi lezyonların oluştuğu belirlenmiştir. Bundan kısa bir süre sonra Frankel-Conrad ve Singer farklı bir deney gerçekleştirdiler (Şekil 2.4).

Bu araştırmacılar iki farklı tipteki TMV'nün (TMV A ve TMV B) örtü proteinlerini ve öz kısmındaki RNA'larını ayrı ayrı izole ettiler. TMV A'nın RNA'sı ile TMV B'nin örtü proteinlerini karıştırarak dış görünüş olarak TMV B'ye benzeyen ancak TMV A'nın RNA'sını taşıyan bir melez virüs elde ettiler. Bu melez virüs tütün yapraklarına bulaştırıldı. Yapraklar üzerinde tipik TMV lezyonları oluştu. Lezyondan yapılan izolasyonda yeni virüs parçacıklarının TMV B parçacıkları değil TMV A parçacıkları olduğu görüldü. Bu durumda TMV'nün RNA'sı yeni virüs parçacıkları için gerekli genetik bilgiyi sağlamıştır.



Şekil 2.4: a) Tütün mozaik virüsünün şematik yapısı, b) Frankel-Conrad ve Singer tarafından gerçekleştirilen RNA'nın TMV'nün genetik materyali olduğunu gösteren deneyin ana hatları.

Yine 1965 ile 1966'da Pace ve Spiegelma Q β fajının RNA'sının *in vitro*da replike edilebileceğini gösterdiler. Bu replikasyon Q β RNA replikaz denilen bir enzimin varlığına bağlıdır. *In vitro*'da çoğaltılan Q β RNA'sı *E. coli* protoplastlarına (hücre duvarı yok edilmiş hücreler) transfer edildiğinde enfeksiyon ve viral çoğalma gerçekleşmiştir. Böylece test tüpünde sentezlenmiş bir RNA molekülünün bu fajlar için genetik materyal olarak iş gördüğü gösterilmiştir.

3 NÜKLEİK ASİTLER: YAPI VE FONKSİYON

DNA'nın (istisna olarak RNA'nın) genetik materyal olduğunun belirlenmesinden sonra sadece yapı değil aynı zamanda replikasyon, depolama, ekspresyon ve mutasyon gibi işlevlerin nasıl gerçekleştirildiği ve yapı ile işlev arasındaki ilişkinin nasıl sağlandığına yönelik çalışmalar yoğunlaşmıştır. 1940'dan 1953'e kadar çok sayıda araştırmacı DNA yapısı ile ilgilenmişlerdir. Bu bilim insanları biyoloji tarihinin en önemli sorusunun cevabını bulmayı ümit etmişlerdir: DNA hayatsal süreçlerin işletilmesinde nasıl iş görür? Bu sorunun cevabının DNA'nın yapısında yattığına inanılıyordu. Sonunda Watson ve Crick (Williams ve Franklin'in de özellikle X-ray analizleri konusundaki katkılarıyla) 1953 yılında DNA'nın çift sarmal yapıda olduğu hipotezini ortaya attılar. Bu gün de bu model geçerlidir. DNA'nın genetik materyal olarak iş gördüğü anlaşıldıktan sonra DNA'nın özellikleri ve işlevleri üzerindeki araştırmalar artarak devam etmiştir.

3.1 Genetik Maddenin Fonksiyonları

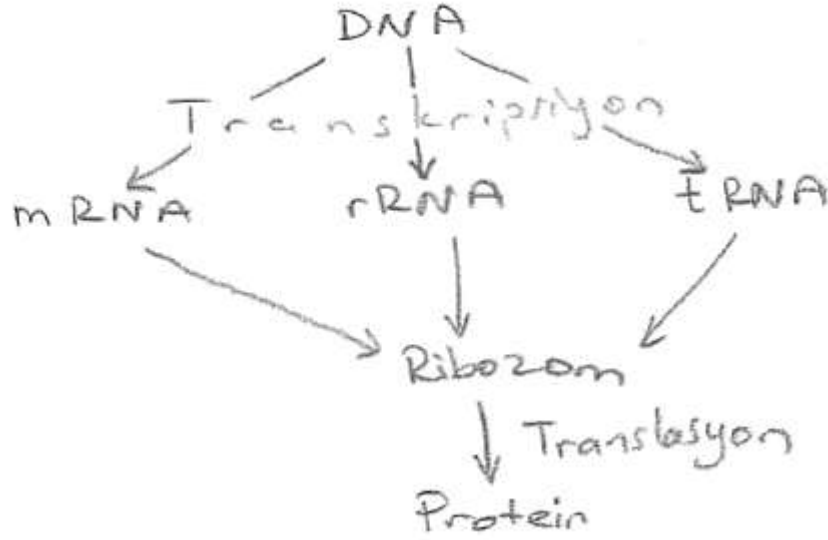
Genetik materyal birçok özellik ve fonksiyona sahiptir: Replikasyon, bilgi depolama, depolanmış bilginin ekspresyonu ve mutasyonlar yoluyla varyasyonlar oluşturma gibi.

Replikasyon, hücre bölünmesi sırasında genetik bilginin eşit dağılmasını sağlar (mitoz). Eşeyli üremede ise, iki bireyden gelen gametlerin birleşmesiyle oluşacak yeni bireyin ataları ile aynı miktarda genetik bilgiye sahip olmasını sağlamak için replikasyon sonrasında genetik bilgi yarıya indirilir (mayoz).

Depolama, ekspresyonu gerçekleştirilmeyen genetik bilgi olarak ifade edilebilir. Bir hücre taşıdığı bütün bilgiyi ifade etmez. Sözelimi sperm hücreleri tam bir haploit genetik bilgi takımına sahip olmasına rağmen bunun pek çoğunu kullanmaz yani depolar. Belli bir hücrede ifade edilen (ekspresyonu gerçekleştiren) ve ifade edilmeyen bilgi mevcuttur. Bu tercihin, (yani hangi bilginin ifade edileceği, hangisinin ifade edilmeyeceğinin) nasıl yapıldığının açıklanması amacıyla moleküler genetik ve gelişme genetiği alanlarında yoğun çalışmalar sürdürülmektedir.

Genetik madde içinde **depolanmış bilginin ekspresyonu** kompleks bir süreçtir ve hücrelerde bilgi akışını sağlar (Şekil 3.1). Transkripsiyon yaygın olarak 3 tip RNA sentezini gerçekleştirir. mRNA, tRNA ve rRNA. Bunlardan mRNA'daki bilgi translasyonla proteinlere dönüştürülür. Translasyon veya protein sentezi, çok sayıda molekülün, enerji kaynağının ve ribozomların dahil olduğu karmaşık bir süreçtir. Bu süreçte genetik bilgi mRNA tarafından taşınır (kodonlarda!), bu bilgiye uygun amino asitler tRNA tarafından taşınır (antikodonlar!).

Genetik materyal mutasyonlar yoluyla organizmalar arasında **yeni varyasyonlar oluşturulmasından** da sorumludur. Eğer DNA'nın yapısında bir değişiklik olursa bu transkripsiyon ve translasyona yansiyacak ve muhtemelen belli proteinleri etkileyecektir. Eğer bir mutasyon gametlerde ise gelecek nesillere aktarılacak ve popülasyonda yayılacaktır.

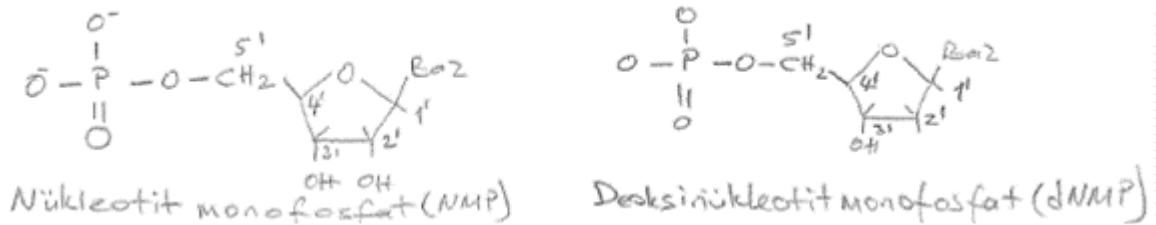


Şekil 3.1: Hücre içinde DNA, RNA ve proteinlerin dahil olduğu bilgi akışının şematik görünüşü.

Bundan sonraki bölümlerde DNA'nın kısaca yapısı, depolama, replikasyon, ekspresyon ve mutasyon işlevleri incelenecektir. Genetik bilginin depolanması, akışı ve değişimi odakta tutulacaktır.

3.2 Nükleotitler

Nükleotitler nükleik asitlerin temel birimleridir. Üç alt birimden meydana gelmişlerdir: azot içeren bir baz, bir beş karbonlu şeker ve bir fosforik asit grubu. Beş farklı baz molekülü değişken birimdir ve nükleotitlerin isimlendirilmesinde kullanılır. Pürinler: adenin (A) ve guanin (G); pirimidinler: sitozin (C), timin (T) ve urasil (U). Urasil RNA'da timinin yerini alır. Nükleotitlerin yapısında iki farklı şeker molekülü vardır: riboz ve deoksiriboz. Riboz RNA'nın deoksiriboz DNA'nın yapısında yer alır (Şekil 3.2). Fosfat grupları her iki nükleik asitin de yapısında yer alır.



Şekil 3.2: DNA ve RNA yapısına katılan nükleotit monofosfatların molekül yapısı.

Şeker molekülünün 1' pozisyonuna bir baz bağlanır. P grubu ise 5' pozisyonuna bağlanır. İki nükleotidin birleşme pozisyonları ise birinin 3'OH ve diğerinin 5'P pozisyonlarıdır. Bir şeker molekülüne bir baz bağlandığında yapı nükleosit, bu yapıya fosfat bağlandığında nükleotit adını alır. Nükleotitler taşıdıkları şeker molekülü tipine ve fosfat grubu sayısına göre isimlendirilirler: dNMP, dNDP, dNTP, NMP, NDP ve NTP. Nükleotitler birbirlerine 3'OH ucu ile 5'P ucu arasında meydana gelen fosfodiester bağlarıyla bağlanırlar. Bu şekilde bağlanmalar sonucu oluşan uzun zincirlere polinükleotitler denir.

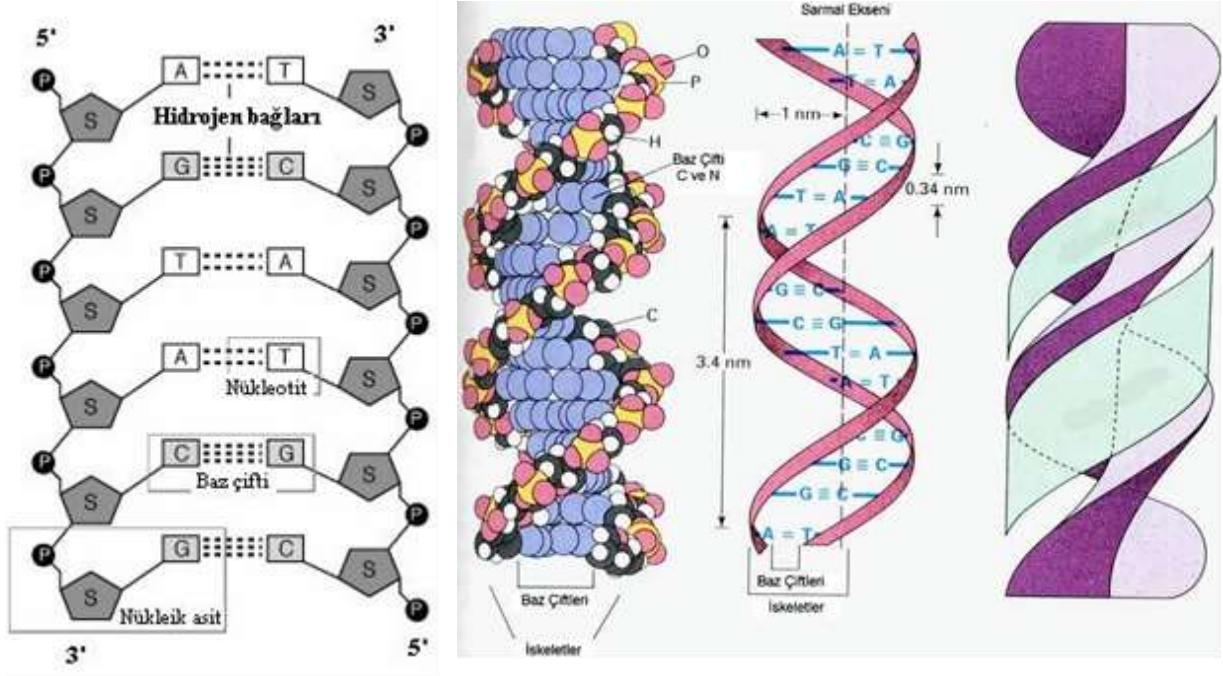
1000 nükleotit uzunluğunda bir polinükleotit 4^{1000} farklı şekilde dizilebilirler! Bu muazzam farklılık potansiyeli hücrenel aktiviteleri yönetmek için gerekli büyük miktardaki bilgiyi depolama kapasitesi sağlar.

3.3 DNA'nın Fiziksel Yapısı

Bir DNA molekülü iki polinükleotit zincirden meydana gelmiştir. Bu zincir sağ yönelimli (saat yönünde) bir çift sarmal yapı oluşturur. Sarmalın çapı 2 nm'dir. Zincirler antiparalel ve komplementerdir (Bir zincir 5'-3' diğeri 3'-5' yönünde). Şeker fosfat omurgası sarmalın dış kısmını oluştururken bazlar iç kısımda omurgaya dik bir şekilde üst üste dizilmişlerdir, ancak her baz 36° lik bir açı ile kıvrılma gösterirler. Merkezde konumlanmış olan bazlar hidrojen bağlarıyla birbirlerine tutunur (Şekil 3.3). Hidrojen bağları iki spesifik (komplementer) baz arasında oluşabilir: bir pürin ile bir pirimidin arasında yani A:T ve G:C arasında. Baz çiftleri (bç) DNA molekülü içinde birbirinden 0.34 nm uzaktadır. Aralarındaki 36° lik açı düşünülürse 10 baz çifti (bç) bir sarmalı tamamlar dolayısıyla bir sarmalın uzunluğu 3,4 nm'dir. Bazların bu özel bağlanış tarzı, iki şeker omurgasının eşit şekilde kıvrılmasını engeller, orantısız bir kıvrılma şeklinin oluşmasına neden olur. Bu orantısız kıvrılma nedeniyle bir birim sarmalda iki eşit olmayan oyuk oluşur. Bu oyuklardan biri büyük oyuk diğeri de küçük oyuk olarak adlandırılır. Bu oyuklar proteinlerin DNA ile temas kurma noktalarıdır.

Ayrıntılı DNA yapı araştırmalarında farklı şartlar altında DNA'nın fiziksel yapısında farklılıkların oluştuğu ve buna bağlı olarak farklı DNA formlarının oluştuğu belirlenmiştir. Yukarıda tanımlanan DNA yapısı **B-DNA formu** yapısıdır. Hücrenin çoğu fizyolojik şartlarında B-DNA formu oluşur. Nemlilik arttıkça B-DNA oluşur, nemlilik azaldıkça **A-DNA formu** denilen diğeri bir formun oluştuğu bilinir. A ve B DNA sağ yönelimli (saat yönünde) sarmallardır. Diğeri tip DNA formları da belirlenmiştir. Bunlar arasından en dikkat çeken **Z-DNA formu**dur. Şeker omurgasının zikzaklı bir yapıda olması nedeniyle Z-DNA ismi verilmiştir. Z-DNA, A-DNA ve B-DNA'nın aksine sol yönelimli (saat yönünün tersine) bir çift sarmaldır.

Çözelti içinde (*in vitro*'da) DNA genellikle B-DNA formundadır. Hücrede de muhtemelen B formu yaygındır. A formu dehidratasyon şartlarında oluştuğu için hücrelerde önemli uzunlukta DNA bölgeleri olarak temsil edilme olasılığı zayıftır. Z-DNA'nın hücrede varlığı uzun süredir tartışma konusu olmaya devam etmektedir. *Drosophila*, insan, buğday ve bakteri hücrelerinde Z-DNA'yı stabilize eden Z-DNA bağlayıcı proteinlerin varlığı hücrede Z-DNA'nın varlığını destekleyici yöndedir.



Şekil 3.3: DNA zincirlerinin yönü ve çift sarmal yapısı

3.4 DNA'nın Kromozomlarda Organizasyonu

DNA kromozomlar içinde nasıl organize olur? Ökaryotların kromozomları prokaryotlarınkinden çok daha karmaşıktır. Ökaryotik kromozomlar DNA ve proteinlerin (bazen RNA'nın) oluşturduğu oldukça düzenli kompleksler olup, kromozom fonksiyonunda önemli rolleri olan sentromer ve telomer bölgelerini de içerir. Bir organizmanın genleri uzun DNA moleküllerinin belli bölgeleridir. DNA'nın kromozomlar içinde nasıl organize olduğunu bilmek gen ekspresyonunun nasıl gerçekleştiğini anlayabilmek için gereklidir.

3.4.1 Bakteriyel kromozomlar

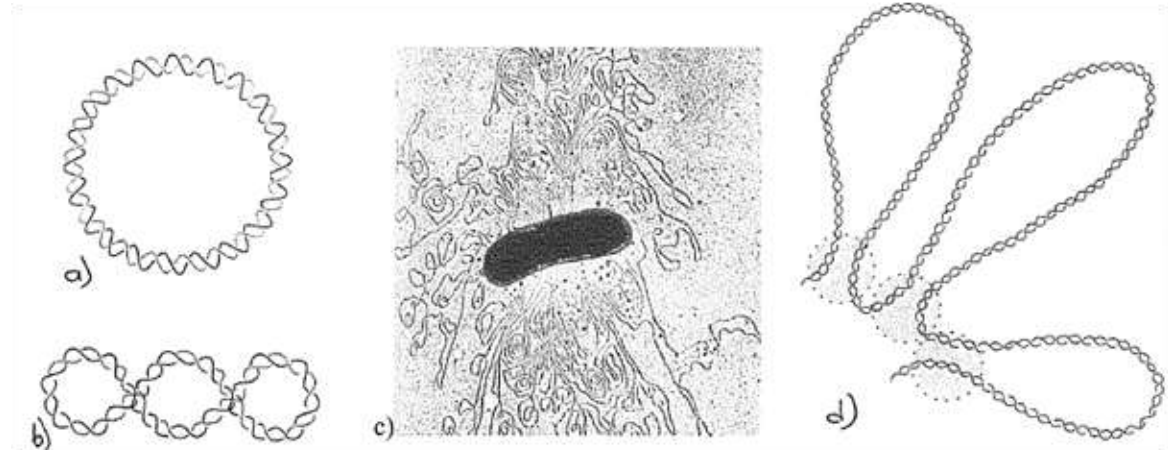
Tipik bir bakteri olan *Escherichia coli*'nin kromozomu oldukça kıvrılmış çift zincirli halkasal tek bir DNA molekülüdür ve yaklaşık 1100 μm (1.1 mm) (4.1×10^3 kb) uzunluğundadır. Organizmanın, çoğu doğal şartlar altında varlığını sürdürebilmek için gerekli genlerin tamamını içerir. Bu kromozom, içinde bulunduğu hücrenin ortalama bin katı daha uzundur. Buna rağmen hücrenin merkez kısmına sığdırılır.

Halkasal yapıdaki kromozom hücrede iki formda bulunur: normal halkasal form ve süper sarılı form. Normal **halkasal form** çift sarmal bir DNA molekülünün, uç kısımlardan bağlanarak halkasallaşmış halidir. **Süper sarılı form** ise bu halkasal yapının tekrar kendi üzerinde sarılmasıyla oluşur. Süper sarılma iki şekilde olabilir: Negatif süper sarılma ve pozitif süper sarılma. Negatif süper sarılda, süper sarılma yönü B-DNA'nın sağ yönelimli sarılmasının tersi yönde, yani sol yönelimlidir. Pozitif süper sarılda ise süper sarılma yönü B-DNA ile aynı yöndedir yani sağ yönelimlidir. Sonuç olarak *E. coli* kromozomu halkasal, yoğun olarak negatif süper sarılı oldukça sıkı bir yapıdır (Şekil 3.4a, b, c).

Süper sarılma tipi ve miktarı **topoizomeraz** enzimleri tarafından belirlenir. Topoizomeraz II (DNA giraz) halkasal DNA'nın süper sarılı forma dönüştürülmesini gerçekleştirir. Topoizomeraz I ise negatif süper sarılı DNA'yı normal halkasal forma dönüştürür.

E. coli hücreleri parçalandığında DNA'nın halka alt birimler şeklinde organize olduğu görülür. Bu halkaların oluşmasında ökaryotların histonlarına benzer bazık (pozitif yüklü) proteinlerin rol aldığı düşünülür. Yapılan çalışmalarda *E. coli* hücrelerinde (kromozoma bağlı halde değil!) histon benzeri bazı proteinlerin (HU ve H) mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu bilgilerden hareketle *E. coli* kromozomunun yapısını açıklamak üzere bir model geliştirilmiştir. Bu modele göre tek bir halkasal DNA molekülünden ibaret olan kromozom, birbirine bitişik 100 bağımsız halka şeklinde düzenlenmiştir, her halka yaklaşık 40 kb büyüklüktedir. Her halkanın uçları tahminen (!) proteinler tarafından birbirine tutturulur (Şekil 3.3c, d). Bu halkalardan her birinin topolojik formu (halkasal veya süper sarılı) diğerinden bağımsız olarak belirlenir. Dolayısıyla tek bir DNA molekülü olan kromozom belli bölgelerinde süper sarılı iken diğer bölgelerinde normal halkasal formda olabilir.

Ana kromozoma ek olarak bakteri hücrelerinde kromozomdan çok küçük, çift zincirli halkasal DNA molekülleri de vardır. Bu moleküller **plazmid** olarak adlandırılır. Plazmidler süper sarılı formdadırlar ve kromozomdan bağımsız olarak (otonom) replike olurlar. Doğal şartlarda bakteri hücresel DNA'sının %1-2'sini plazmidler oluşturur. Plazmidler, antibiyotik direnç genleri ve toksin genleri gibi hücrenin önemli fenotiplerini oluşturan genleri de taşırlar.



Şekil 3.4: *E. coli*'de kromozom organizasyonu. a) halkasal, b) süper sarılı formlar, c) hücreden dışarı çıkmış kromozom halkaları ve d) muhtemel halkalanma modeli.

Virüslerde kromozomlar çift zincirli halkasal veya doğrusal DNA, tek zincirli halkasal DNA, ya da tek veya çift zincirli RNA'dan meydana gelebilir. Bakteriyofaj lambda (λ) çift zincirli doğrusal bir DNA molekülünden ibaret bir genomu sahiptir, genom herhangi bir proteinle kompleks oluşturmaz. Kromozomun her iki ucu tek zincirlidir. Bu tek zincirli uçlar birbirinin komplementeridirler (yapışkan uçlar). Bu uçlar eşleşir ve DNA ligaz tarafından bağlanır. Uçların bağlandığı bu bölge *cos* olarak adlandırılır. *cos* dizileri yardımıyla halkasallaşan lambda genomu (çift zincirli DNA) *E. coli* kromozomuna integre olabilir. (Bu olaya lizojeni denir). Lambda genomunun *E. coli* genomundan ayrılmasıyla

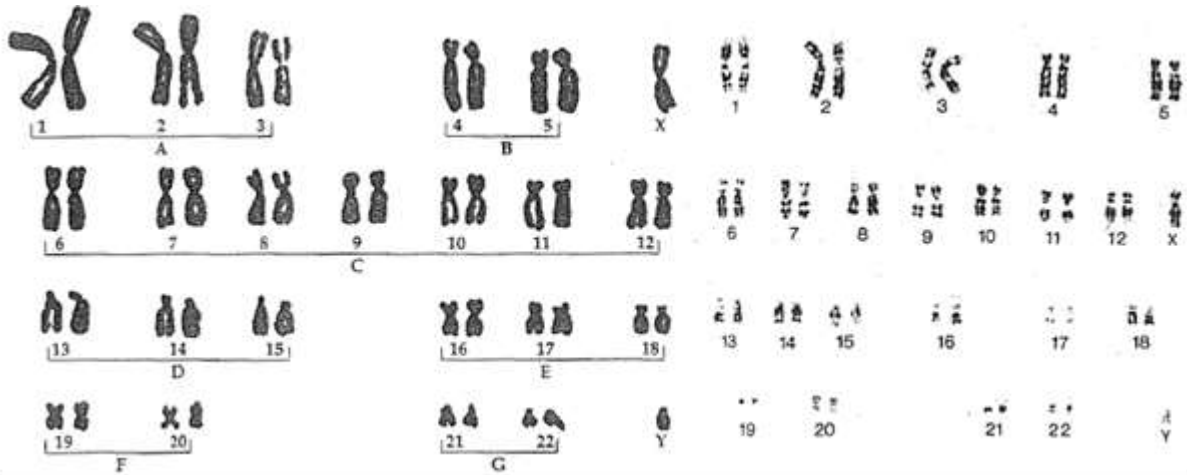
beraber litik döngü başladığında, halkasal λ genomundan konkatamerler oluşturulur. **Konkatamerler** çok sayıda birim lamda genomundan oluşan uzun DNA molekülleridir. Konkatamer DNA üzerinde, birim genomlar arasında *cos* bölgeleri vardır. Lamda genomundaki *ter* bölgesi denilen bir DNA bölgesinden kodlanan bir enzim yardımıyla *cos* bölgeleri kesilerek konkatamer DNA'dan birim genomlar oluşturulur. Birim genomlar yeni virüs parçacıkları içine paketlenir.

3.4.2 Ökaryotik kromozomların yapısal özellikleri

Ökaryotik organizmaların hemen bütün vücut hücrelerinde diploit sayıda kromozom mevcuttur. İnsanın kromozom sayısı 46'dır. Bu sayı diploit (2N) sayıyı ifade eder. Bu kromozom takımlarından biri (N, 23 kromozom) yumurtadan, diğer takım (N, 23 kromozom) da spermden gelir.

Karyotip bir hücredeki metafaz kromozomlarının tam takımıdır (mitoz metafaz, 2N). Metafaz kromozomları sayı, şekil ve büyüklük bakımından önemli farklılıklar gösterirler. Dolayısıyla karyotip türe özeldir. Bir erkek insanda karyotip 46 kromozomdan oluşmuştur: 22 çift otozom, bir X ve bir de Y kromozomu (Şekil 3.5). Geleneksel olarak otozomal kromozom çiftleri büyüklüklerine göre sıralanır ve numaralandırılırlar. (İnsan genom projesi verilerine göre bu büyüklük sıralamasında değişikliklerin olduğu belirlenmiştir, fakat numaralandırma değiştirilmemiştir). Erkeklerde eşey kromozomları farklı kromozomlar (X ve Y) oldukları için kromozom boyunca tam bir eşleşme gerçekleşmez. Benzer morfolojiye sahip kromozomlar gruplandırılarak gruplar A'dan G'ye doğru isimlendirilmişlerdir.

Kromozomlar özel boylarla boyandığında spesifik bandlanma özellikleri gösterirler ve birbirlerinden bu bandlanma özellikleriyle kolayca ayırt edilebilirler. Bu boyama tekniklerinden birisi **G bandlanması** olarak adlandırılır. Bu teknikte metafaz kromozomları Giemsa boyası ile boyanır. G bandları denilen koyu bölgeler oluşur. G bandları adenin ve timince zengin DNA bölgelerini ifade eder. İnsan metafaz kromozomlarında 300 civarında G bandı gözlenebilmektedir. Bandlanmalar oluşturmak üzere boyama yapmanın iki amacı vardır. Bunlardan birisi sitolojik analizlerde kromozomları birbirinden ayırt etmektir. Diğerisi ise oluşmakta olan bandları kromozomlar üzerinde belli genlerin konumlarını ifade etmek üzere kullanmaktır.



Şekil 3.5: Bir erkek insan bireyinde karyotip. Sağda G bandlanması.

İlk bakışta daha kompleks organizmalarda DNA miktarının daha çok olacağı tahmin edilebilir. DNA miktarını ifade etmek üzere C değeri kavramı kullanılır. Haploit bir genomu oluşturan toplam DNA miktarı **C değeri** olarak bilinir ve her tür için karakteristiktir (Tablo 3.1). Buna rağmen C değerleri organizmalar arasında önemli oranda farklılıklar gösterir. Akraba organizmalar arasında DNA miktarlarında önemli farklar olabilir veya olmayabilir. Yine organizmaların C değerleri ile yapısal veya organizasyonel kompleksliği arasında doğrudan bir ilişki yoktur. Bu olay **C değeri açmazı** olarak adlandırılır.

Tablo 3.1: Bazı organizmalarda baz çifti sayısından hesaplanmış C değerleri.

Organizma	Genom büyüklüğü (bp)	Uzunluk (10bp=0.34 nm)
<i>Escherichia coli</i>	4.10×10^6	1.4 mm
<i>Salmonella typhimurium</i>	1.10×10^7	3.8 mm
Lamda virüsü	4.65×10^4	16 μ m
T2 fajı	1.75×10^5	60 μ m
İnsan	3×10^9	101 cm
Fare	2.20×10^9	75 cm
Kurbağa	2.25×10^{10}	7.7 m
<i>Drosophila melanogaster</i>	1.75×10^8	6 cm
<i>Lilium longiflorum</i>	3.00×10^{11}	100 m
<i>Zea mays</i>	2.70×10^9	93 cm
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1.75×10^7	6 mm

3.4.3 Ökaryotik kromozomların moleküler yapısı

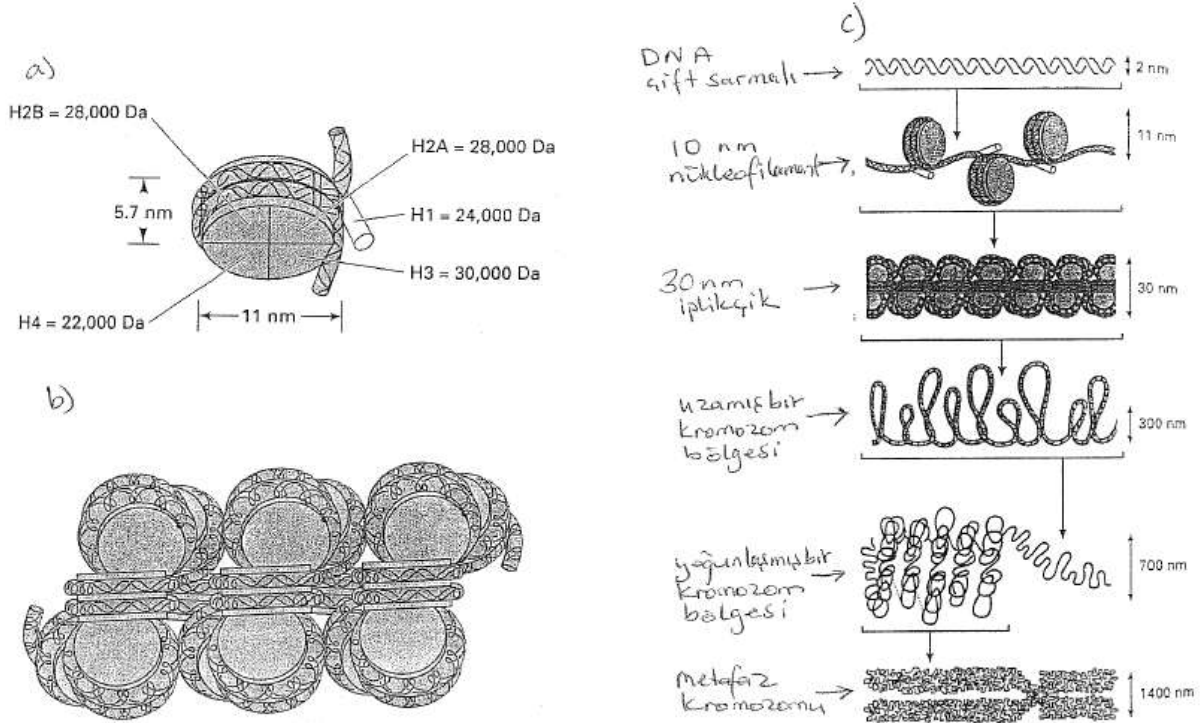
Ökaryotik hücrelerde prokaryotlardakinden çok daha fazla miktarda DNA vardır. Bir insan hücresi *E. coli* hücresindeki bin katından daha fazla DNA taşır. *E. coli* hücresi 4.1×10^6 bp DNA taşırken bir diploit insan hücresi 6×10^9 bp DNA taşır. Sıkı bir şekilde sarılmaksızın kromozomlardaki (46 kromozom) DNA'lar ucuca eklenseydi bu DNA'yı içine alacak hücrenin uzunluğunun 200 cm olması gerekirdi.

Her ökaryotik kromozom doğrusal, bütün, çift zincirli bir DNA molekülünden meydana gelmiştir ve taşıdığı DNA miktarının iki katı proteine sahiptir. Kromozom, DNA, kromozomal proteinler ve RNA'nın oluşturduğu bir kompleks yapı olup **kromatin** olarak adlandırılır. İki tip kromatin bölgesi vardır: Ökromatin ve heterokromatin bölgeleri. **Ökromatin** bölgeleri açık renkli boyanırlar, interfazda açılırlar ve mitozda yoğunlaşırlar. Genomun çoğu ökromatin şeklindedir. **Heterokromatin** bölgeleri ise koyu boyanırlar, çok yoğun şekilde sarılmış bölgelerdir. Ökromatin bölgeleri genetik olarak aktif, yani ekspresyonu gerçekleşen genlerin bulunduğu bölgelerdir. Heterokromatin bölgeleri ise genetik olarak inaktif bölgelerdir. Bu bölgeler ya genleri içermezler yada içerdikleri genlerin ekspresyonu yapılmaz.

DNA ile kompleks oluşturan iki tip protein vardır: histonlar ve histon olmayan (nonhiston) proteinler. Histon proteinleri bazik proteinler olup yapılarında bulunan li-

zin ve arjinin amino asitlerinin NH₂ gruplarıyla DNA etkileşir. Farklı tip histon proteinleri vardır. Nonhiston proteinler ise yapıya katılabilir veya enzimatik olarak rol alabilirler.

DNA'nın çekirdekte paketlenmesi birkaç kademede gerçekleştirilir. Bu paketleme sonucu santimetrelerce (insanda ~200 cm) uzunluktaki DNA birkaç mikrometrelik çekirdeğe sığdırılır. İlk paketleme seviyesi, sekiz alt birimden oluşan histon oktameri etrafında yaklaşık 147 bp DNA'nın iki tur ile negatif olarak sarılmasıdır. Bu yapı **nükleozom** adını alır (Şekil 3.6a). İki nükleozom arasında yaklaşık 38-53 bp DNA yer alır. Dolayısıyla her nükleozoma 185-200 bp kadar DNA sarılır. Nükleozomlar 10 nm'dir. Elektron mikroskobunda bir tele dizili boncuklar şeklinde görülürler ve bu yapı **10-nm nükleofilament** adını alır. Nükleozom yapılarıyla DNA 7 kat kısaltılabilir. Bundan sonraki paketleme seviyesi **30-nm kromatin iplikçığı** seviyesidir. Bu sarılma seviyesinde 10-nm nükleofilament kendi üzerinde sarılır. Her altı nükleozom bir dönüş tamamlar ve **sole-noid** de denilen 30 nm kromatin iplikçığı oluşur (Şekil 3.6b). Sonra bu 30-nm iplikçikler büyük halkalar oluşturacak şekilde düzenlenirler. Bir insan kromozomunda yaklaşık 2000 halka oluşabilmektedir. Bu halkalı yapı tekrar kıvrılarak yoğunlaşır ve bu yoğunlaşma tamamlandığında metafaz kromozomu oluşur. Ayrıca histonlar dışında iskele (scaffold) proteinleri denilen proteinler tipik kromozom morfolojisini veren bir iskelet oluştururlar. Bu iskeletin yeterli kısalmayı sağlamak için gerekli olduğu kabul edilir (Şekil 3.6c).

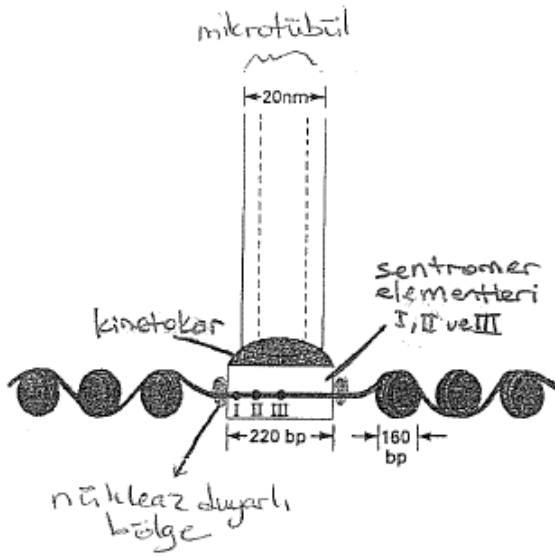


Şekil 3.6: a) Bir nükleozom, b) altı nükleozomun oluşturduğu 30-nm kromatin iplikçığı, ve c) kromozom paketlenme seviyeleri.

3.4.4 Sentromerler ve telomerler

Kromozom boyunca kromozom yapısı kesintisiz devam etmez. Kromozomların davranışını doğrudan etkileyen iki bölge mevcuttur: Sentromerler ve telomerler.

Sentromer bir kromozomun daralmış bir bölgesidir. Bu bölgede sarılma tam olarak tamamlanmamış durumdadır. Hücre bölünmesi sırasında iğ iplikçiklerinin bağlandığı bölgedir. En iyi bilinen sentromer bölgelerinden biri *Saccharomyces cerevisiae* kromozomlarının sentromeridir. Bu organizmanın sentromer bölgesi incelendiğinde nükleotit dizileri bakımından fark gösteren üç bölge mevcuttur: I, II ve III bölgeleri. I ve III bölgelerinin dış tarafına yakın nükleaz duyarlı bölgeler mevcuttur. İğ ipliklerinin sentromere bağlanmasında nükleaz duyarlı bu bölgeler arasında kalan I, II ve III bölgelerini de içeren 220 bp uzunluğunda bir bölge görev alır. Bağlanmanın mekanizması için önerilen bir model aşağıdaki Şekil 3.7’de özetlenmiştir.



Şekil 3.7: Maya kromozomunun sentromer ve sentromere bitişik bölgeleri.

Telomerler doğrusal kromozomların uç kısımlarıdır. Replikasyon için ve kromozomun stabilitesi için gereklidir. Telomer bölgeleri kromozom uçlarının diğer kromozomların uçlarıyla birleşerek kromozom mutasyonlarının oluşmasını engeller. Belli bir türde mevcut telomer bölgeleri iki tip dizi oluştururlar. Bunlardan birisi basit telomerik dizilerdir. Bu diziler kromozomun en ucunda bulunan peş peşe tekrarlayan diziler olup türe özeldirler (Tablo 3.2). Diğer telomer ilişkili diziler olup kromozomun ucuna yakındırlar fakat uca ulaşmazlar. Bunlar daha uzun ve kompleks dizilerdir.

Tablo 3.2: Ökaryotlarda peş peşe tekrarlayan bazı telomerik diziler

Organizma	Dizi (5'-3')
<i>Tetrahymena</i> (siliat)	TTGGGG
<i>Trypanosoma</i> (flagellat)	TTAGGG
İnsan	TTAGGG
<i>Arabidopsis</i> (çiçekli bitki)	TTTAGGG

3.4.5 Ökaryotik kromozomlarda tek (emsalsiz) ve tekrarlayan DNA dizileri

Prokaryotik ve ökaryotik genomlar incelendiğinde üç farklı dağılım tipi gösteren DNA dizisi belirlenmiştir:

1. **Emsalsiz (tek) diziler** genomda bir veya birkaç kopya halinde temsil edilen dizilerdir.
2. **Orta derecede tekrarlayan diziler** genomda birkaç ila 10^3 - 10^5 defa tekrarlayan diziler.
3. **Çok sayıda tekrarlayan diziler** 10^5 - 10^7 defa tekrarlayan diziler.

Prokaryotik genomlar ribozomal RNA genleri, transfer RNA genleri ve diğer birkaç dizi hariç tutulursa tamamen emsalsiz dizilerden oluşur. Ökaryotlarda ise hem emsalsiz hem de tekrarlayan diziler oldukça komplekstir. İnsan genomunun %64'ü emsalsiz dizilerden, %25'i orta derecede tekrarlayan dizilerden ve %10'u çok sayıda tekrarlayan dizilerden oluşur. Bu oranlar su kurbağasında sırasıyla %22, %67 ve %9'dur. Çoğu proteini kodlayan diziler (genler) emsalsiz DNA dizileri grubuna girer, ancak herhangi bir proteini kodlamayan emsalsiz diziler de vardır.

Tekrarlayan DNA dizileri genom içinde peşpeşe (yan yana) veya ayrılmış durumda olabilir. **Peşpeşe tekrarlayan diziler** oldukça yaygındır. Buna tipik örnek rRNA ve tRNA genlerinin ökaryotik kromozomlardaki temsil sayısıdır. rRNA genlerinin karakurbağasında 450, insanda 160-200 ve bezelyede 3900 kopyası mevcuttur. Histon genleri de tekrarlayan dizilere örnektir. Peşpeşe veya ayrılmış olarak mayada 2, *Drosophila*'da 100, karakurbağasında 25 ve insanda 5-20 kopya halinde bulunur. Son olarak peşpeşe tekrarlayan dizilere örnek herhangi bir geni kodlamayan sentromer ve telomer bölgele-
rindeki DNA dizileri verilebilir. Her bir sentromerde yüzlerce hatta binlerce defa tekrarlayan kısa diziler vardır.

Ayrılmış tekrarlayan diziler için multigen familyası genleri (aynı fonksiyonu gören fakat farklı yapıda olan proteinleri kodlayan genler) ve histon genleri örnek verilebilir. Multigen familyasına ait α -globin geni 3 kopya halinde 16. kromozom üzerinde iken β -globin geni 5 kopya halinde 11. kromozom üzerindedir. Diğer bir tipik ayrılmış tekrarlayan dizi transpozonlardır. Kromozom üzerinde bir bölgeden diğerine yer değiştirirler. Çoğu ökaryotta genom, muhtemelen herhangi bir kodlama görevi olmayan milyonlarca defa tekrarlayan ayrılmış diziler taşır. Bu diziler iki grupta toplanır: Kısa ayrılmış tekrarlayan diziler (SINE) 100-300 bp büyüklüğündedir. 1000-5000 bp veya daha uzun ayrılmış tekrarlayan diziler (LINE) de diğer bir grubu oluşturur. Bütün ökaryotik organizmalarda her iki grup tekrarlayan diziler de mevcuttur. *Drosophila* ve kuşlar genellikle LINE, insan ve kurbağalar SINE dizilerine sahiptirler.

4 DNA REPLİKASYONU

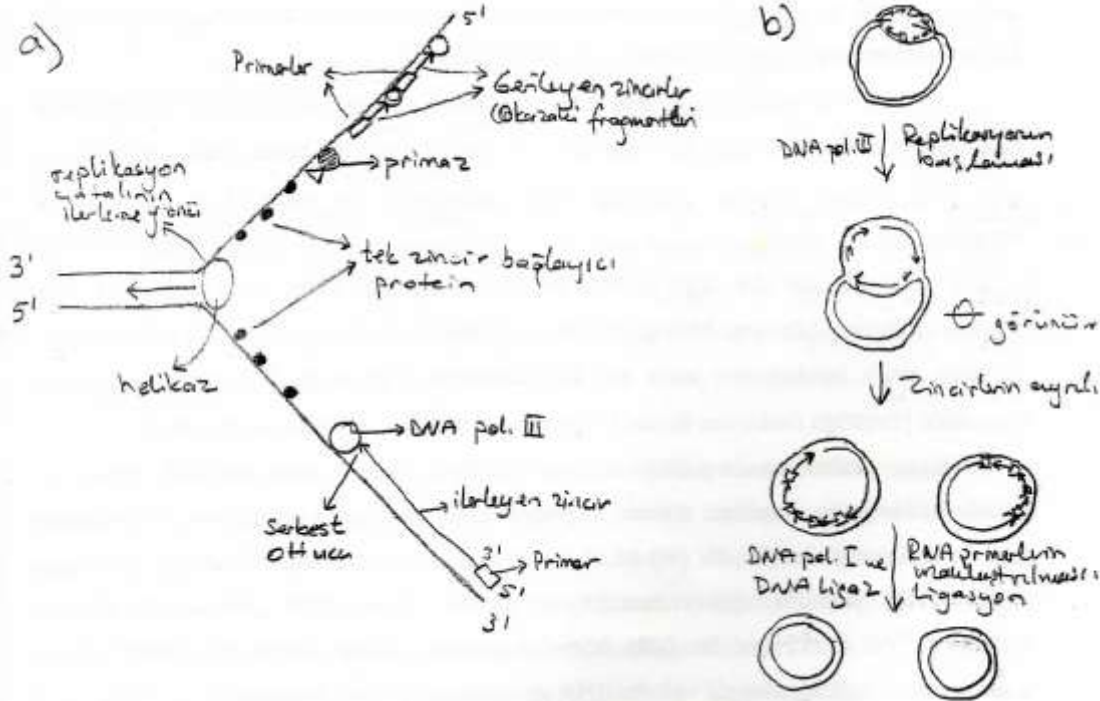
Yavru hücrelere ata hücrelerdeki kadar DNA sağlayabilmek için hücre bölünmesinden önce DNA'nın replike olması ve dolayısıyla kromozomların iki katına çıkması gerekir. Bu gün için DNA replikasyonu mekanizması oldukça açık bir şekilde aydınlatılmıştır. 1958 yılında M. Meselson ve F. Stahl *Escherichia coli*'de DNA replikasyonunun yarıkorumalı (semikonsevatif) olarak gerçekleştiğini gösteren deneyler yapmışlardır. Daha sonra bütün organizmalarda DNA replikasyonunun yarıkorumalı bir şekilde gerçekleştiği anlaşılmıştır. Yarıkorumalı replikasyon sırasında genetik bilgi bir hücreden diğerine aktarılır. Eşeyli üreyen organizmalarda, eğer bölünen hücre eşey hücresi ise bu durumda genetik bilgi yeni nesillere aktarılır. Her durumda (mitoz veya mayoz) eski zincir kalıp olarak kullanılarak yeni bir zincir sentezlenir. Bu sentezin esası kalıp olarak kullanılan zincir üzerindeki bazların komplementelerinin yeni zincire eklenmesidir. Bu işlem tam bir doğrulukta yapıldığında genetik bilgi eksiksiz bir şekilde (daha doğru ifade hemen hemen eksiksiz!) aktarılmış olur.

4.1 Prokaryotlarda DNA Replikasyonu

Prokaryotların hemen tamamı halkasal genoma sahiptirler. Halkasal prokaryotik genomlar teta (θ) modeli denilen bir replikasyon mekanizmasına sahiptirler. Bir model sistem olarak *E. coli*'nin replikasyon mekanizması incelenebilir. Bu bakteride replikasyonun başlayabilmesi için **başlatıcı protein** denilen bir proteinin bağlanabileceği yaklaşık 245 bp uzunluğunda bir **replikasyon orijinine** ihtiyaç vardır. Başlatıcı proteinle beraber **DNA helikaz** da bu bölgeye bağlanarak iki zincirin birbirinden her iki yönde ayrılmasını sağlar (çift yönlü replikasyon). Birbirine ters yöndeki bu iki ayrılma bölgesine **replikasyon çatalı** denir. **Tek zincir bağlayıcı proteinler** bir replikasyon çatalındaki ayrılmış zincirleri tek olarak tutar, yani tekrar eşleşmeyi engeller. Her bir zincir yeni sentezlenecek zincir için kalıp görevi görür. Kalıp zincirleri kullanarak onların komplementelerini sentezleyen enzim **DNA polimeraz III** enzimidir. Ancak DNA polimeraz yeni bir DNA zincirinin sentezini başlatamaz; dNTP'ları 5'P uçlarından uzamakta olan bir zincirin 3'OH uçlarına **tek tek** bağlayabilir.

Zincirler açıldıktan sonra **RNA primaz** açılan DNA bölgesine komplementer olan, yaklaşık 10 baz uzunluğunda bir **RNA primer** sentezler. RNA yapısında olan bu primerin ucunda sağlanan 3'OH uçlarına dNTP'lar tek tek DNA polimeraz III tarafından bağlanır. Kalıp zincirlerin yönü, yeni zincirin kesintili veya kesintisiz sentezini gerektirir (Şekil 4.1a). Bir replikasyon çatalında 3'-5' kalıp zinciri üzerinden sürekli bir DNA zinciri sentezlenir ve sentezlenmekte olan bu yeni zincire **ilerleyen zincir** denir. Ancak 5'-3' kalıbından kesintili bir sentez gerçekleştirilmek durumundadır ve bu kalıp üzerinden sentezlenen yeni zincire **gerileyen zincir** adı verilir. Replikasyon çatalı ilerledikçe yeni primerler sentezlenerek ilerleme yönünün tersine doğru parçalar halinde sentez gerçekleştirilir. Bu parçalar bazen **Okazaki fragmentleri** olarak adlandırılır.

Halkasal kromozomda **replikasyon terminasyon bölgesi** vardır. Her iki replikasyon çatalı bu replikasyon terminasyon bölgesinde birleşir. Ancak bu arada diğer bazı enzimatik olayların da gerçekleşmesi gerekir. Bunlardan biri yeni sentezlenen zincirde doğruluk kontrolüdür (Şekil 4.1b). Yanlış düzeltme fonksiyonu sentezin hemen arkasından **DNA polimeraz III** tarafından gerçekleştirilir. Bir diğer enzim **DNA polimeraz I** yeni zincir üzerindeki RNA primerleri uzaklaştırarak yerine DNA nükleotitlerini ekler. Parçalar halinde yeni zincirin birleştirilmesi **DNA ligaz** tarafından gerçekleştirilir.



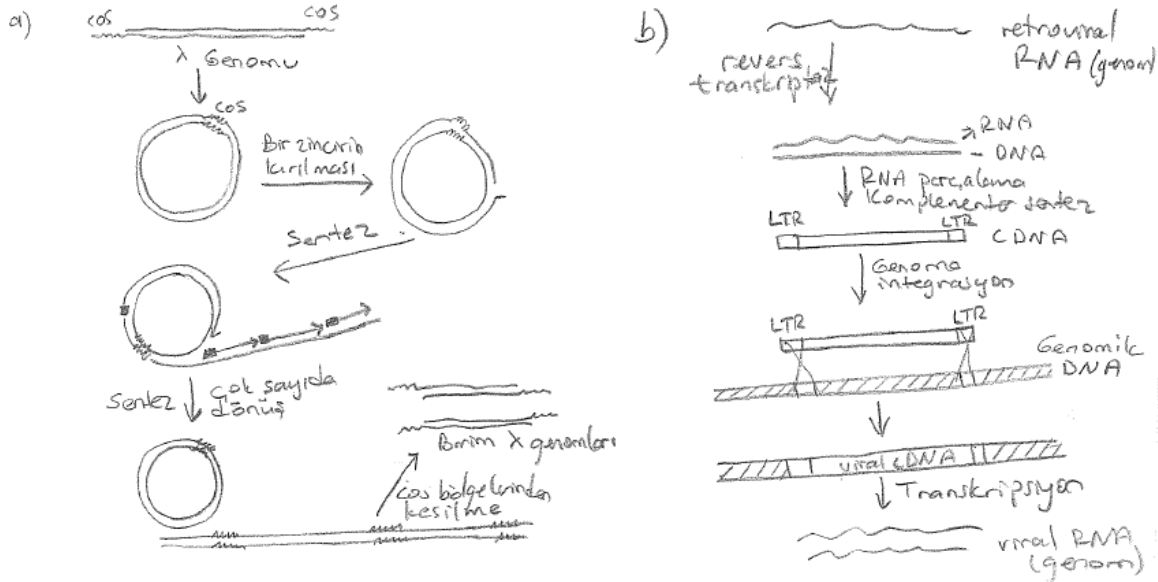
Şekil 4.1: a) Bir replikasyon çatalında meydana gelen olaylar. b) θ modeli ile replikasyonun genel akışı.

Burada vurgulanması gereken diğer bir konu DNA replikasyonunun hızıdır. *E. coli* kromozomu yaklaşık 40 dakikada replike edilir. Genom büyüklüğü yaklaşık 4.1 milyon baz çifti olarak kabul edilirse saniyede 2000 bp bir bölgenin replikasyonunun yapılması gerekir. Replikasyonun iki çatalda yürütüldüğü düşünüldüğünde her bir çatalın hızının saniyede 1000 bp olması gerekir. Bu hızlı ve yanlışsız gerçekleştirilmesi gereken sürecin yürütülebilmesi için replikasyon sırasında gerçekleştirilen işlemlerin çok yüksek bir eşgüdüm içinde yürütülmesi gerekir. Gerçekte DNA polimeraz replikasyon çatalındaki olayları koordine eden büyük bir nükleoprotein kompleksinin bir parçasıdır. Bu kompleks **replizom** olarak adlandırılır ve "moleküler makina"ya tipik bir örnektir. Replizomlar replikasyonda görev alan enzim ve yardımcı proteinleri kapsar ve replikasyon çatalında meydana gelen bütün olayların istenen hızda ve doğrulukta yürütmesini sağlar.

4.1.1 Virüslerde replikasyon

Virüslerde farklı tip nükleik asitler genom olarak kullanılır (DNA, RNA, tek zincirli, çift zincirli, halkasal veya doğrusal). Bu genomların replikasyonu için de çok farklı mekanizmalar kullanılır. Bunlardan sadece ikisinden kısaca söz edilecektir.

Bakteriyofaj lamda (λ) genomu bakteri hücresine girince *cos* denilen uç bölgele-
rinden halkasallaşırlar (Şekil 4.2a). Bu halkasal çift zincirli DNA Θ mekanizmasıyla hü-
resel enzimlerle replike edilerek çoğaltılır. Yeni sentezlenen bu halkasal λ genomlarının
zincirlerinden biri kesilir ve kesilen zincirin 5' ucu yapıdan ayrılmaya başlar. Ayrılan zin-
cirin ve hala halka şeklinde olan diğer zincirin tek zincirli kısımları kalıp olarak kullanı-
larak yeni zincir sentezlenir. Halka yapı bir çok defa dönerek uzun bir doğrusal çift zincirli
DNA üretilir. Bu uzun zincir **konkatamer** adını alır. Konkatamerler daha sonra λ geno-
munun *ter* gen bölgesinin yürüttüğü fonksiyon ile *cos* bölgelerinden birim λ genomlarına
parçalanır.



Şekil: a) Dönen halka modeliyle λ DNA replikasyonu, b) retrovirüslerde aracı DNA üze-
rinden RNA genomunun replikasyonu.

Retrovirüsler insanda AIDS'e neden olan HIV'i (insan immün yetmezlik virüsü) de
kapsayan bir grup olup tek zincirli doğrusal RNA genomuna sahiptirler. Virüs insan hü-
cresine girdiğinde (büyük çoğunlukla T lenfositlere) kendilerinin kodladığı bir RNA ba-
ğımlı DNA polimeraz (revers transkriptaz) ile tek zincirli RNA şeklindeki genomu sitop-
lazmada çift zincirli DNA'ya (cDNA) çevirir. Bu cDNA çekirdeğe geçerek hücrenin geno-
ma integre olur ve genomdan normal transkripsiyon mekanizmasıyla virüsün RNA ge-
nomları çoğaltılır (Şekil 4.2b).

4.2 Ökaryotlarda DNA Replikasyonu

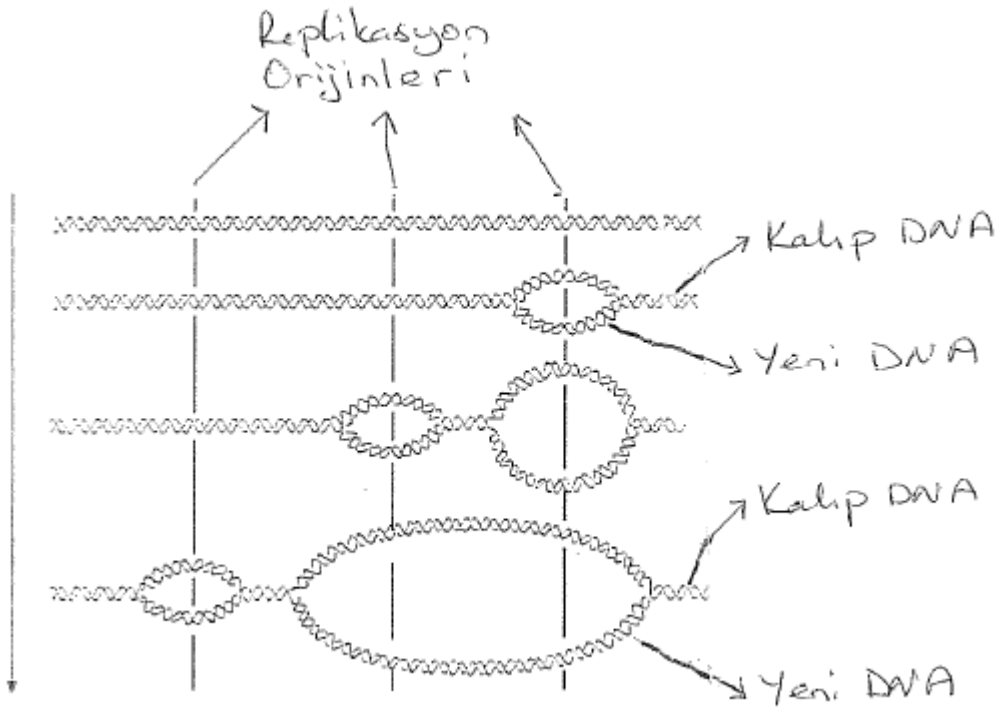
DNA replikasyonunun biyokimyası ve moleküler biyolojisi prokaryot ve ökaryotlarda
benzerdir. Ancak ökaryotlarda genom birden fazla kromozom içindedir ve histon prote-
inleriyle kompleks oluşturmuş durumdadır. Replikasyon sırasında bu kompleks açılmalı
ve her hücre döngüsünde sadece DNA'nın replikasyonu değil aynı zamanda histon sen-
tezi de gerçekleştirilmelidir. DNA replikasyonu ve kromozom duplikasyonu hücre dön-
güsünün sentez safhasında gerçekleştirilir.

Eğer her bir insan kromozomunun, tek bir replikasyon orijininin başlanarak
replikasyonu gerçekleştirilseydi, 2 kb/sn hızla gerçekleşen bir replikasyon ile yaklaşık

880 saate ihtiyaç duyulurdu (haploit genom büyüklüğü 3 164 000 kb). Halbuki insanda bir çok hücre bundan çok daha hızlı bölünür. Kültüre alınmış insan ve diğer hayvansal hücreler 24 saatte bölünebilirler. *Drosophila*'da replikasyon 3 dakikada tamamlanır (Tablo 4.1). O halde ökaryotlarda replikasyon bir şekilde hızlandırılıyor olmalıdır. Gerçekte ökaryotlarda DNA replikasyonu prokaryotların aksine çok sayıda bölgede başlayabilmektedir (Şekil 4.3). Bu bölgelerde replikasyon orijininden sentez başlar ve çift yönlü olarak devam eder. Yani bir kromozom üzerinde çok sayıda replikasyon orijini vardır. Ökaryotlarda bir replikasyon orijini ile bu orijinin her iki tarafında yer alan terminasyon bölgeleri arasında kalan DNA bölgesi **replikon** veya **replikasyon birimi** olarak adlandırılır. Çok sayıdaki nispeten küçük (kısa) replikonlar replikasyon hızını oldukça artırmaktadır. Prokaryotik genomlar tek bir replikondur.

Tablo 4.1: Ökaryotik ve prokaryotik replikonların sayısı, büyüklük ve hızlarının karşılaştırması (Not: replikon sayısı ve büyüklükleri nisbi olarak verilmiştir. Genomunların gerçek büyüklükleriyle uyumlu olmayabilir).

Organizma	Replikon sayısı	Ortalama büyüklük	Çatal hızı	Gerçek genom büyüklüğü
Bakteri (<i>E. coli</i>)	1	4600 kb	50000 bp/dak	4 600 kb
Maya (<i>S. cerevisiae</i>)	500	40 kb	3600 bp/dak	12 000 kb
<i>D. melanogaster</i>	3500	40 kb	2600 bp/dak	180 000 kb
Kara kurbağası	15000	2000 kb	500 bp/dak	5 040 000 kb
Fare	25000	150 kb	2200 bp/dak	2 500 000 kb



Şekil 4.3: Ökaryotik kromozomların replikonlarında replikasyonun başlaması ve zamana bağlı olarak ilerlemesi.

Prokaryotlarda olduğu gibi topoizomerazların nükleozomların açılmasında rol aldığı bilinmektedir. Ökaryotlarda beş tip DNA polimeraz vardır: α , β , δ , ϵ ve γ DNA polimeraz. **α ve γ DNA polimerazlar** çekirdekte replikasyondan sorumludurlar (prokaryotik DNA polimeraz III'e benzer). **β DNA polimeraz** DNA tamirinde görev yapar. **γ DNA polimeraz** mitokondrial DNA replikasyonunu gerçekleştirir. α DNA polimeraz aynı zamanda primaz aktivitesine sahiptir. Yanlış düzelme fonksiyonu ise α , δ ve γ DNA polimerazlar tarafından gerçekleştirilir.

4.2.1 Ökaryotlarda kromozomların uçlarının replikasyonu

Doğrusal DNA molekülünün replikasyonu tamamlandığında eğer özel önlem alınmazsa telomer bölgelerinden her yeni molekülün kalıp zincirinin 3' ucundan bir primer kadar (insanda 50-200 bp) DNA kaybolur, kromozom kısalır. Bunun nedeni bu bölgede (uçta) 3'OH ucu sağlanamamasından dolayıdır. Hücrelerde bu kısalmanın önüne geçmek için geçici önlemler alınmıştır. Kromozomların uçlarında yani telomerlerde peşpeşe tekrarlayan diziler vardır. Bu diziler **telomeraz enzim sistemi** tarafından telomerlere eklenir. Telomeraz aktivitesi doğrudan replikasyonla ilişkili değildir.

İnsanda telomeraz normal doku hücrelerinde aktif değildir. Embriyonik safhada farklılaşmaya paralel olarak telomeraz aktivitesi de azalır. Telomeraz aktivitesi sonlanana kadar geçen süre içinde, yani erken embriyonik safhalarda telomer bölgelerine tekrarlayan diziler eklenir. Bu tekrarlayan diziler gelişme ve erginlik safhasında kromozomların kısalmasının telomer bölgelerindeki tekrarlayan diziler içinde kalmasını sağlar. Telomer bölgeleri belli bir sınıra kadar kısalduğunda o hücre artık bölünmez, gen ekspresyonu değişir, bu değişim çevre dokuları etkiler ve dokunun yaşlanmasına neden olur. Kanser hücrelerinde telomeraz aktiviteleriyle telomer bölgelerine tekrarlayan dizilerin eklendiği ve kanser hücrelerinin ölümsüzlük özelliğinin sağlandığına yönelik veriler mevcuttur.

5 TRANSKRİPSİYON VE RNA İŞLEME

Bir organizmanın yapısı, fonksiyonu, gelişmesi ve üremesi hücrede ve dokuda mevcut proteinlerin özelliklerine bağlıdır. Proteinleri oluşturan polipeptitlerin amino asit dizisi DNA'da bulunan gen bölgelerindeki genetik bilgi ile belirlenir. Genetik bilginin doğru bir şekilde proteinlere aktarımı iki basamakta gerçekleştirilir: Transkripsiyon ve translasyon. DNA'dan RNA'ya ve proteinlere doğru gerçekleşen bu bilgi akışı **sentral dogma** olarak da adlandırılır. Bazı durumlarda genetik bilgi akışı RNA'ya kadardır (Ribozomal RNA'lar, tRNA'lar ve snRNA'lar).

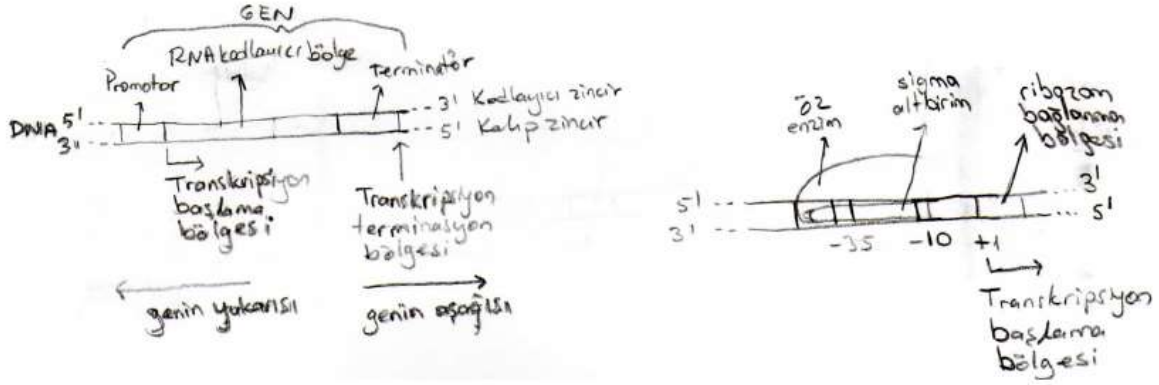
DNA nükleotit dizisinin RNA nükleotit dizisine dönüştürüldüğü transkripsiyon süreci prokaryot ve ökaryotlarda temelde aynıdır. DNA bir genin bitişiğinden açılır. Promotor denilen bu açılan bölgeden DNA'ya bağlanan RNA polimeraz DNA'nın 3'-5' yönündeki zincirini kalıp olarak kullanarak 5'-3' yönünde bir RNA sentezler. Bazı istisnalar dışında bir DNA bölgesindeki zincirlerden sadece biri RNA sentezi için kalıp olarak kullanılır. Transkripsiyon sürecinde de genetik bilginin değişmeden (hemen hemen değişmeden!) RNA'ya aktarılır. Bu aktarım bir DNA zincirinin kalıp olarak kullanılması esasına dayanır. RNA zinciri DNA zincirinin komplementeri olarak sentezlenir ve dolayısıyla genetik bilgi doğru bir şekilde RNA'ya aktarılmış olur.

Hücrede dört tip RNA vardır: mRNA, tRNA, rRNA ve snRNA (küçük çekirdek RNA'sı). Prokaryotlarda mevcut olan üç tip RNA (mRNA, tRNA ve rRNA) tek bir RNA polimeraz enzimi tarafından sentezlenir. Enzim 3'-5' DNA zincirini kalıp olarak kullanarak 5'-3' yönünde yeni RNA zincirini sentezler, yeni zincire riboz şekerli nükleotitleri (NTP, nükleotit trifosfat) ekler. Ökaryotlarda ise üç tip RNA polimeraz enzimi mevcuttur. RNA polimeraz I sadece çekirdekçikte yer alır ve ribozomların yapısına katılan üç RNA molekülünü (28S, 18S ve 5.8S rRNA) sentezler. RNA polimeraz II çekirdek plazmasında yer alır, mRNA ve snRNA sentezini gerçekleştirir. RNA polimeraz III ise çekirdek plazmasında bulunur, tRNA'larla 5S rRNA'yı ve bazı snRNA'ları sentezler.

5.1 Prokaryotlarda Transkripsiyon

Tipik bir prokaryotik organizma olan *Escherichia coli* gen bölgelerinin özel bir organizasyonu vardır. Belli bir gen veya genlerin bulunduğu DNA kısmında bir **promotor bölgesi** vardır, RNA polimerazın sigma alt birimi bu bölgeyi tanır ve bağlanır (Şekil 5.1). Promotor bölgelerinde transkripsiyonun başladığı nükleotitten (+1 pozisyonu) 10 nükleotit 5' tarafında (yukarısında = upstream) korunmuş yani bir çok promotorda aynı diziyeye sahip olan konsensus dizisi vardır. Bu dizi **-10 bölgesi** veya **Pribnow kutusu** olarak adlandırılır. Yine yaklaşık 35 nükleotit yukarıda diğer bir konsensus bölgesi vardır, bu bölge de **-35 bölgesi** olarak adlandırılır. Sigma alt ünitesi -35 ve -10 bölgelerine bağlanarak RNA polimeraz öz enziminin gen bölgesine bağlanmasını sağlar. Bu bağlanma bölgesinde bir transkripsiyon halkası oluşur. 8-9 nükleotit (NTP, dNTP değil!) uzunluğunda bir RNA molekülü sentezlendiğinde sigma alt ünitesi kompleksten ayrılır ve öz enzim RNA sentezini devam ettirir. Prokaryotlarda bir promotoru takip eden **ribozom**

bağlanma bölgesi ve benzeri düzenleyici dizilerden sonra genellikle birden fazla gen bölgesi vardır. Bu bölge **yapısal gen bölgesi** olarak adlandırılır. Yapısal gen bölgesindeki gen veya genler tek bir RNA molekülüne dönüştürülür. Gen bölgesinin sonunda bir **transkripsiyon terminasyon bölgesi** vardır. Bu bölgede transkripsiyon durdurulur, RNA ve RNA polimeraz öz enzimi yapıdan ayrılır. Bu olaylarda farklı aşamalarda çok sayıda **faktör** olarak anılan katalitik kompleks iş görür.



Şekil 5.1: Prokaryotlarda gen bölgesinin organizasyonu ve promotor bölgelerinin ayrıntılı yapısı.

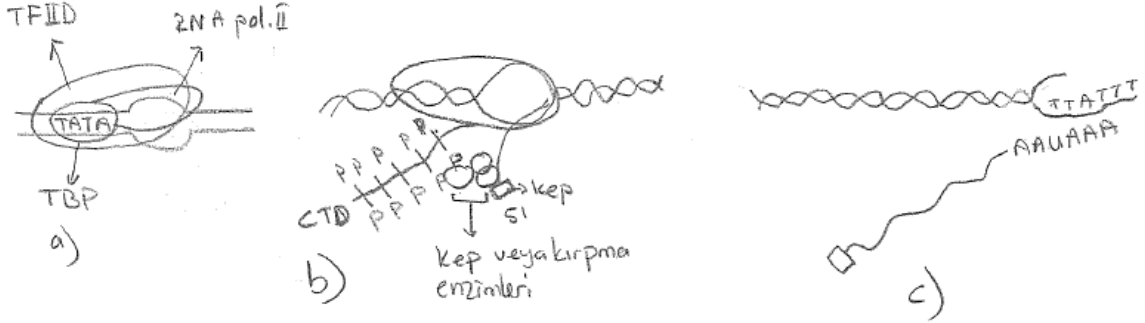
5.2 Ökaryotlarda Transkripsiyon

RNA sentez mekanizmaları aynı olmakla beraber, gerek DNA'nın kromozomlardaki organizasyonu, gerek ökaryotik DNA üzerinde genlerin organizasyon şekli ve gerekse transkripsiyon sırasındaki ve sonrasındaki olaylar bakımından prokaryotlarla ökaryotlar arasında önemli farklılıklar vardır. Her şeyden önce transkripsiyon başlamadan önce histonlarla kompleks oluşturmuş olan DNA'nın açılması gerekir. Bu DNA'nın açılması ökaryotlarda gen düzenlenmesinin temel hedeflerinden biridir ve olayın bu boyutu burada hariç tutulacak ve açılmış bir DNA üzerinden transkripsiyon incelenecektir.

Ökaryotlarda protein kodlayan genlerin transkripsiyonu RNA polimeraz II tarafından gerçekleştirilir. Senteze **genel transkripsiyon faktörleri (GTF)** olarak isimlendirilen proteinlerden oluşmuş bir kompleks yardım eder. Transkripsiyon son ürünü birincil transkript veya öncü mRNA'dır. Transkripsiyon son ürünü olan bu öncü mRNA, olgun mRNA'ya dönüştürülmek üzere, çekirdekte bazı modifikasyonlara ve işlemlere tabi tutulur. Bu DNA bölgesindeki kodlayıcı gen bölgesinin yukarısında bazı **düzenleyici elementler** yani düzenleyici DNA bölgeleri vardır. Gene yakın düzenleyici element **promotor**, uzak olanlar **güçlendiriciler** (veya bazı durumlarda **susturucular**) olarak adlandırılırlar.

Promotor bölgesinde transkripsiyon başlama bölgesinin 30 bp yukarısında sıklıkla TATA dizisini bulunduran bir bölge vardır. Bu bölge **-30 bölgesi** veya **TATA kutusu** (TATA elementi) olarak adlandırılır. GTF'nin bir çeşidi olan TFIID'nin bir parçası olan TBP bu bölgeye bağlanır. Dolayısıyla transkripsiyonun başlama bölgesi doğru olarak belirlenmiş olur. Sonra TFIID bu bölgeye bağlanır. Takiben diğer GTF'lerin yardımıyla RNA polimeraz II bu bölgeye bağlanarak başlama kompleksini oluşturur (Şekil 5.2a). Başlama kompleksi oluşuktan sonra RNA polimeraz II'nin karboksil ucu domain'inin (CTD) fosforlanmasıyla uzama başlar. RNA polimeraz II'nin CTD bölgesi, transkripsiyono-

nun yürütülmesini koordine eder. CTD bölgesindeki bir grup amino asitin fosforlanması/defosforile olmasına bağlı olarak komplekse uygun fonksiyonu yürütecek diğer kompleksler bağlanır: kep bağlama enzimleri, RNA kırma kompleksi (splayozom) ve poliA kuyruğu ekleme proteini (Şekil 5.2b). Uzama AAUAA veya AUUAA dizisine ulaşana kadar devam eder. Bu dizi sentezlendiğinde bir RNA endonükleaz bu diziden RNA'yı keserek transkripsiyonun sonlanmasını sağlar (Şekil 5.2c).

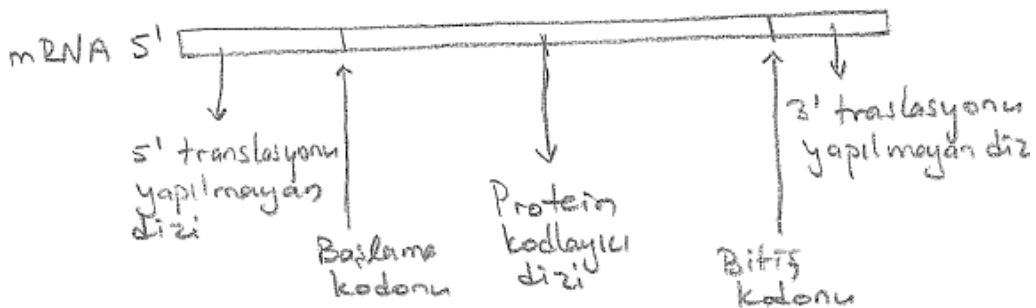


Şekil 5.2: RNA polimeraz II tarafından yürütülen transkripsiyon. a) Başlangıç kompleksinin oluşması, b) Uzama (kep takma ve kırma) ve c) terminasyon.

Transkripsiyon başlama bölgesinin 1000 bp yukarısında veya nadiren aşağısında **güçlendirici DNA elementleri** vardır. Bunların görevi genin maksimum transkripsiyonunu uyardır. Güçlendiricilerin aksine uzak bölgelerde transkripsiyonu baskılayan **susturucu DNA elementleri** de bulunabilir.

5.3 Prokaryotik ve Ökaryotik mRNA'lar

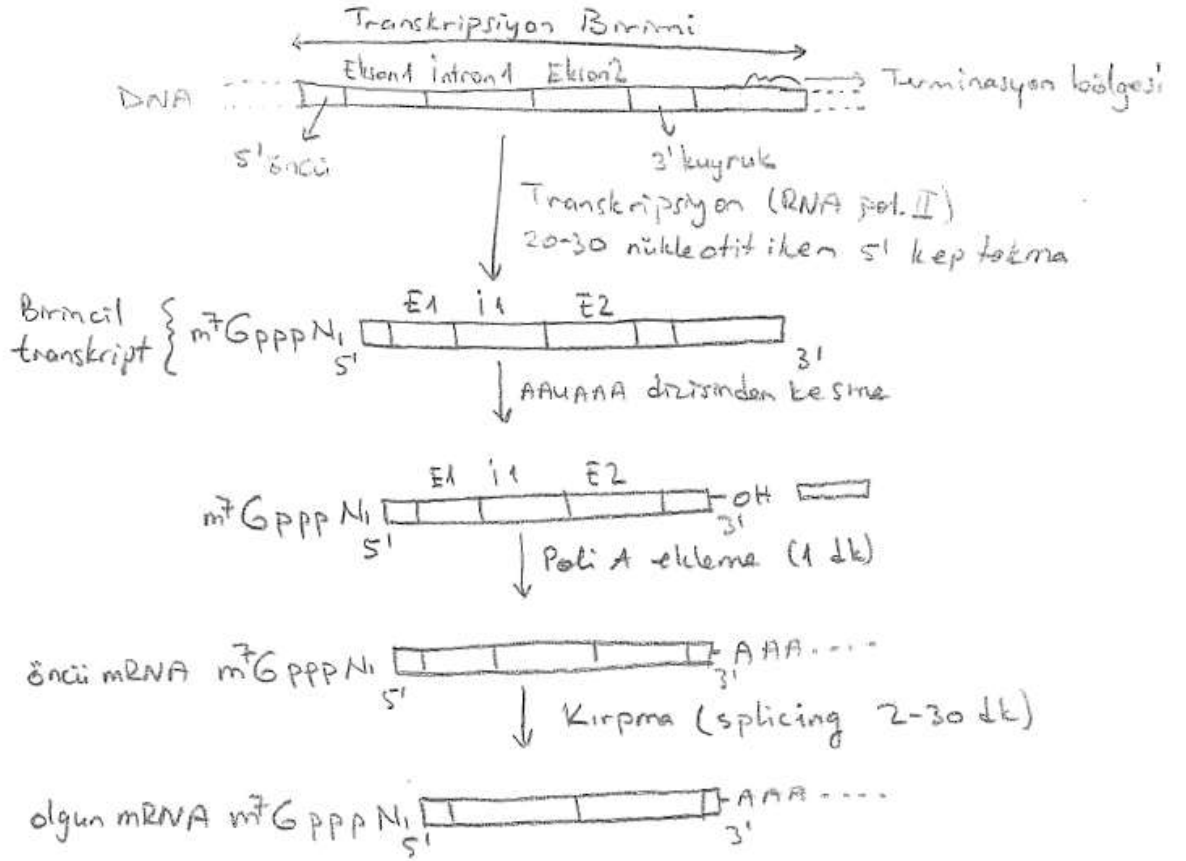
Bir mRNA molekülü bir öncü bölge, bir kodlayıcı bölge ve bir de artçı bölgeden meydana gelir (Şekil 5.3). Öncü bölge mRNA'nın ribozomlara bağlanmasında görev alır. Kodlayıcı bölge DNA'dan alınan ve proteine aktarılacak genetik bilginin kodonlar halinde tutulduğu bölgedir. Artçı bölge ise ribozomların mRNA'dan ayrılması ve mRNA'nın dayanıklılığı ile ilgili görevler gerçekleştirir. Öncü ve artçı bölgeler translasyona katılmaz, yani proteinlere dönüştürülmezler.



Şekil 5.3: Tipik bir mRNA'nın öncü, kodlayıcı gen ve artçı bölgesi.

Prokaryotik genomlarda gen bölgeleri kesintisizdir ve bir yandan DNA'dan mRNA sentezlenirken, mRNA üzerindeki ribozom bağlanma bölgesinden (Shine-Dalgarno dizisi) ribozomlar mRNA'ya bağlanarak protein sentezi de gerçekleştirilir.

Ökaryotlarda ise DNA üzerindeki gene ait kodlayıcı bölgeler (ekson), kodlamada görev almayan DNA bölgeleriyle (intron) kesintiye uğratılmıştır. Transkripsiyon sırasında hem ekson ve hem de intronlar ilk sentezlenen mRNA'nın yapısında mevcuttur. İntronları da taşıyan bu mRNA **birincil transkript** veya **öncü mRNA** adını alır ve genetik bilgiyi kesintisiz olarak taşımaz. Bu öncü mRNA translasyon için sitoplazmaya transfer edilmeden önce çekirdekte bazı işlemlerden geçirilir. Bunlar 5' kep bağlama (5' capping), RNA splicing (intron çıkarma, kırpma) ve 3' poli A ekleme işlemlerini içerir (Şekil 5.4). Yakın zamana kadar RNA işleme dediğimiz bu işlemlerin transkripsiyondan sonra (posttranskripsiyonal) gerçekleştirildiği düşünülmekteydi. Ancak RNA işleme işlemlerinin transkripsiyon ile eş zamanlı olarak (kotranskripsiyonal) yürütüldüğünü artık biliyoruz.



Şekil 5.4: Bir olgun ökaryotik mRNA oluşum basamakları.

5' kep bağlama: Bu işlem öncü mRNA'nın 5' ucuna genellikle 7 pozisyonuna metil bağlanmış bir guanin (7-Me guanin) nükleotidinin bağlanması işlemidir. Bu bağlanma alışılmadık bir şekilde 5'-5' ester bağı ile gerçekleştirilir. Ayrıca öncü mRNA'nın ilk iki nükleotidine de metil grubu bağlanır. 5' şapka yapısı translasyonun başlangıç basamağında ribozomun olgun mRNA'ya bağlanması için esastir.

RNA splicing (RNA kırpma): Öncü mRNA yapısındaki intronlar RNA splicing (splayslama, kırpma) denilen bir mekanizma ile uzaklaştırılır. Her bir intronun 5' ve 3' uçlarında tipik **sinyal bölgeleri** vardır. İntron, bu bölgelerden tanınarak öncü mRNA yapısından uzaklaştırılır. Bu işlem çekirdekte "**splaysozom**" denilen komplekslerde gerçekleştirilir. Bu kompleksler snRNA molekülleri ve 6-10 protein molekülünden meydana

gelmiştir. Bu kompleksler **çekirdek ribonükleoproteinleri** (RNP) olarak adlandırılır. Hücrelerde çok sayıda farklı çekirdek RNP'leri mevcuttur ve her biri özel bir intronu öncü mRNA'dan koparır.

3' poli A ekleme: Prokaryotlardaki gibi transkripsiyon terminasyon bölgesi mRNA'da mevcut değildir. Bunun yerine mRNA transkripsiyonu yüzlerce, binlerce nükleotit boyunca devam ettikten sonra bir poli A kuyruğu bağlama bölgesine ulaşır ve bu bölgeyi geçer. AAUAAA dizisi poli A ekleme bölgesi sinyali olarak algılanır ve bir RNA endonükleaz tarafından kesilir. Sonra açığa çıkan 3' OH ucuna poli A polimeraz tarafından 50-250 kadar A nükleotiti eklenir. Poli A kuyruğu mRNA'nın dayanıklılığını artırır. Bu işlevini muhtemelen, mRNA'yı, sitoplazmada bulunan ribonükleazlardan koruyarak yapar.

5' kep bağlama, intron uzaklaştırma (RNA splicing) ve 3' poli A ekleme işlemlerinin tamamına **RNA işleme** denir. RNA işleme çekirdekte gerçekleştirilir ve işlem tamamlandığında olgun mRNA sitoplazmaya bakılır.

5.4 Ribozomal RNA'nın Transkripsiyonu

Escherichia coli'nin 16S, 23S ve 5S rRNA genleri tek bir transkripsiyon birimi halinde bulunur ve her bir bölge arasında aralayıcı dizileri vardır. Transkripsiyonda oluşturulan tek bir transkriptten (RNA molekülü) RNaz III tarafından aralayıcı diziler uzaklaştırılır. İkinci bir RNA işleme sürecinden sonra her bir rRNA serbest kalır. rRNA transkriptini kodlayan DNA bölgesi **rDNA** olarak adlandırılır.

Ökaryotlarda 5S rRNA geni, genomda ayrı bir lokasyonda bulunur. Diğer rRNA genleri (18S, 5,8 S ve 28S) tek bir transkripsiyon ünitesi halinde peş peşe tekrarlayan rDNA şeklindedir. Tipik olarak 100 ila 1000 rDNA kopyası tekrarlanır. Bu rDNA kopyaları tek bir promotor tarafından öncü rRNA'ya transkribe edilir. Sonra prokaryotlarda olduğu gibi aralayıcı diziler yıkılır ve her bir transkriptten 18S, 5,8S ve 28S rRNA'lar üretilir.

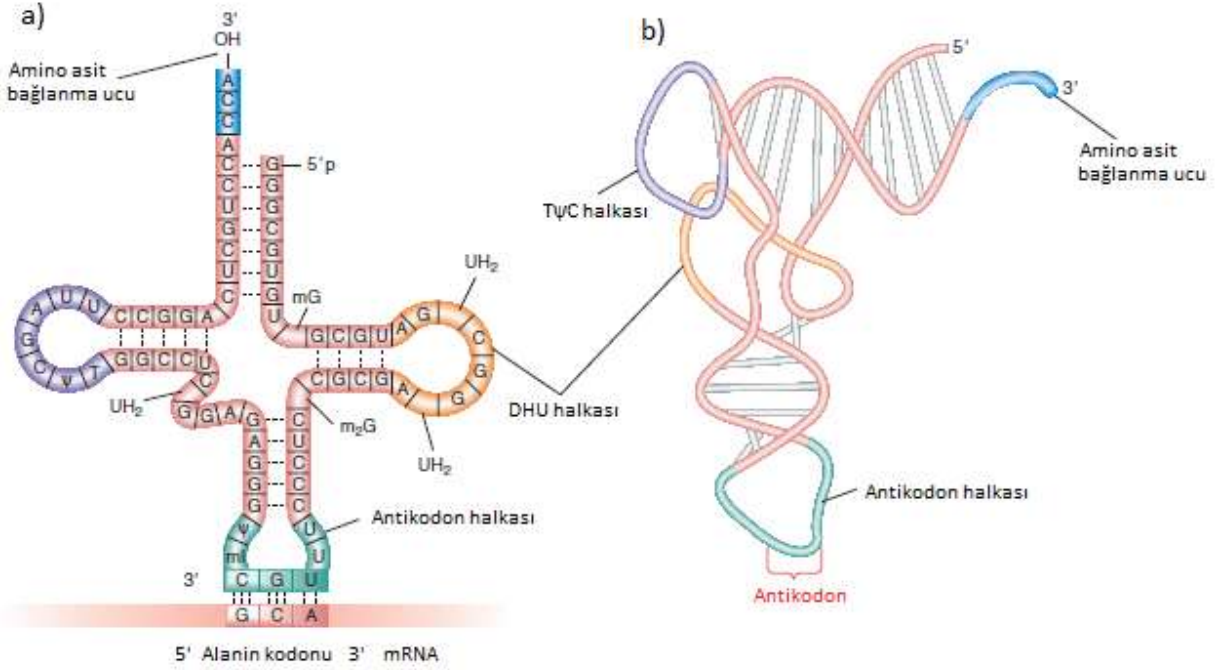
RNA yapısındaki bazı intronların kendi kendilerini öncü rRNA'dan uzaklaştırdıkları bilinmektedir. Bu intronlar RNA yapısında bir protein enzim gibi katalitik aktivite gösterirler ve **ribozim** adını alırlar, spesifik olarak belli intronları keserler.

5.5 Transfer RNA'nın Transkripsiyonu

Genomda çok sayıda (61 adet) tRNA geni vardır. Bu genler bazen kümeler şeklinde bir arada bazen tek tek bulunabilmektedir. *E. coli*'de tRNA genleri tek kopya halinde bulunur. Ökaryotlarda prokaryotlardan çok daha fazla sayıda tRNA geni vardır. Mayalarda 400 civarında tRNA geni varken, karakurbağasında her bir tRNA geni (61 adet) için 200'den fazla kopya mevcuttur. Bazı ökaryotik tRNA genleri intronlar içerir; bu intronlar mRNA'dakine benzemeyen bir yolla uzaklaştırılır. tRNA transkripsiyonu sırasında bazı bazlar modifiye edilir.

tRNA'lar genetik bilginin mRNA'dan proteinlere aktarılmasında görev alırlar. 3' ACC uçlarına spesifik bir amino asit bağlanır. Antikodon tRNA'nın diğer bir kolunda yer

alır (Şekil 5.5). Belli bir antikodon taşıyan bir tRNA sadece belli bir amino asiti taşır. Bir amino asitin hangi tRNA'ya bağlanacağı **aminoasil-tRNA sentetaz** enzimleri tarafından belirlenir. Hücrede 20 farklı aminoasil-tRNA sentetaz vardır. Her amino asit için bir adet mevcut olan bu enzimler tRNA'nın antikodon ve amino asit bağlanma bölgeleri ile etkileşerek antikodona uygun amino asitin tRNA'ya spesifik olarak bağlanmasını sağlar. Bu spesiflik genetik bilginin proteinlere, doğru bir şekilde geçmesini sağlayan kilit bir olaydır. Antikodon ribozoma tutunmuş mRNA üzerindeki kodon bölgesine bağlanırken taşıdığı amino asit protein sentez bölgesine ulaştırılmış olur.



Şekil 5.5: a) Maya alanin tRNA'sının şematik yapısı (yonca yaprağı modeli) ve transkripsiyonda rol alan fonksiyonel bölgeleri, b) gerçek üç boyutlu yapısının şeması. Modifiye bazlar: mI = metilinozin, T = ribotimidin, ψ = pseudoüridin, D = dihidroüridin, mG = metilguanozin, m₂G = dimetilguanozin ve UH₂ = dihidroüridin.

Görüldüğü gibi bazı RNA molekülleri herhangi bir proteini veya polipeptiti kodlamadığı halde hüresel süreçlerde yapısal veya fonksiyonel olarak görev yapmaktadır (rRNA'lar, tRNA'lar ve snRNA'lar). Dolayısıyla genetik bilgi bu RNA moleküllerine kadar taşındıktan sonra bir görevi gerçekleştirmektedir. Bu durumda bir gen-bir polipeptit yaklaşımı da gen kavramını tam olarak ifade edememektedir. Bunun yerine bazı araştırmacılar bir gen-bir transkript kavramını önermişlerdir. Buna göre her gen bir transkript oluşumundan, yani bir RNA molekülünün sentezinden sorumludur. Ancak prokaryotlarda polisistronik mRNA molekülleri (birden fazla gene ait şifreyi taşıyan mRNA molekülleri) düşünüldüğünde bu kavramın da geni, tam olarak ifade etmediği ortadadır.

Sonuçta, mevcut değerlendirmeler ışığında şöyle bir gen tanımı yapmak mümkün olabilir: *Bir polipeptitin veya fonksiyonel bir RNA molekülünün kodlanmasından sorumlu DNA bölgelerine **gen** denir.*

6 GENETİK ŞİFRE VE GENETİK MESAJIN TRANSLASYONU

Bir protein, polipeptit denilen bir veya daha fazla moleküler alt birimden meydana gelir. Polipeptitler daha küçük yapıtaşlarının, amino asitlerin birbirine peptit bağlarıyla bağlanarak oluşturdukları uzun zincirlerdir. Birincil amino asit dizisi, proteinin ikincil, üçüncül ve dördüncül yapısını ve dolayısıyla fonksiyonel formunu belirler. O halde mRNA molekülü üzerindeki nükleotitler proteinlerin birincil amino asit dizisini nasıl belirler? mRNA'ya aktarılmış genetik bilgi doğru bir şekilde nasıl polipeptitlere aktarılır? Bu bölümde bu sorular cevaplandırılacaktır. Genel olarak şu söylenebilir ki mRNA'daki genetik bilginin doğru bir şekilde polipeptitlere aktarılmasında komplementer kodon-antikodon eşleşmesi esastır. Özgül bir antikodona sahip bir tRNA, özgül bir amino asite bağlanabilir. Bu yolla genetik bilgi en doğru bir şekilde proteinlere aktarılır. Bu mekanizmaların biraz daha ayrıntısının incelenmesine geçebiliriz.

6.1 Genetik Şifre (Kod)

Dört nükleotit kullanılarak (A, C, G ve U) üç harfli yani üç nükleotit veya bazdan oluşan 64 muhtemel kodon oluşturulabilir. Bu sayıdaki kodon proteinlerin yapısına katılan 20 (veya 21) amino asit için fazladır. Bu durum bazı amino asitler için birden fazla kodonun kullanıldığını gösterir. Yapılan deneysel çalışmalarda 64 kodonun her birinin hangi amino asiti kodladığı veya hangilerinin durdurma kodonu olduğu belirlenmiştir (Şekil 6.1a,b). Bu kodonların tamamı genetik kod olarak adlandırılır. Genetik kodun özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Genetik şifre üçlüdür, yani mRNA üzerindeki her bir kodon üç nükleotitten oluşur ve her kodon bir amino asiti kodlar.
2. Genetik şifre süreklidir. Üçlü gruplar (kodonlar) peş peşe devam eder.
3. Şifre hemen hemen evrenseldir (Mitokondri, kloroplast ve bazı organizmalarda alışılmadık kodlamalar da mevcuttur).
4. Şifre dejeneredir. Yani ikisi (AUG metionin ve UGG triptofan) hariç diğer amino asitler birden fazla kodon tarafından kodlanırlar. Bu dejenere şifreler (aynı amino asiti kodlayan farklı kodonlar) bütün organizmalarda aynı oranlarda kullanılmazlar. Bu olaya, yani aynı amino asiti kodlayan farklı kodonların farklı organizmalarda farklı oranlarda kullanılmasına **kodon kullanımı** (kodon tercihi) denir.
5. Şifre üst üste gelmez. mRNA üçlü gruplar halinde peş peşe okunur. Bir mRNA üzerinde sürekli devam eden bir kodon grubu **okuma satırı** (okuma çerçevesi) olarak adlandırılır. Farklı nükleotitlerden başlayarak bir mRNA üzerinde üç farklı okuma yapmak mümkündür. Ancak çok nadir istisnalar dışında bir mRNA'nın belli bir bölgesinde tek bir okuma satırı vardır.
6. Şifre başlama ve bitiş sinyallerine sahiptir. Başlama kodonu genellikle AUG'dir, metionin amino asitini kodlar. Nadir durumlarda GUG de **başlama kodonu** olarak iş görebilir. GUG kodonu normal şartlarda valini kodlar ancak başlangıç pozisyonun-

da iken metionini kodlar. 64 kodondan 61'i aminoasitleri kodlar, bunlar **anlamli kodonlardır**. Geriye kalan üç kodon UAG (amber), UAA (okre) ve UGA (opal) hiç bir amino asiti kodlamaz, hücrelerde bu kodonlara uygun antikodonlara sahip tRNA'lar mevcut değildir. Bu kodonlar **bitiş kodonları, anlamsız kodonlar** veya **zincir sonlandırıcı kodonlar** olarak adlandırılır. O halde bir **açık okuma satırı** bir başlama kodonu ile başlayarak belli sayıda anlamalı kodonla devam edip bir anlamsız kodonla sonlanan mRNA bölgesidir.

a)

Genetik Şifre (mRNA'da bulunduğu gibi)				
	U	C	A	G
U	UUU Phe (F) UUC " UUA Leu (L) UUG "	UCU Ser (S) UCC " UCA " UCG "	UAU Tyr (Y) UAC " UAA Ter UAG Ter	UGU Cys (C) UGC " UGA Ter UGG Trp (W)
C	CUU Leu (L) CUC " CUA " CUG "	CCU Pro (P) CCC " CCA " CCG "	CAU His (H) CAC " CAA Gln (Q) CAG "	CGU Arg (R) CGC " CGA " CGG "
A	AUU Ile (I) AUC " AUA " AUG Met (M)	ACU Thr (T) ACC " ACA " ACG "	AAU Asn (N) AAC " AAA Lys (K) AAG "	AGU Ser (S) AGC " AGA Arg (R) AGG "
G	GUU Val (V) GUC " GUA " GUG "	GCU Ala (A) GCC " GCA " GCG "	GAU Asp (D) GAC " GAA Glu (E) GAG "	GGU Gly (G) GGC " GGA " GGG "

b)

Asidik	Bazik			Nötral, nonpolar			Nötral, polar		
Aspartik asit Asp D	Lizin	Lys K	Triptofan Trp W	Tirozin Tyr Y					
Glutamik asit Glu E	Arjinin Arg R		Fenilalanin Phe F	Serin Ser S					
	Histidin His H		Glisin Gly G	Treonin Thr T					
			Alanin Ala A	Asparajin Asn N					
			Valin Val V	Glutamin Gln Q					
			İzolösün Ile I	Sistein Cys C					
			Lösün Leu L						
			Metionin Met M						
			Prolin Pro P						

Şekil 6.1: a) Genetik şifre (mRNA üzerinde kodonlar şeklinde) ve b) amino asitlerin üçlü ve tekli isimlendirme kodları.

7. Antikodonlarda yalpalama meydana gelir. 61 kodona karşılık belli bir hücrede 61 çeşit tRNA mevcut değildir. Bunun nedeninin tRNA'ların yalpalamasının olduğu hipotezi ortaya atılmıştır. Hipoteze göre bir kodonun 5' ucundan itibaren iki bazı, antikodonun 3' ucundan itibaren iki bazı ile eşleşir ancak kodonun 3' ucundaki bazı ile tRNA'nın antikodonunun 5' ucundaki bazı eşleşmesi atlanır. Bu durumda polipeptit zincirine bağlanacak amino asitin kimliği kodon üzerindeki ilk iki bazı tarafından belirlenir. Bu olaya **yalpalama** (wobble) denir.
8. Her bir kodon esas olarak sadece tek bir amino asiti kodlar. Bir kodonun birden fazla amino asiti kodlaması nadirdir. Bu nadir duruma bir örnek GUG kodonudur. Bu kodon diğer pozisyonlarda valini kodlar ancak başlama pozisyonunda metionini kodlar. Bu olay kodon translasyonunda **konum etkisi** olarak bilinir. Kodonun bulunduğu mRNA bölgesindeki diğer nükleotit grupları, hangi amino asitin bu kodon tarafından kodlanacağını belirler. Konum etkisine diğer bir örnek UGA kodonudur. Normalde opal bitiş kodonu iken özel kodon dizilimlerinde selenosistein amino asitini kodlar ve selenoproteinlerin oluşmasını sağlarlar. Selenosistein amino asiti redoks enzimlerinin aktif merkezinde yer alır.

6.2 Genetik Mesajın Translasyonu

mRNA üzerinde, açık okuma satırı halinde düzenlenmiş üçlü bazı dizileri tarafından tutulan genetik bilginin proteinlere aktarılması gerekir. Bu aktarma işinde mRNA, ribozom, tRNA ve çok sayıda faktör (enzim kompleksi) rol alır ve olay **translasyon** veya **protein sentezi** olarak isimlendirilir.

Protein sentezi ribozomlarda meydana gelir. Ribozomlarda, mRNA içinde taşınan genetik mesaj tercüme edilir. Amino asitler ribozomlara, yüklenmiş tRNA'lar (aminoasil tRNA'lar) tarafından taşınır. Bir polipeptitin dolayısıyla proteinin doğru amino asit dizisi iki mekanizma tarafından sağlanır:

1. mRNA'nın kodonu ile tRNA'nın antikodonu arasındaki spesifik komplementer bağlanma.
2. Her amino asitin, sadece spesifik bir antikodon taşıyan kendi spesifik tRNA'sına bağlanması.

6.2.1 Translasyonun başlaması

Prokaryot ve ökaryotlarda protein sentezi AUG başlama kodonu ile başlatılır. Nadiren GUG ile de başlayabilir. Bu durumda GUG valini değil metionini kodlar. Dolayısıyla yeni sentezlenen bir proteinin NH₂ ucundaki amino asit daima metionindir.

Prokaryotlarda başlangıç metionini formillenmiştir. Yani başlangıç AUG veya GUG kodonu fMet-tRNA^{Met} ile eşleşir. (tRNA^{Met} yüklenmemiş tRNA'yı fMet-tRNA^{Met} ise formil metionin ile yüklenmiş tRNA'yı ifade eder; diğer amino asitleri taşıyan tRNA'lar için de aynı terminoloji kullanılır). Normal AUG kodonları Met-tRNA^{Met} ile eşleşir. Ökaryotlarda da başlangıç kodonu AUG'dir, ancak prokaryotların aksine formillenmemiş bir metionin taşıyan Met-tRNA^{Met} ile eşleşir; yine de kodon aynı olmasına rağmen başlangıç metioninini ve zincir içi metionini taşıyan tRNA'lar farklıdır. Prokaryot ve ökaryotlarda trans-

lasyon başlangıcı temelde benzer şekilde gerçekleştirilir. Yani ribozom küçük alt birimi önce mRNA'ya bağlanır. Bu bağlanmaya başlama faktörleri denilen özel protein kompleksleri de yardım eder. Sonra büyük alt birim yapıya bağlanır. Bu yapı **translasyon başlangıç kompleksi** adını alır.

Prokaryotlarda protein sentezinin doğru pozisyonda başlayabilmesi için başlama kodonunun 5' tarafında özel bir nükleotit dizisine ihtiyaç vardır. **Ribozom bağlanma bölgesi** veya **Shine-Dalgarno dizisi** olarak adlandırılan bu bölge ribozomun, doğru okuma satırını bulmasına yardım eder. mRNA üzerindeki ribozom bağlanma bölgesi 4-10 baz uzunluktadır ve ribozomun küçük alt biriminin 16S rRNA'sının özel bir bölgesiyle komplementerdir (Şekil 6.2a,b). Bu bölgeden 30S ribozom alt birimi mRNA'ya bağlanır. Böylece Shine-Dalgarno dizisi ribozomun doğru okuma satırını bulacak şekilde mRNA'ya bağlanmasını sağlar (Şekil 6.2c). Bu bağlanma işlemine başlama faktörleri ve GTP'de katılır; fMet-tRNA^{Met} molekülüyle beraber 30S başlangıç kompleksi oluşur. Daha sonra GTP hidroliz edilirken ribozomun büyük alt birimi yapıya katılarak 70S başlangıç kompleksi oluşur.

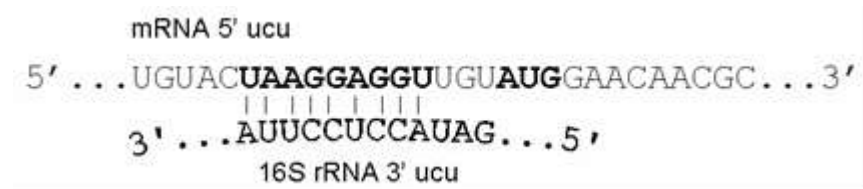
a)

mRNA kaynağı	5' baz dizisi (rbb ve başlama kodonları kalın ve altı çizilidir)
Faj λ Cro	AUG UAC UAA GGA GGU UGU AUG GAA CAA CGC
<i>E. coli trpB</i>	AUA UUA AGG AAA GGA ACA AUG ACA ACA UAA
<i>E. coli lacZ</i>	UUC ACA CAG GAA ACA GCU AUG ACC AUG AUU
<i>E. coli</i> RNA polimeraz β	AGC GAG CUG AGG AAC CCU AUG GUU UAC UCC

b)

3'...AUUCCUCCAUG...5'

c)



Şekil 6.2: a) Farklı mRNA moleküllerinin 5' uçlarında ribozom bağlanma bölgesinin ve başlama kodonlarının organizasyonu, b) *E. coli*'nin 16S rRNA'sının 3' ucunun baz dizisi, c) bir mRNA'da AUG başlama kodonunun yukarısındaki ribozom bağlanma bölgesinin, 16S rRNA'nın 3' bölgesi ile komplementerlik esasına göre bağlanması.

Ökaryotik mRNA'da bir Shine-Dalgarno dizisi mevcut değildir. Diğer bir yolla başlama kompleksi oluşturulur. Şapka (kep) bağlanma proteininin de dahil olduğu ökaryotik başlama faktörü mRNA'nın 5' şapka ucunu tanır ve bağlanır. Sonra 40S alt birim, başlatıcı Met-tRNA^{Met} ve GTP birbirine bağlanır ve mRNA üzerinde yürümeye başlar. Yakın bir pozisyonda bulunan AUG kodonunu bulana kadar yürümeye devam eder. Ökaryotlarda da, AUG kodonu çevresinde, prokaryotların RBB'ne benzer bir dizinin bulunduğu rapor edilmektedir. 5'-ACCAUGG-3' şeklindeki bu dizi Kozak dizisi olarak adlandırılır. Bu

dizinin ribozomun küçük alt birimine bağlanmaya yardım ettiği tahmin edilmektedir. Genellikle 5' şapka ucundan sonraki ilk AUG kodonu başlangıç kodonu olarak algılanır (bazen farklı durumlar da olabilir). AUG kodonu bulunduktan sonra başlama faktörü yapıdan ayrılır ve 60S ribozom alt birimi yapıya bağlanarak 80S başlama kompleksi oluşur.

6.2.2 Uzama ve sonlanma

Başlama kompleksinde ribozom büyük alt birimi üzerinde A, P ve E bölgeleri vardır. P bölgesine ilk yerleşen amino asit prokaryotlarda formilmetionin (fMet-tRNA^{Met} olarak), ökaryotlarda metionindir (Met-tRNA^{Met} olarak). Sıradaki kodona uygun antikodona sahip bir tRNA komplekse bağlanır ve taşıdığı amino asit A bölgesine yerleşir. A bölgesindeki amino asit ile P bölgesindeki amino asit (ilk amino asit veya translasyonun ileri aşamalarında bir amino asit zincirinin karboksil ucundaki amino asit olabilir) birleşir. Birleşme A bölgesindeki amino asitin amino (NH₂) grubu ile P bölgesindeki amino asitin karboksil (COOH) grubu arasında oluşan bir **peptid bağı** ile gerçekleştirilir. Bu reaksiyon ribozom büyük alt biriminin 23S rRNA'sının **peptidil transferaz** aktivitesi ile katalizlenir. P bölgesindeki tRNA boşaltıldığında (amino asitten ayrıldığında) bu bölgeden ayrılır, E bölgesine geçer ve ribozom bir kodon ileri kayar. Boşalan A bölgesine mevcut kodona komplementer antikodonu olan bir diğer aminoasit (yüklenmiş) tRNA yerleşir. Protein sentezinde A, P ve E bölgeleri dışında ribozom üzerinde önemli iki merkez daha vardır. Bunlardan biri A bölgesinin hemen yanında yer alan küçük alt birim üzerinde **şifre çözücü merkez**dir. Bu merkez A bölgesindeki kodon ile komplementer olan antikodona sahip yüklenmiş tRNA'ların girişini denetler. Diğer merkez de **peptidil transferaz merkez**idir. Bu merkez büyük alt birimin peptid bağlarının oluştuğu bölgesindedir. Son zamanlarda yapılan atomik seviyedeki araştırmalar bu bölgelerin tRNA-rRNA temas bölgeleri olduğunu göstermektedir. Bu sonuçlar, peptid bağı oluşumunun rRNA'ya ait bir aktif merkez tarafından gerçekleştirildiğini ve ribozomal proteinlerin sadece yardımcı bir rolünün olduğunu göstermektedir.

Ribozomun A bölgesine bir sonlandırma (bitiş) kodonu gelene kadar protein sentezi devam eder. Bitiş kodonu bir veya bir kaç **ayrılma faktörü** tarafından okunur. Sonra polipeptit ve tRNA ribozomdan ayrılır; ribozom mRNA'nın okuma satırından ayrılır.

6.2.3 Proteinlerin görev yerlerine transferi

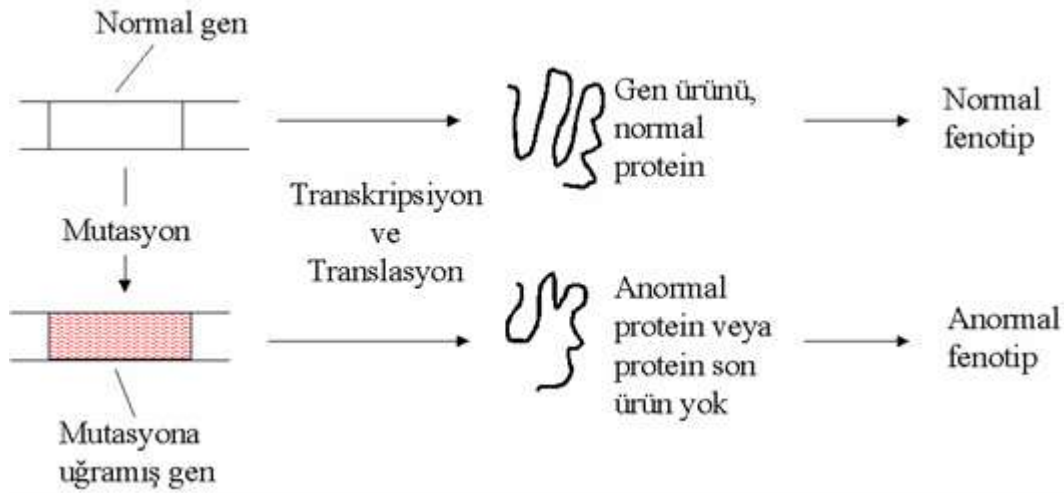
Genetik mesaj proteinlere aktarıldıktan sonra, bu proteinlerin hücre içindeki (veya hücre dışındaki) görev yerlerine nakledilerek yapısal veya fonksiyonel birimler olarak iş görmeleri gerekir. Proteinler görev yerlerine özel **sinyal (hedefleme) dizilerinin** yardımıyla taşınır. Sözelimi endoplazmik retikuluma girecek proteinler amino ucunda bir sinyal dizisine sahiptir. Protein, bir yandan sentezlenirken bir yandan endoplazmik retikuluma girer. Giriş tamamlandıktan sonra sinyal dizileri **sinyal peptidaz** tarafından koparılır. Daha sonra Golgi kompleksi aracılığıyla son görev yerlerine gönderilirler. Mitokondri, kloroplast ve çekirdeğe gidecek proteinler görev yerlerine girişe yardım edecek **transit dizisi** denilen özel amino asit dizilerine sahiptirler. Tamamen sentezlendikten sonra hedef organelere geçerler. İlgili organelere girildiğinde (mitokondri veya kloroplast)

transit dizisi uzaklaştırılır. Çekirdek proteinlerinde ise transit dizisi kalıcıdır, hücre bölündüğünde yeni hücrelerde bu proteinlerin tekrar çekirdeğe geçişinde görev yaparlar. Prokaryotlarda da özellikle hücre dışına (hücre zarı dışına) salgılanacak proteinlerde özel sinyal dizileri mevcuttur.

Bütün bu özetlenen genetik bilgi transferi olaylarının sonunda, (replikasyon, transkripsiyon, translasyon, görev yerine nakil, fonksiyon) DNA'daki genetik bilgi, belli görevleri yapan RNA molekülleri ve proteinler şeklinde hücrede ilgili bölgelere iletilmekte ve hücre, atalarından gelen bir tarzda canlılık denilen aktivitelerini sürdürmektedir. Test edebildiğimiz veya iletişim kurabildiğimiz bütün organizmalarda genetik bilgi akışını özendirici mekanizmaların varlığını biliyoruz. Böylece genetik bilgi, sadece bir bireyi hayatta tutmakla sınırlı kalmayıp olabildiğince uzun süre kendi varlığını sürdürmek üzere de olayları yönlendirir. Bireyler yeterince uzun süre hayatta kalamadıklarına göre peşpeşe yeni bireylerin üretilmesi gerekmektedir ki genetik bilgi organizmaları üreme denilen süreçle daima yeni bireyler oluşturmaya yönlendirir. Bir bakıma bireyler, genetik bilginin zaman boyunca güvenli bir şekilde varlığını sürdürdüğü araçlardır. Kullanılmakta olan bir araç, eskiyeceğinden eski araçların (yaşlı birey) yerini almak üzere yenileri oluşturulur. "Genetik bilgi böylece kendi varlığını sürdürmek üzere bireyleri kullanır" (R. Dawkins, Gen Bencildir, TÜBİTAK, 1995).

7 GEN MUTASYONLARI

Genetik materyalin, DNA replikasyon sürecinin mükemmel işleyişinden dolayı hücreden hücreye ve nesilden nesile değişmeden aktarıldığı önceki bölümlerde anlatılmıştı. Bu genellemeye rağmen genetik materyal bazı yollarla değişebilmektedir. Bu yollardan başlıcaları kendikendine değişme, replikasyon hataları, bazı kimyasallar ve radyasyondur. Geniş anlamda iki tip genetik materyal değişimi mümkündür: Bütün bir kromozomla ilgili değişimler (**kromozom mutasyonları** veya kromozom kusurları) ve bir veya birkaç baz çiftinin değişmesi. Bütün organizmalar baz çifti değişikliklerini tamir eden mekanizmalara sahiptirler. Fakat bütün baz çifti değişimleri her zaman tamir edilememektedir. Tamir edilemeyen değişiklikler **baz çifti mutasyonları** olarak adlandırılır. Baz çifti mutasyonları bir organizmanın genomunun herhangi bir yerinde meydana gelebilir. Organizmaların genomlarının bütün bölgeleri genleri taşımadığından genlerde veya kontrol bölgelerinde meydana gelmedikçe baz çifti mutasyonları belli bir fenotipik değişikliğe neden olmaz. Dolayısıyla genetikçiler için önemli olan mutasyon, genleri etkileyen mutasyonlardır ve **gen mutasyonları** olarak adlandırılırlar. Bunun da ötesinde hücresel fonksiyon, proteinlerin bir sonucu olduğu için protein kodlayan genlerin ekspresyonunu etkileyen mutasyonlara daha fazla ilgi duyulmuştur (Şekil 7.1).



Şekil 7.1: Mutasyon kavramının şematik gösterimi.

7.1 Mutasyonların Tanımlanması

Mutasyon DNA baz çifti değişimi veya kromozomal değişimlerdir. **Baz dizisi** değişimleri baz çifti eklenmesi, silinmesi, baz çifti değişimi (AT→GC, AT→TA ...), bir grup baz çiftinin ters dönüşü ve bir baz çifti veya belli bir grup baz çiftinin yeni bir pozisyona transferini içerebilir. Çok hücreli organizmalarda mutasyon eğer somatik hücrelerde meydana gelirse sadece ilgili bireyin ilgili hücrelerini ve dokusunu etkiler, yani yeni nesillere aktarılmaz. Bu tip mutasyonlar **somatik mutasyonlar** olarak adlandırılır. Eğer mutasyon eşeyli üreyen organizmaların germ (eşey) hücrelerinde meydana geldiyse gametler aracılığıyla yeni nesillere aktarılır. Bu tip mutasyonlar **germ hattı mutasyonları** (eşey hü-

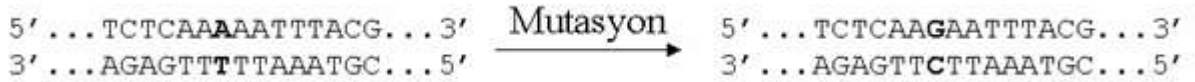
resi mutasyonları) olarak adlandırılır. Somatik mutasyonlar, mutasyonun meydana geldiği bireyi etkiliyorken germ hattı mutasyonları gelecek nesilleri etkiler. Eşeysiz üreyen çok hücreli organizmalarda somatik mutasyonlar yeni nesillere aktarılabilir. Prokaryotlarda ise vücut hücresi-eşey hücresi gibi bir ayırım olmadığından bütün mutasyonlar yeni hücrelere (yani nesillere) aktarılır.

Bir kromozomun organizasyonundaki bir değişiklik **kromozom mutasyonu** veya **kromozom kusuru** olarak adlandırılır. Bir gen dizisi içindeki mutasyon ise **gen mutasyonu** olarak adlandırılır. Gen mutasyonlarına baz çifti değişimi, bir veya daha fazla baz çiftinin eklenmesi veya silinmesi gibi DNA dizisindeki değişiklikler neden olur.

Mutasyonlar doğal olarak kendiliğinden meydana gelebilir. Mutajenler uygulanarak mutasyonların uyarılması da mümkündür. Bir **mutajen** kendiliğinden oluşan mutasyon oranının üzerinde bir mutasyon sıklığını oluşturan fiziksel ve kimyasal ajanlardır. Mutajenlerin uygulanmasıyla oluşan mutasyonlara **uyarılmış mutasyon** denir. Doğal olarak oluşan mutasyonlar da **kendiliğinden mutasyonlar** olarak adlandırılır. Uyarılmış ve kendiliğinden mutasyonlar arasında kesin bir sınır oluşturmak mümkün değildir. Bir polipeptitin dördüncül yapısı (fonksiyonel formu) birincil amino asit dizisi tarafından belirlenir (Birincil amino asit dizisi de bir gen tarafında kodlanır). Bir mutant suş tarafından sentezlenen bir polipeptit yabancı tip polipeptitten yapısal olarak farklı olabilir. Eğer farklı ise mutant polipeptit kısmen fonksiyonel olabilir, fonksiyonsuz olabilir veya hiç üretilmez.

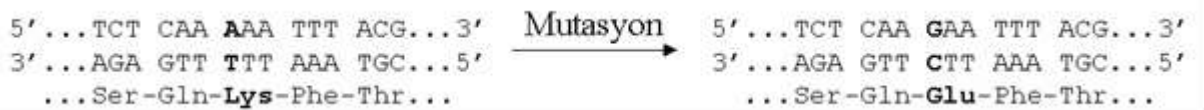
7.2 Gen Mutasyonu Tipleri

1. **Baz çifti değişim mutasyonu (nokta mutasyon):** Bir gendeki bir baz çiftinin diğer bir baz çiftine değişmesidir. Bütün olasılıklar mümkündür: AT→GC, AT→TA, GC→CG, GC→TA...



2. **Proteinin amino asit dizisindeki etkisine göre mutasyonlar:**

a) **Yanlış anlamlı (missense) mutasyonlar:** Bir baz çifti değişimi sonucu mRNA üzerinde farklı bir amino asiti kodlayan farklı bir kodon oluşumuna dolayısıyla fenotipik bir değişikliğe neden olan mutasyonlardır. İnsanlarda β -globin geninin 6. kodonundaki bir baz çifti değişimi orak hücre anemisine neden olmaktadır.

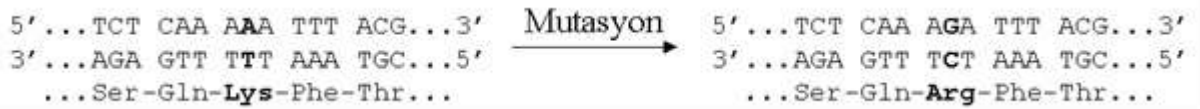


b) **Anlamsız (nonsense) mutasyonlar:** DNA üzerinde bir baz çifti değişimi sonucu mRNA'da normalde bir amino asiti kodlayan bir kodonun yerine bir sonlanma kodonunun (UAG, UAA, UGA) oluşmasıdır. Zincir içinde oluşan bu sonlanma kodonu

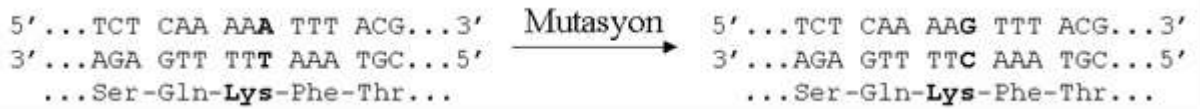
polipeptit zincirinin tamamlanmasını engeller ve fonksiyonsuz bir polipeptit oluşumuna neden olur.



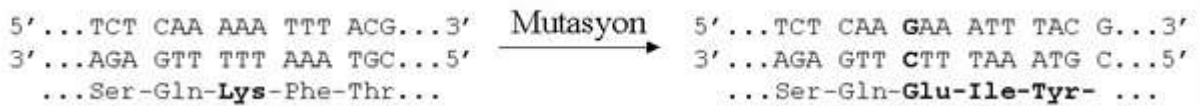
- c) **Nötral mutasyonlar:** DNA dizisindeki bir baz çifti değişimi sonucu oluşan yeni kodonun yabancı tip kodondan farklı bir amino asiti kodlamasına neden olan mutasyonlardır. Ancak yeni kodlanan amino asit ile yabancı tip amino asitin kimyasal ve yapısal özelliklerinin aynı olması nedeniyle, protein fonksiyonunda bir değişikliğe neden olmazlar. Sözelimi arjinin→lizin değişiminde her ikisi de bazik amino asitler olduğundan proteinin fonksiyonu değişmez.



- d) **Sessiz (silent) mutasyon:** DNA yapısında bir baz çifti değişir ve mRNA'da yeni bir kodon oluşur. Ancak yeni oluşan kodon ve yabancı tip kodon aynı amino asiti kodlar (dejenere kodonlar!). Dolayısıyla mutasyon protein yapısına aktarılmaz. AAA ve AAG lizini kodlar.



- e) **Satır kayma mutasyonu:** Bir genden bir veya daha fazla baz çiftinin silinmesi veya eklenmesi ile oluşan mutasyonlardır. Bu tip mutasyonlarda genellikle gen bölgesine daha önceki pozisyona sonlandırma kodonu eklenerek daha kısa proteinler üretilir. Yada normal pozisyondaki sonlandırma kodonu atlanarak daha uzun bir protein üretilir. Her iki durumda da protein genellikle fonksiyonsuz olmaktadır.



Eğer üç veya üçün katları kadar baz çifti çıkarılır veya eklenirse okuma satırı kaymaz ancak yapıya yeni amino asitler eklenir veya yapıdan çıkarılır.

Nokta mutasyonlar oluşturdukları fenotipe göre iki gruba ayrılırlar: İleri mutasyonlar ve geri mutasyonlar. **İleri mutasyonlar** yabancı tip fenotipi mutant fenotipe dönüştüren mutasyonlardır. **Geri (ters) mutasyonlar** ise mutant bir fenotipi yabancı tip fenotipe dönüştüren mutasyonlardır. Ters mutasyonda mutant amino asit yabancı tip amino asite dönüştürülerek tam bir dönüş sağlanabilir. Bu olay **reversiyon** olarak ad-

landırılır. Ters mutasyonlarda yabancı tipe değil de diğer bir amino asite değişim ile kısmi bir reversiyon sağlanabilmektedir. Bir mutasyon başka bir gende meydana gelen diğer bir mutasyon sonucu yabancı tipe dönüştürülebilir. Bu tip genler (bir mutasyonu yabancı tipe dönüştüren genler) **baskılayıcı (represör) gen** adını alır.

7.3 Mutasyonların Nedenleri

Mutasyonlar kendiliğinden oluşabilir veya uyarılabilir. Kendiliğinden oluşan mutasyonlar hücrel süreçlerdeki hatalar sonucu veya güneşten gelen ultraviyole ışınları gibi çevresel nedenlerle oluşur. Uyarılmış mutasyon ise belli fiziksel ve kimyasal ajanların uygulanmasıyla oluşturulur.

7.3.1 Kendiliğinden (spontan) mutasyonlar

Organizmalarda kendiliğinden mutasyonlar oluşur. Bu mutasyonların nicel ölçüsü olarak iki kavram kullanılır: mutasyon oranı ve mutasyon sıklığı. **Mutasyon oranı** belli bir zaman biriminde belli bir mutasyonun oluşma olasılığıdır. Yani her bir nesilde mutasyon meydana gelen gen sayısı gibi. *Drosophila melanogaster*'de belirlenen kendiliğinden mutasyon oranı 10^{-4} ila 10^{-5} gen⁻¹ nesil⁻¹'dir. İnsanda bu oran 10^{-4} ila $4 \cdot 10^{-6}$ gen⁻¹ nesil⁻¹'dir. Bakterilerde ve bakteriyofajlarda mutasyon oranı 10^{-4} ila 10^{-7} gen⁻¹ nesil⁻¹'dir. **Mutasyon sıklığı** ise belli bir gen bakımından mutant bireylerin veya hücrelerin bütün popülasyon içindeki sıklığıdır. 100 000 organizma içindeki mutant birey sayısı veya 1 000 000 gamet içindeki mutant gamet sayısı gibi.

Kendiliğinden mutasyonun birçok nedeni olabilir. Bunlardan DNA replikasyon hataları, DNA içinde kendiliğinden kimyasal değişimler ve transpozibil (yer değiştirici) genetik elementlerin hareketi en önemli nedenlerdir.

Replikasyon hatalarının bir nedeni DNA yapısına katılan bazların nadir formlarının (totomerlerinin) alışılmadık eşleşme özellikleridir. Totomer C normal A ile totomer T normal G ile totomer A normal C ile ve totomer G normal T ile eşleşebilir. Bu yanlış eşleşmeler DNA polimerazlar tarafından düzeltilir, ancak düzeltilemeyenler bir nokta mutasyona neden olurlar. Replikasyon sırasında ayrıca kalıp zincirin kısa bir bölgeden halkasallaşmasıyla silinme (delesyon) ve yeni sentezlenen zincirin halkasallaşmasıyla da eklenme meydana gelir. Bu silinme ve eklenme sayısı üç baz veya katları değilse satır kayma mutasyonu oluşur. (Eklenme ve silinme de mutasyondur!).

DNA molekülünde kendiliğinden kimyasal değişimler de diğer bir önemli mutasyon nedenidir. Bunlardan ikisi deaminasyon ve depurinasyondur. **Deaminasyon** olayında A ve G (purin bazları) DNA yapısından uzaklaştırılır. Her bir DNA molekülünde binlerce kayıp oluşabilir. Eğer bu boşluklar tamir edilemezse replikasyon sırasında baz dizisinde değişiklikler oluşacaktır. **Deaminasyon** ise bir bazdan bir NH₂ grubunun uzaklaştırılması işlemidir. C'in deaminasyonu sonucu U oluşur (dU, DNA yapısında urasil!). Eğer bu U yapıdan uzaklaştırılmazsa A ile eşleşir. Başlangıçta CG olan baz çifti bu olay sonucu TA baz çiftine dönüşür. Prokaryotik ve ökaryotik genomlardaki sitozinlerin küçük bir kısmı **5-metil sitozin (5^m C)** şeklindedir. Normalde 5^m C, G ile eşleşir. Ancak 5^m C'in deaminasyonu sonucu T oluşur. T genomun normal bir bazı olduğu için tamir mekanizmalarınca değiştirilemez. Sonuç olarak başlangıçta CG olan baz dizisi TA şekline dö-

nüşür. Genomun 5^m C bulunan bölgeleri daha yüksek oranda mutasyona maruz kalırlar. Bu 5^m C bölgelerine **mutasyonel sıcak benekler** denir.

7.3.2 Uyarılmış mutasyonların nedenleri

Kendiliğinden mutasyonların oranı çok düşük olduğundan genetikçiler belli bir gen bakımından mutant olan bireylerin sıklığını artırmak üzere mutajenler kullanırlar. Bunlardan en yaygın olanlarından ikisi radyasyon ve kimyasallardır.

Mutasyonları uyarmak üzere X ve u.v. ışınları kullanılır. **X ışınları** tarafından üretilen iyonize radyasyon moleküller arasındaki kimyasal bağları kopararak kromozom kırılmalarını, kromozom yeniden düzenlenmelerini ve nokta mutasyonları uyarır. **u.v. ışınları** iyonize değildir. Yine de DNA yapısında fotokimyasal değişikliklere bağlı olarak mutasyonlara neden olur. u.v. ışınlarının en önemli etkilerinden biri pirimidinler arasında anormal (kovalent) bağlar oluşturmalarıdır. Bu bağlar büyük çoğunlukla aynı zincir üzerinde peş peşe iki timin arasında oluşur ve bu yapı **timin dimerleri** olarak adlandırılır. Timin dimerleri genellikle tamir edilebilir. Tamir sırasında bazen mutasyonlar oluşabilmektedir.

Bir çok kimyasal, mutasyonları uyarır. Bunlardan en önemli üçü baz analogları, baz modifiye edici ajanlar ve aralayıcı ajanlardır (Tablo 7.1). **Baz analogları** için tipik örnek 5-bromurasil (5BU)'dir. 5BU timinin bir nadir formudur fakat A ile eşleşebildiği gibi G ile de eşleşebilir. Replikasyon sırasında 5BU:A çifti C:G çiftine dönüşebilmekte ve sonuçta bir nokta mutasyona neden olmaktadır. **Baz modifiye edici ajanlar** doğrudan DNA'daki bazı değiştirebilmektedir. Bu ajanlara tipik örnekler nitrik asit (HNO₃), hidroksilamin (NH₂OH) ve alkilleyici ajanlardır. Bu mutajenlerin etki mekanizmaları aşağıda gösterilmiştir (Tablo 7.1).

Tablo 7.1: Mutasyonları uyaran bazı kimyasallar ve etki şekilleri.

Orijinal Baz	Mutajen	Modifiye Baz	Eşleştiği Baz	Tahmini Değişiklik
Guanin	Nitrik asit	Ksantin	Sitozin	-
Sitozin	Nitrik asit	Urasil	Adenin	CG→TA
Adenin	Nitrik asit	Hipoksantin	Sitozin	AT→GC
Sitozin	Hidroksilamin	Hidroksiyalaminositozin	Adenin	CG→TA
Guanin	Metilmetansulfonat (MMS)(alkilleyici ajan)	O6 Metilguanin	Timin	GC→AT
Timin	MMS	O6 Metiltimin	Guanin	TA→CG

Aralayıcı ajanlar ise aynı zincirdeki iki baz arasına girerler. Replikasyon sırasında bu ajanlar nedeniyle bir baz eklenmesi veya eksilmesi gerçekleşir. Sonuçta da bir satar kaymasına neden olur. Aralama olayı kalıp zincirde olursa yeni zincire fazladan bir baz eklenir, yeni zincirde olursa bir baz silinir.

7.4 DNA Tamir Mekanizmaları

Kendiliğinden veya uyarılarak oluşan mutasyonlar hücrenin veya organizmanın DNA'sında hasara neden olur. Bu hasar özellikle yüksek doz mutajenler kullanıldığında oldukça fazla olabilmektedir. Prokaryotik ve ökaryotik hücreler DNA hasarı ile başa çıkmak için çok sayıda tamir sistemine sahiptir. Bunlardan bazıları DNA polimeraz kontrol okuma tamiri, fotoreaktivasyon veya ışık tamiri, koparma tamiri, yanlış eşleşme tamiri ve SOS tepkisidir. Bu tamir sistemlerinden bir veya birkaçı bir arada çalışarak meydana gelen hataları düzeltirler. Ancak nadir olarak bu tamir mekanizmalarından kaçabilen mutasyonlar yeni nesillere taşınırlar. Bu sistemlerden sadece SOS sistemi, kendisinin yürüttüğü tamir işlemi sırasında mutasyonlara neden olabilir. SOS sistemi eğer hücrenin veya organizmanın DNA'sı ağır şekilde hasar gördüyse devreye girer. Böyle bir durumda yok olmaktansa mutasyona razı olmak gibi bir tercih yapılır.

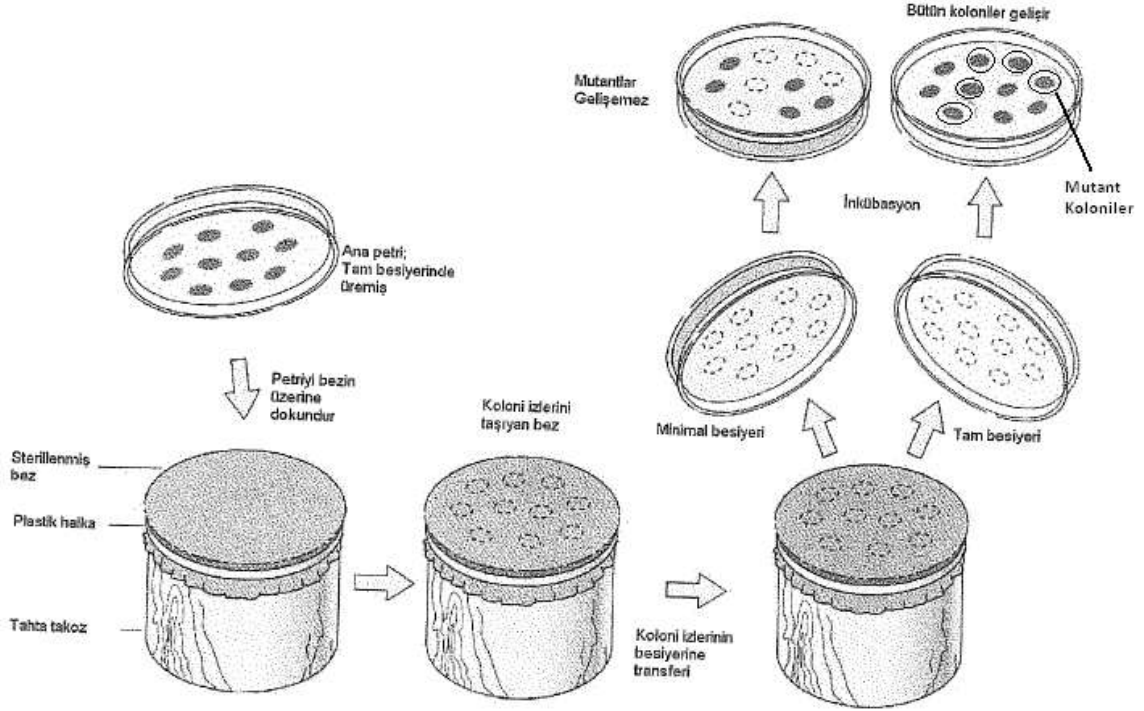
7.5 Mutasyonların İzolasyonunda Görüntüleme Yöntemleri

Görülebilir mutasyonlar organizmanın fiziksel görünüşünü ve morfolojisini etkiler. Göz rengi, kanat şekli, koloni büyüklüğü ile ilgili mutasyonlar doğrudan gözlenebilir. Bir mutasyon sonucu eğer mutant hücreler bir avantaj kazanırsa (antibiyotik direnci gibi) bu avantaj kullanılarak izole edilebilirler. Fakat bütün mutasyonlar doğrudan gözlemlenebilir olmayabilir ve avantaj da sağlamayabilir.

7.5.1 Besin mutantları

Organizmaların gelişmesi için esasi olan bir besinin sözelimi bir amino asitin sentezini etkileyen mutasyonlara **oksotrof mutasyon** veya **besin mutasyonu**, ilgili organizmaya da **besin mutanti** veya **oksotrof** denir. Oksotrof mutasyonlar ilgili organizmaya özel bir fiziksel farklılık veya avantaj sağlamaz aksine dezavantajlı bir durum oluşur. Dolayısıyla bunların izolasyonu için özel yöntemler gerekir. (Minimal besiyerinde ilave bir besine ihtiyaç duymadan gelişebilen yabancı tip organizmalar prototrofturlar).

Besin mutantlarının izolasyonunda kullanılan yöntemlerden biri **replika ekim yöntemi** olarak adlandırılır. Sözelimi arjinin amino asitini sentezleyemeyen bir mutant bakteri arjinin bulunmayan bir ortamda gelişemeyecektir. Ortama arjinin konulduğunda ise hem yabancı tipler hem de mutantlar gelişecektir. Dolayısıyla mutantı doğrudan izole etmek mümkün olmayacaktır. Replika ekim yönteminde ilgili besinin de bulunduğu bir besiyerine mutantların da bulunduğu düşünülen bakteri popülasyonu ekilir. Bu besiyerinde mutant ve yabancı tiplerin her ikisi de gelişir (Şekil 7.2). Bu ana petrideki kolonilerin konumları değiştirilmeksizin iki besiyerine her koloniden ekim yapılır. Bu besiyerlerinden biri ilgili besini içeren tam besiyeri, diğeri de ilgili besini içermeyen minimal besiyeridir. Mutantlar tam besiyerinde üreyecek, minimal besiyerinde üremeyecektir. Minimal besiyerinde konumu boş olan koloni veya koloniler tam besiyerinde belirlenir ve mutant olarak izole edilir.



Şekil 7.2: Replika ekim yöntemi ile oksotrof mutantların izolasyonu.

7.5.2 Şartlı mutasyonlar

Bazı gen ürünleri, sözgelimi DNA polimeraz ve RNA polimeraz, hücreler için esasi olan süreçleri yürüttüklerinden (DNA ve RNA besin ortamından alınamaz!) mutasyonla aktiviteleri sıfırlandığında hücre hayatta kalamaz. Bu tip mutasyonlara **letal mutasyonlar** veya **öldürücü mutasyonlar** denir. Bu tip genler için ancak şartlı mutasyonlar elde edilebilir. **Şartlı mutantlar** belli bir şartta normal fenotipi gösterirken diğer bir şartta öldürücü fenotipi gösterir. Şartlı mutasyonlar ilgili genin yapısında meydana gelen nokta mutasyon sonucu bu genin kodladığı polipeptitin amino asit dizisinde meydana gelen bir amino asit farklılığından kaynaklanır. Bu amino asit değişimi, belli bir şartta proteinin fonksiyonel forma dönüşünü engellerken diğer şartlarda fonksiyonel forma dönüşü sağlayabilir. Dolayısıyla organizma bir şartta normal fenotipi, diğer şartta öldürücü fenotipi gösterir. Bu tip mutantlara tipik olarak **sıcaklık duyarlı mutantlar** örnek verilebilir. Böyle bir sıcaklık duyarlı mutant hücrede sözgelimi 28°C'de protein fonksiyonel forma dönüşür, organizma normal fenotipi gösterir, 30°C'nin üzerinde ise protein fonksiyonel forma dönüşemediği için ölür. Bu gen bakımından yabancı tip olan hücreler ise hem 30°C'de ve hem de 28°C'de yabancı tip fenotipi gösterir, hayatta kalır.

8 GEN EKSPRESYONUNUN DÜZENLENMESİ

Bir organizmanın sahip olduğu genlerin tamamı organizmanın hayatı boyunca sürekli olarak ve aynı miktarlarda anlatılmaz (ekspresyonu yapılmaz). Genlerden bazıları ürünlerine sürekli olarak ihtiyaç duyulan genlerdir ve sürekli olarak ekspresyonları yapılır. Bu tip genlere **yapısal genler (temel, asli genler)** denmektedir. Organizmaların iç ve dış çevresinden gelen sinyallere uygun olarak diğer bazı genlerin ekspresyonları yapılır veya yapılmaz; ekspresyonları yapılıyorsa yine bu sinyallere uygun olarak ne kadar yapılacağı da belirlenir. Bu tip genlere de **düzenlenebilir genler** denmektedir. Yine diğer bir grup gen, özellikle gelişmiş ökaryotlarda bireysel gelişme basamaklarının belli zamanlarında ifade edilmektedir (ekspresyonları yapılmaktadır). Bu tip genlerin ekspresyon modelleri gelişme genetiği alanının konusu olup burada söz edilmeyecektir. Bu bölümde, prokaryot ve ökaryotlarda düzenlenebilir genlerin düzenleniş mekanizmaları, bazı örnek modeller üzerinden anlatılacaktır.

8.1 Bakterilerde Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Organizmaların yaşadığı çevrelerdeki bütün şartlar sabit değildir. Değişen çevresel şartlara uyum sağlayarak farklı çevrelerde hayatsal faaliyetlerini sürdürebilirler. Şartlar değiştiğinde yeni şartlarda gerekli olan proteinleri kodlayan genlerin aktivitelerini ayarlarlar. Bu tarz, yani değişen ortam şartlarına göre genlerin aktivitelerinin ayarlanması mikroorganizmalar arasında daha yaygındır.

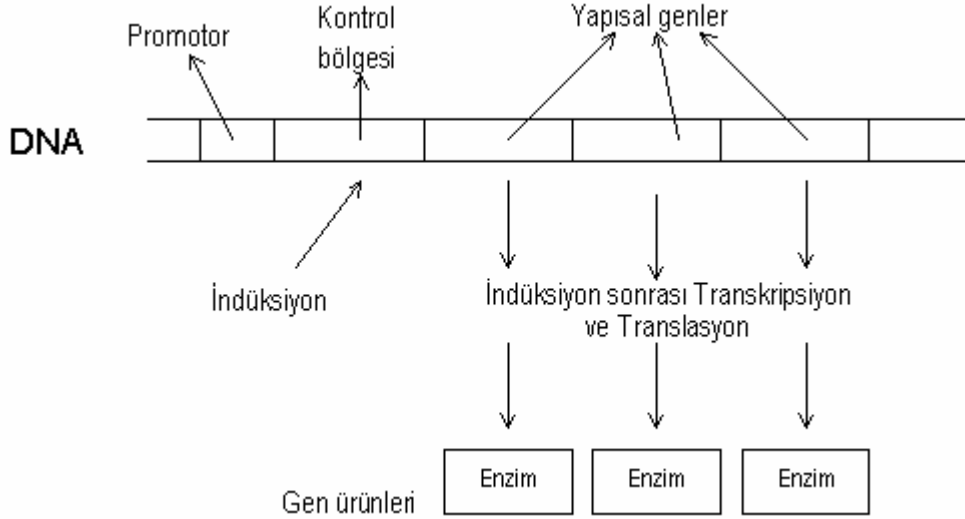
Prokaryotlarda, sentezlenecek gen ürünlerinin hangileri olacağı, gen ekspresyonunu (gen anlatımını) kontrol eden düzenleyici mekanizmalar tarafından belirlenir. Bir hücre veya organizmanın, ihtiyaca göre ekspresyonları kontrol edilen genleri **düzenlenebilir genler** olarak adlandırılır. Düzenlenebilir genlerin ürünleri organizmaya, spesifik şartlar mevcut olduğunda gereklidir. Ancak diğer bir grup gen ürünü hücrede temel hayatsal faaliyetlerin yürütülmesi için gerekli olup gelişmekte olan hücrelerde bu genler daima aktiftir (ekspresyonları gerçekleştirilir). Bu tip genlere **konstitutif (temel, asli) genler** denir.

8.1.1 *E.coli* 'de laktöz genlerinin ekspresyonunun düzenlenişi

Ortama bir madde eklendiğinde ekspresyonu (anlatımı) başlatılan genler **indüklenabilir genler** olarak adlandırılır. Bir genin indüksiyonuna neden olan düzenleyici madde **indüser (indükleyici)** olarak adlandırılır. İndüserlerin de dahil olduğu düzenlenebilir genlerin kontrolünde rol alan küçük molekül grubuna **effektörler** denir, yani indüserler effektörler olarak adlandırılan bir molekül grubuna dahildir. Effektörler indükleyici veya baskılayıcı (represör) olarak iş görürler.

Şekil 8.1'de indüklenebilir bir gen bölgesi görülmektedir. Bu DNA bölgesinde indüklenebilir genler vardır. Bu DNA segmentinde promotor bölgesiyle indüklenebilir genler arasında bir kontrol bölgesi vardır. Düzenleme ile ilgili olaylar bu kontrol bölgesinde gerçekleşir. Kontrol bölgesine bağlı durumda bir protein (baskılayıcı protein) var-

sa ekspresyon gerçekleşmez. Ortamda indükleyici varsa, baskılayıcı proteinle etkileşir ve kontrol bölgesinden ayrılmasını sağlar. Baskılayıcı protein kontrol bölgesinden ayrıldığında RNA polimeraz promotora bağlanır, transkripsiyon ve translasyon yani ekspresyon gerçekleşir.



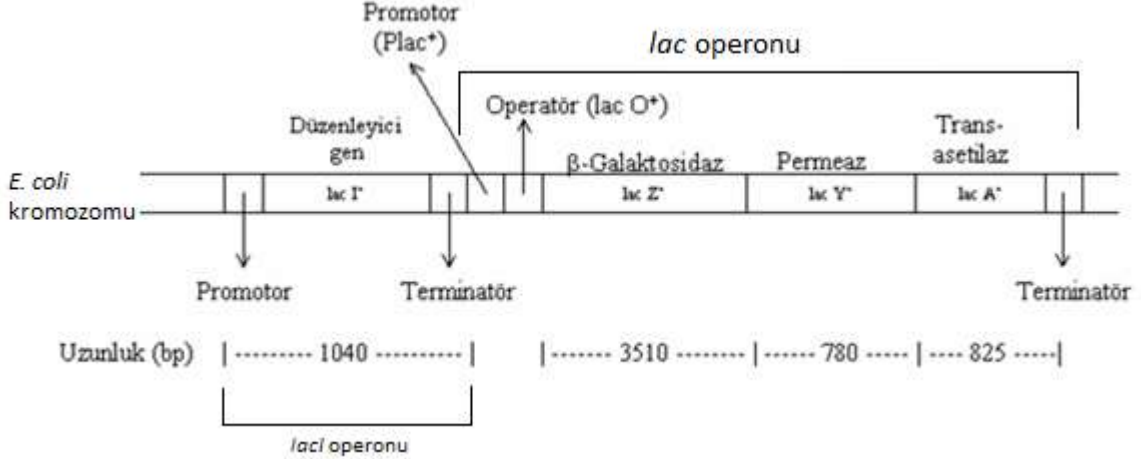
Şekil 8.1: İndüklenebilir bir gen bölgesinin organizasyonu

E. coli hücreleri temel mineralleri ve glukoz gibi bir karbon kaynağını içeren besiyerine konduğunda bütün hücresel yapıtaşlarını sentezleyebilirler. Enerji ihtiyacı da glukozun konstitütif olarak sentezlenen enzimler tarafından yıkılması ile sağlanır. Eğer glukoz yerine laktoz gibi diğer bir şeker ortama konulursa bu şekerin metabolizasyonu için (glukoz+galaktoza dönüştürülmesi için) gerekli olan birkaç enzim hızla sentezlenir. Dolayısıyla bu şekerin varlığı, bu enzimleri kodlayan genlerin ekspresyonunu indükler. Aynı metabolik yolda görev alan enzimleri kodlayan bazı genlerin ekspresyonunun birlikte düzenlendiği bilinmektedir, bu olay **koordineli indüksiyon** olarak adlandırılır.

Laktoz ortama konduğunda (glukoz yok!) üç enzimin koordineli olarak indüklendiği belirlenmiştir. β -galatosisidaz, laktoz permeaz ve transasetilaz. β -galaktosisidaz *lacZ* geni tarafından kodlanır ve laktozu glukoz ve galaktoza parçalar. Ayrıca laktozun alloktoz formuna dönüşümünü sağlar. Laktoz permeaz *lacY* geni tarafından kodlanır ve hücre zarından laktozun geçişini sağlar. *lacA* tarafından kodlanan transasetilaz enziminin laktoz metabolizmasındaki rolü tam olarak anlaşılabilmiş değildir.

Laktoz metabolizması enzimlerini kodlayan genlerin ekspresyonunun düzenlenmesi üzerine çalışmalar Jacob ve Monod tarafından (1961) gerçekleştirilmiştir. Bu genleri taşıyan DNA segmenti, düzenleyici bölge ve yapısal gen bölgelerinden meydana gelmiştir. Yapısal gen bölgesinde *lacZ⁺*, *lacY⁺* ve *lacA⁺* genleri yer alır. *lacZ⁺* geninin yukarısında düzenleyici bölge bulunur (Şekil 8.2). Düzenleyici bölgenin başlangıcında bir promotor bölgesi (P_{lac}) vardır. Promotor bölgesi ile yapısal gen bölgesi arasında bir operatör bölge (*lacO⁺*) yer alır. Laktoz metabolizması enzimlerinin transkripsiyonunda rol alan, yapısal genler, promotor ve operatör bölgeleri transkripsiyon birimini oluşturur. Bir transkripsiyon birimi operon olarak adlandırılır. Yani *bir veya bir grup genin ekspresyonundan sorumlu yapısal gen, promotor ve operatör bölgelerini içeren DNA bölgesi operon olarak adlandırılır.*

Bakteri hücresinde laktoz bulunmadığında (ortamda yok demektir), laktoz operonunun hemen yukarısında yer alan bir operonun *lacI*⁺ yapısal geni tarafından kodlanan ve baskılayıcı protein denilen bir protein *lacO*⁺ bölgesine bağlanır (Şekil 8.2). Baskılayıcı protein operatöre bağlı iken RNA polimeraz promotora bağlanamaz ve dolayısıyla yapısal genlerin transkripsiyonu engellenmiş olur.



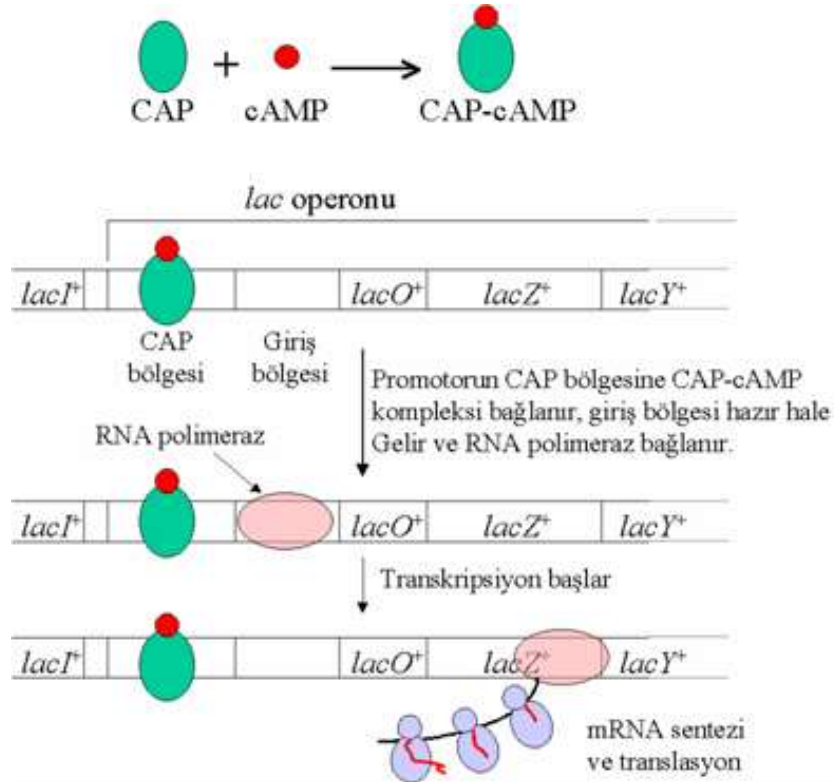
Şekil 8.2: *E. coli lac* genlerinin ve kontrol elementlerinin organizasyonu.

Ortama laktoz verildiğinde permeaz tarafından hücreye alınır. Hücreye alınan bu laktozun az bir kısmı hücrede düşük seviyelerde bulunan β-galaktosidaz tarafından allolaktoza dönüştürülür. Allolaktoz operatörde bağlı bulunan baskılayıcı proteine bağlanır. Bu bağlanma sonucu baskılayıcı proteinin konformasyonu değişir ve operatörden ayrılır. Operatör boş iken RNA polimeraz promotora bağlanır ve yapısal gen bölgesinden mRNA sentezi gerçekleştirilir. Dolayısıyla *lac* operonunun ekspresyonu allolaktoz (indükleyici) tarafından teşvik edilir, olay **indüksiyon** olarak adlandırılır. İndükleyici yokluğunda *lac* operonunun bir baskılayıcı protein tarafından bloke edildiği için indüksiyon bir negatif kontrol olarak kabul edilir.

Jacob ve Monod'un *E. coli lac* operonunun negatif kontrol altında olduğunu söyledikleri modellerini açıkladıktan yıllar sonra, *lac* operonunun aynı zamanda pozitif kontrol altında da olduğu gösterildi. Yani bir düzenleyici sistem, operonunun ekspresyonunu başlatır (baskılayıcı protein gibi durdurmaz).

E. coli, bulunduğu ortamdaki en uygun karbon kaynağını tercih eder. Glukoz bu bakteri için en tercih edilen karbon kaynağıdır. Ortamda sözelimi glukoz+laktoz olduğunda, laktoz mevcudiyetine rağmen *lac* operonunun baskılanır. Bu olay **katabolit represyonu** veya **glukoz etkisi** olarak bilinir (Şekil 8.3). Ortamda glukoz yokken (laktoz mevcut) cAMP üretimi uyarılır, cAMP seviyesi yükseldikçe **katabolit gen aktivatör protein (CAP)** denilen bir protein ile cAMP birleşerek bir kompleks oluşturur. CAP-cAMP kompleksi *P_{lac}* bölgesinin içinde yer alan **CAP bağlanma bölgesi** denilen diziyeye bağlanır. Bu bağlanma gerçekleştiğinde, RNA polimerazın *P_{lac}* bölgesine daha güçlü bağlanması sağlanır ve yapısal genlerin ekspresyonu daha hızlı gerçekleştirilir. Ters durumda yani ortamda glukoz mevcutken (glukoz+laktoz) cAMP seviyesi dolayısıyla CAP-cAMP kompleksi seviyesi düşer, CAP bağlanma bölgesi boşalır. Bu şartlar altında ortamda indükleyici

ci allolaktöz mevcut bile olsa RNA polimeraz promotora çok zayıf olarak bağlanır ve düşük seviyelerde ekspresyon gerçekleşir.



Şekil 8.3: Glukoz duyarlı operonlarda (*lac* operonu gibi) cAMP'nin rolü.

8.1.2 *lac* mutantları

lac operonunda farklı bölgelerde meydana gelen mutasyonlar *lac* genlerinin işleyişini farklı şekillerde etkiler. Bunlardan bazı örnekler şu şekilde özetlenebilir:

lacZ : Sadece β -galaktosidaz enzim aktivitesi gözlenmez.

lacY : Sadece laktoz permeaz aktivitesi yoktur.

lacO^c: Konstitutif operatör mutasyonu. Represör proteinin bağlandığı bölgede meydana gelen bir mutasyondur. Bu mutasyon sonucu operon sürekli olarak çalışır hale gelir yani konstitutif hale gelir (laktoz yokluğu şartlarında durdurulamaz).

lacI⁻ : Represör protein sentezlenemeyeceğinden *lac* operonu sürekli çalışır, yani konstitutiftir.

lacI^S: Süper represör mutasyon. Mutant baskılayıcı protein operatöre kalıcı olarak bağlanır, operon kalıcı olarak baskılanır.

lacA mutasyonu operonun normal çalışmasını etkilemez.

P_{lac} mutasyonu olması durumunda RNA polimeraz operona bağlanamayacağından operon fonksiyonsuzdur.

E. coli her ne kadar haploit ise de, bazen plazmidler üzerinde veya genomda başka bir yere integre olmuş bir şekilde bir operonun iki kopyası mevcut olabilmektedir. Bu durum **kısmi diploitlik** olarak adlandırılır. Kısmi diploit durumda farklı mutasyon

kombinasyonları oluşur. Aşağıda haploit ve kısmi diploit mutasyon kombinasyonlarına bazı örnekler verilmiştir:

$lacI^- lacO^+ lacZ^+ lacY^+$

$lacI^+ lacO^- lacZ^+ lacY^+$

$lacI^+ lacO^+ lacZ^- lacY^+$

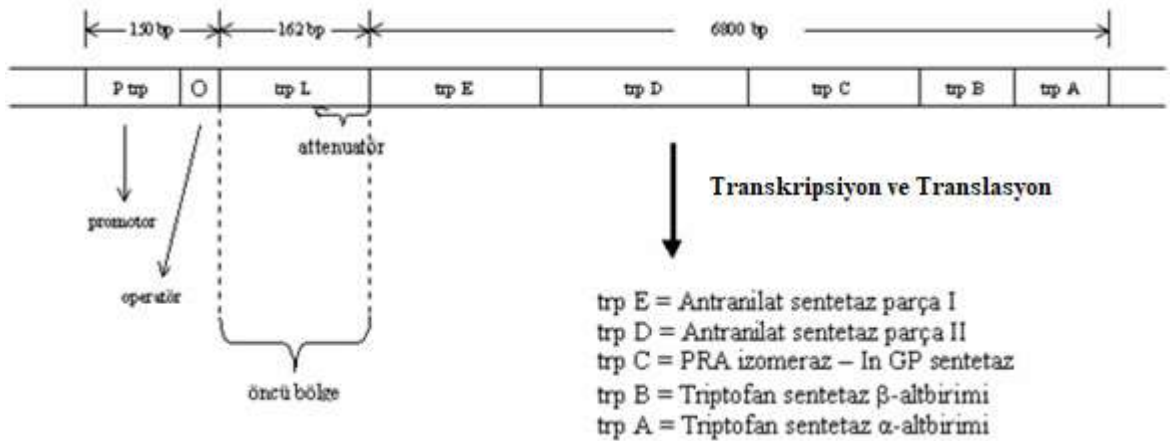
$lacI^+ lacO^+ lacZ^+ lacY^-$

$\frac{lacI^+ lacO^+ lacZ^- lacY^+}{lacI^- lacO^+ lacZ^+ lacY^-}$

8.1.3 *E. coli*'nin triptofan operonu

Protein sentezi için gerekli bütün amino asitler ortamda mevcut olmayabilir. Böyle bir durumda eksik amino asit metabolik yollarla sentezlenir. Bu tip bir metabolik yolda görevli enzimleri kodlayan genler operonlar şeklinde organize olmuşlardır. Laktoz operonunun aksine bu tip operonlar, bir amino asit ortamda mevcut olmadığında, transkripsiyona izin verirken ilgili amino asit yeterli seviyede mevcutken, operon baskılanır. Bu tip operonlara **baskılanabilir operonlar** ve olaya **repressyon** denir. Baskılanabilir operonlara tipik örnek *E. coli*'nin triptofan operonudur (*trp* operonu).

Triptofan operonunda 5 yapısal gen (*trpA* - *trpE*) vardır. Bu yapısal genler triptofan biyosentez yolunda görev alan enzimleri kodlarlar. Promotor ve operatör bölgeleri sıkı bir şekilde birbirine integre olmuş durumdadır, *trpE* geninin yukarısında yer alır (Şekil 8.4). Promotor-operatör bölgesi ile *trpE* geni arasında öncü bölge denilen bir DNA bölgesi yer alır. Öncü bölgenin nispeten *trpE* genine yakın bölgesi **attenüatör bölge** adını alır ve triptofan operonunun düzenlenişinde önemli rol oynar. Operonun tamamı 7 kb büyüklüğündedir ve beş yapısal geni içeren bir poligenik (polisistronik) mRNA üretilmesini sağlar. Bu mRNA üzerinden gen bölgelerinin her biri proteine dönüştürülür.



Şekil 8.4: *E. coli* triptofan operonunun kontrol bölgeleri ve yapısal genlerinin organizasyonu

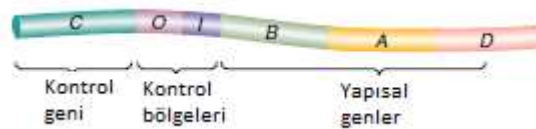
trp operonunun ekspresyonunun kontrolünde iki düzenleme mekanizması rol oynar. Mekanizmalardan biri bir baskılayıcı protein/operatör etkileşimi ile çalışır. Diğeri, bir transkripte (mRNA) yapısal genlerin katılıp katılmayacağına karar vermek esasına göre çalışır.

Operonun uzağında bir DNA bölgesinde yer alan *trpR* geni operonun düzenlenişinde rol alır. Bu genin ürünü **apopresör protein** adını alır. Ortamda triptofan yoksa veya çok düşük seviyelerde ise apopresör operatör bölgesine bağlanamaz, RNA polimeraz promotora bağlanır ve yapısal genlerin transkripsiyonu gerçekleştirilir. Eğer ortamda yeterli triptofan varsa apopresör protein triptofanla birleştikten sonra *trp* operonunun operatör bölgesine bağlanır. Bu durumda yapısal genlerin transkripsiyonu engellenir. Bu olay **represyon** (veya baskılama) olarak adlandırılır. Represyon da bir çeşit negatif düzenleme şeklidir. Represyon yolu ile *trp* operonunun transkripsiyonu 70 kat azaltılabilir.

Triptofan açlığı veya sınırlaması şartlarında ikinci bir düzenleme mekanizması devreye girer. Ağır triptofan açlığı şartlarında *trp* operonu maksimal düzeyde çalıştırılıyorken daha hafif açlık şartlarında maksimal seviyenin altında çalıştırılır. Bu tercih (maksimal ekspresyon veya daha alt düzeyde ekspresyon), operonda oluşturulan transkriptlerin (mRNA'ların) yapısal genleri taşıması veya taşınamaması sağlanarak, gerçekleştirilir. Yapısal genlerin transkripte dahil edilip edilmemesi öncü bölgeden sentezlenecek **öncü polipeptit** tamamlanıp tamamlanmamasına bağlıdır. Öncü bölge içerisinde yer alan attenüatör bölgede birkaç triptofan kodonu vardır. Ortamda triptofan seviyesi düşükse veya hiç yoksa bu öncü polipeptit tamamlanamaz (triptofan bağlanmadığı için), ve bu şartlar altında yapısal genlerin transkripsiyonu devam eder. Eğer yeterli triptofan mevcutsa öncü polipeptit tamamlanır, tamamlanmış öncü polipeptit mevcutken transkripsiyon öncü bölgede sonlandırılır, yapısal genler mRNA'ya dönüştürülmez. Bu olaya **attenüasyon** denir. Bir hücredeki (*E. coli*) yapısal genleri içeren transkript sayısı ile triptofan miktarı arasında bir ters orantı vardır. Ne kadar az triptofan varsa o kadar çok tam transkript vardır.

8.1.4 İkili pozitif ve negatif kontrol: Arabinoz operonu

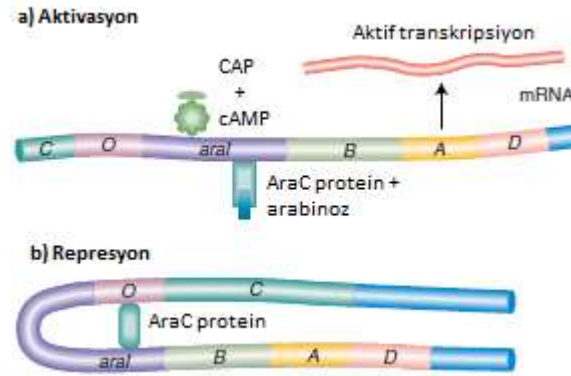
Laktoz operonunda olduğu gibi prokaryotik transkripsiyonun kontrolü sadece pozitif veya sadece negatif kontrol şeklinde olmayıp sıklıkla pozitif ve negatif kontrolün farklı yollarının bir karışımı ve eşleşmesi şeklinde gerçekleşir. Arabinoz operonunun düzenleme mekanizması tek bir DNA bağlanma proteininin ya bir represör ya da bir aktivatör olarak iş görmesine bir örnektir (Şekil 8.5).



Şekil 8.5: *ara* bölgesinin haritası. B, A ve D genleri I ve O bölgeleriyle beraber *ara* operonunu oluşturur.

Yapısal genler (*araB*, *araA* ve *araD*) arabinoz şekerini yıkan metabolik enzimleri kodlar. Bu üç genin transkripsiyonu tek bir RNA molekülü olarak tek birim şeklinde gerçekleştirilir. Transkripsiyon, başlatıcı bölge olan *araI* tarafından aktive edilir. Bu bölge bir operatör bölge ve bir promotor bölge içerir. *araC* geni operonun bitişinde yer alır ve bir aktivatör protein kodlar. Arabinoza bağlandığında bu protein *ara* operonunun transkripsiyonunu aktive eder. Bunu, muhtemelen RNA polimerazın promotora bağlanmasına yardım ederek yapar. Ayrıca *lac* operonunu düzenleyen CAP-cAMP katabolit represyon sistemi *ara* operonunun ekspresyonunu da düzenler.

Arabinoz varlığında, RNA polimerazın promotora bağlanması ve *ara* operonunun transkripsiyonunu gerçekleştirebilmesi için CAP-cAMP kompleksi ve AraC-arabinoz komplekslerinin her ikisinin de *araI*'ya bağlanması gerekir (Şekil 8.6a). Arabinoz yokluğunda, AraC proteini yeni bir konformasyon alır, *araI* ve ikinci bir operatör olan *araO*'nun her ikisine birden bağlanır. (Şekil 8.6b). Bu bağlanma gerçekleştiğinde transkripsiyona izin vermeyen bir halka oluşur ve *ara* operonu baskılanır. Dolayısıyla AraC proteini biri aktivatör diğeri de represör olarak iş gören iki konformasyona sahiptir. Allosterek efektör olan arabinozun proteine bağlanıp bağlanmamasına bağlı olarak oluşan bu iki konformasyon, operonun *araO* bölgesi içindeki spesifik bir hedef diziyeye bağlanma yeteneğinde değişikliğe neden olur.



Şekil 8.6: *ara* operonunun ikili kontrolü. a) Arabinoz varlığında, AraC proteini *araI* bölgesine bağlanır. CAP-cAMP kompleksi de *araI* bölgesinin bitişindeki bir bölgeye bağlanır. Bu bağlanma *araB*, *araA* ve *araD* genlerinin transkripsiyonunu uyarır. b) Arabinoz yokluğunda, AraC proteini *araI* ve *araO* bölgelerinin her ikisine de bağlanır, bir DNA halka yapısı oluşur. Bu bağlanma şekli *ara* operonunun transkripsiyonunu engeller.

8.1.5 Prokaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde özel durumlar

Yapısal genlerdeki genetik bilgiyi taşıyan mRNA molekülleri prokaryotlarda transkripsiyonla eşzamanlı olarak protein sentezine de katılır. Yani bir yandan mRNA sentezlenirken bir yandan ribozomlar bu mRNA'ya bağlanarak protein sentezini gerçekleştirir. Bir mRNA'ya çok sayıda ribozom bağlanabilir.

mRNA'ların hücredeki ömürleri çok kısadır. Bunun nedeni değişen şartlara hücrenin daha hızlı adapte olmasını sağlamaktır. Dolayısıyla operonlardan bir mRNA sentezlendiğinde kısa sürede yıkılır. Eğer şartlar hala değişmediyse (sözgelimi hala triptofan açığı varsa veya laktöz mevcutsa) yeni mRNA molekülleri sentezlenir.

Operonların aktiviteleri genellikle sıfırlanmaz. Çok küçük seviyede gen ekspresyonu devam eder. Sözelimi *lac* operonunda baskılayıcı protein laktoz yokluğunda sürekli olarak operatöre bağlı kalmaz. Daha uzun süre bağlı kalır ancak kısa süre için dahi olsa yapıdan (operatörden) ayrıldığı anlarda çok düşük miktarda ekspresyon gerçekleşir. Ayrıca bir operon tarafından kodlanan proteinler ilgili operonun faaliyeti dursa bile belli bir süre, parçalanana kadar hücrede mevcuttur.

Hücresel seviyede (prokaryot) gen ekspresyonunun düzenlenmesinde operon üzeri düzenleme seviyeleri mevcuttur. Bu düzenleme **küresel düzenlenme** olarak adlandırılır. Çok sayıda operon içsel ve çevresel sinyallere göre küresel kontrol sistemleri tarafından kontrol edilir. Küresel kontrol sistemlerinin farklı kategorilerini ifade etmek üzere **regülön**, **modülön** ve **stimülön** terimleri kullanılmaktadır.

8.2 Ökaryotlarda Gen Ekspresyonunun Düzenlenmesi

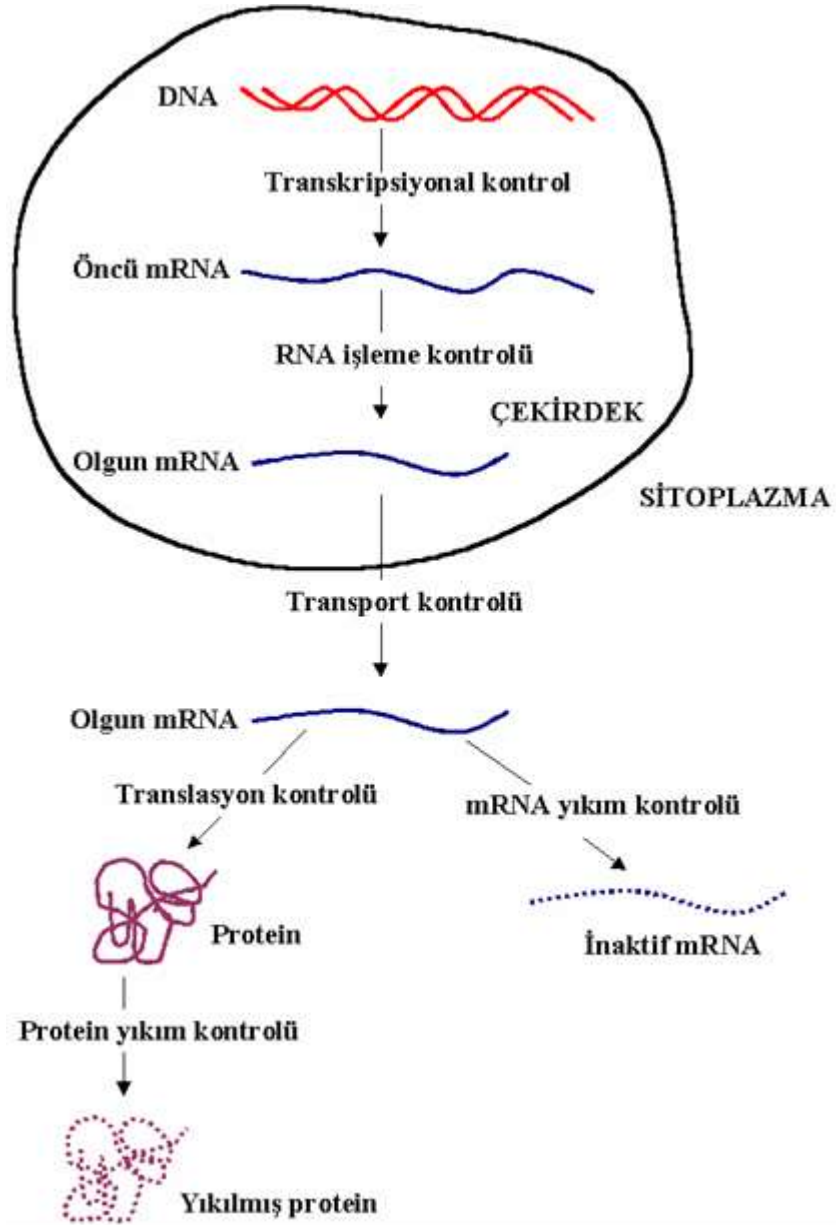
Prokaryotlarda, belli bir fonksiyonu yürüten proteinleri kodlayan genlerin koordineli düzenlenişi, operon modeli ile açıklanmaktadır. Yapılan bütün çalışmalarda ökaryotlarda operonların mevcut olmadığı ortaya çıkmıştır. Dolayısıyla ökaryotlarda operon modeli dışında diğer yollarla gen ekspresyonu düzenlenir. Ökaryotlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesi iki ana kategoriye ayrılarak incelenir.

1. **Kısa dönem düzenlenmesi:** Hücrenin veya organizmanın içinde bulunduğu çevredeki çevresel veya fizyolojik şartlardaki değişime göre bir gen grubunun hızla aktive veya deaktive edilmesidir (ekspresyonun başlatılması veya durdurulması).
2. **Uzun dönem düzenlenmesi:** Hızlı lokal çevresel ve fizyolojik değişikliklere bağlı düzenlenme mekanizmaları dışında kalan mekanizmaları içine alır. Yeni bir organizmanın gelişmesi ve farklılaşması için gerekli olayları kapsar. Bu konu genel olarak **gelişme genetiği** olarak adlandırılır.

8.2.1 Ökaryotlarda gen ekspresyon kontrol seviyeleri

Ökaryotlar prokaryotlardan onlarca kat daha fazla gene sahiptir. Buna bağlı olarak da, düzenlenme şekilleri olağanüstü karmaşıklıktadır. Belli bir zamanda ökaryotik genlerin çok büyük bir kısmı "kapalı" durumdadır. Dolayısıyla ekspresyonu düzenleyen mekanizmalar genomdaki genlerin çoğunun ekspresyonunu kapatabilmelidir. Ayrıca çok sayıda gene karşılık nispeten daha az sayıda düzenleyici protein vardır. Bu az sayıdaki düzenleyici protein yardımıyla binlerce farklı düzenleme şekli oluşturabilirler.

Ökaryotik gen düzenlenişinde iki temel etken başrolü oynar. Bunlardan biri gen bölgelerinin hemen yukarısındaki ve daha uzak noktalarda yer alan **düzenleyici DNA elementleridir**. İkinci etken ise DNA elementlerine bağlanan **düzenleyici proteinlerdir**. Düzenleyici proteinler durdurucu veya güçlendirici olarak görev yaparlar. Ökaryotlarda gen ekspresyonunun kontrolü çok farklı seviyelerde olabilmektedir. Bu seviyeler aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 8.7). Bunlardan bazıları daha ayrıntılı olarak incelenecektir.



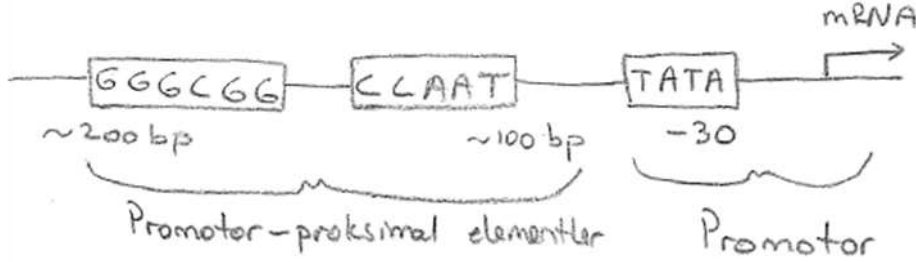
Şekil 8.7: Ökaryotlarda gen ekspresyonunun kontrol edilebileceği seviyeler.

8.2.2 Transkripsiyonel Kontrol

Transkripsiyonel kontrol, bir genin transkripsiyonunun yapılıp yapılmayacağını ve ne kadar yapılacağını belirler. RNA polimeraz II, maksimum hızda RNA sentezlemek için çok sayıda **cis-etkili** element ile birlikte çalışır (cis-etkili, aynı DNA üzerindeki geni etkileyen anlamıdadır). Nisbi durumlarına göre üç farklı cis etkili element vardır.

1. **Promotor elementleri:** Transkripsiyon başlama bölgesinin yakınında yer alan DNA elementleridir.
2. **Promotor proksimal elementleri:** Promotor yakınındaki cis-etkili dizilerdir, düzenleyici proteinlerin bağlanma bölgeleridir.
3. **Güçlendirici ve susturucu elementler:** Genlerden uzak bölgelerde bulunan ve düzenleyici proteinlerin bağlandığı elementlerdir (uzak bağımsız elementler).

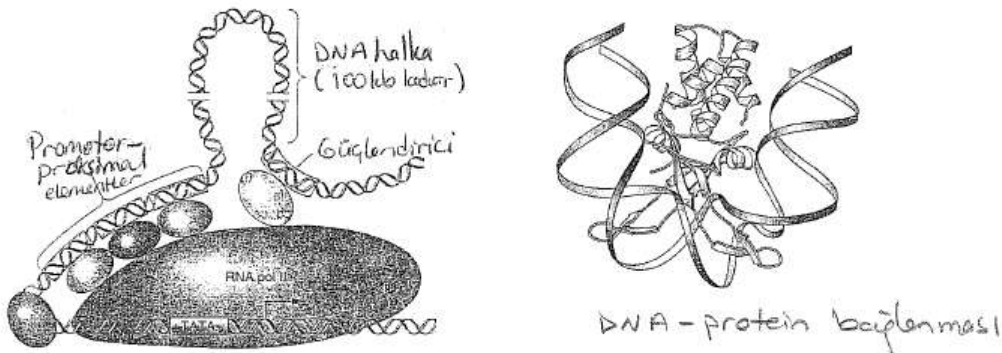
Promotor ve promotor-proksimal elementler düzenleyici proteinler ve RNA polimeraz II ile kompleks oluşturarak transkripsiyonun başlamasını sağlarlar. Promotor-proksimal elementler promotor yukarısı elementler (UPE) olarak adlandırılırlar (Şekil 8.8). UPE'ler prokaryotların düzenleyici elementlerine benzer, ancak bu bölge ökaryotlarda yeterli etkinlikte bir düzenlenmeyi sağlayamaz.



Şekil 8.8: Yüksek ökaryotlardatranskripsiyon başlama bölgesinin yukarı bölgesi.

Gerçekte ökaryotlarda bazı genler belli dokularda veya belli sinyaller (hormon, patojen...) alındığında daha fazla anlatılırlar (ekspresyonları yapılır). Bunun başarılmasında, uzak bağımsız elementler görev yapar. **Güçlendiriciler**, proteinlerin bağlandığı, aynı DNA molekülü üzerindeki promotorlardan transkripsiyonu büyük oranda artıran DNA dizileridirler. **Susturucular** ise baskılayıcı proteinlerin bağlandığı ve transkripsiyonu azaltan veya durduran elementlerdir. Eğer bir düzenleyici protein transkripsiyonu aktive ediyorsa **pozitif düzenleyici protein**, durduruyorsa veya azaltıyorsa **negatif düzenleyici protein** ismini alır. Uzak bağımsız cis-etkili elementler UPE'lere benzeler, 50 kb kadar yukarıda veya aşağıda yer alabilirler. Cis-etkili elementlere bağlı düzenleyici proteinlerin kendi aralarındaki veya düzenleyici proteinlerle RNA polimeraz II kompleksi arasındaki etkileşimlerle veya her iki etkileşim birlikte ilgili genin transkripsiyon oranını belirler.

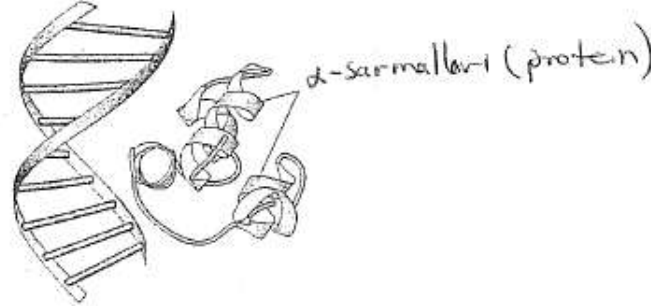
Uzak güçlendirici ve susturucu elementler, transkripsiyonu nasıl düzenler? Başlama kompleksi oluşuktan sonra bu uzak elemente bağlı bir düzenleyici protein arada bulunan (100 kb kadar olabilen) DNA bölgesinin bir halka şekline gelmesiyle RNA polimeraz II ve diğer UPE bağlı proteinlerle temas kurar. Bu temasın kurulması RNA polimeraz II kompleksinin stabilitesini ve transkripsiyon oranını artırır (Şekil 8.9).



Şekil 8.9: RNA polimeraz II'nin UPE ve güçlendirici elementlerle düzenlenişi.

Transkripsiyon faktörleri (UPE ve uzak düzenleyici elementlere bağlananlar) iki farklı fonksiyon yürütürler: i) DNA'ya özel bir bölgeden bağlanma ve ii) transkripsiyonu

uyarma veya susturma. Dolayısıyla bu proteinler en azından iki domainden meydana gelmeleri gerekir, her domain bu fonksiyonlardan birini yürütür. Bu faktörler incelenerek bu domainlerin DNA'ya bağlanmasını sağlayan bazı özel desenler belirlenmiştir. Bunlar sarmal-dönüş-sarmal deseni, çinko-parmak deseni, sarmal-halka-sarmal deseni ve lösün-fermuar deseni. Sarmal-dönüş-sarmal bağlanma domaini en iyi bilinen desendir ve DNA'nın pozitif yüklü şeker-fosfat iskeletine bağlanır (Şekil 8.10).



Şekil 8.10: Sarmal-dönüş-sarmal bağlanma domaininin DNA ile etkileşimi.

Düzenleyici proteinler kontrol ettiği gen veya gen grupları için özelleşmiştir. Bu özelleşme, genin ekspresyonunun düzenlenmesinde görev yapan promotor elementlerine bağlanabilme yeteneği ile sağlanır. Belli bir gen için birkaç veya çok sayıda promotor elementi bulunabilir. Şartlara bağlı olarak (!) bu elementlere bir veya birkaç düzenleyici protein bağlanarak, genin ekspresyonu düzenlenir. Farklı genlerin promotor elementlerinin yapısında (DNA dizisi!) farklılıklar vardır. Bu farklılığa bağlı olarak bu elementlere farklı düzenleyici proteinler bağlanır. Promotor elementleri transkripsiyonun başlayıp başlamayacağını belirlerken, güçlendiriciler maksimum ekspresyonu sağlar. Her bir promotor elementi ve güçlendirici özel bir proteinle bağlanarak işlevini gerçekleştirir. Bazı düzenleyici proteinler bütün hücrelerde mevcut iken diğer bazıları belli hücrelerde mevcuttur. Eğer promotor elementlerine ve güçlendiriciye pozitif düzenleyici proteinler bağlanırsa maksimum seviyede transkripsiyon gerçekleşir, eğer promotor elementine sözelimi pozitif düzenleyici protein, güçlendiriciye negatif düzenleyici protein bağlanırsa bu durumda sonuç iki element arasındaki etkileşime bağlıdır. Eğer negatif düzenleyici protein güçlü ise transkripsiyon baskılanır. Bu durumda güçlendirici bir susturucu element olarak iş görür.

Bir grup güçlendirici element (DNA!) ve promotor elementi (DNA!) aynı tip düzenleyici proteine bağlanabilir. İlginç olan toplam hücre proteinleri ile karşılaştırıldığında az sayıda düzenleyici protein çeşidinin olmasıdır. Belli bir düzenleyici protein ile ilişkiye giren farklı tip genlerin transkripsiyonu birlikte yapılabilmektedir. Bu olay **kombi-ne gen düzenlenişi** olarak adlandırılır.

8.2.3 Ökaryotik gen düzenlenmesinde kromatinin rolü

Düzenlenme şekli nasıl olursa olsun ökaryotlarda transkripsiyon faktörlerinin düzenleyici elementlere bağlanabilmesi için bu DNA bölgelerinin "açık" olması gerekir. Yani nükleozomlar şeklinde sarılı olmaması gerekir. O halde bir genin ekspresyonu öncelikle kontrol bölgelerinin nükleozom içinde sarılı olup olmadığına bağlıdır. Dolayısıyla belli bir gen bölgesi, nükleozom şeklinde sarılarak veya sarılmayarak ekspresyonu kontrol

edilebilir. Gen bölgelerinin çok büyük bir çoğunluğu ökromatin bölgelerinde yer alırlar yani “açık” pozisyonadırlar. Heterokromatin bölgeleri ise tekrarlayan dizileri içerir ve “kapalı” DNA dizileridirler. Gen bölgelerinin açık veya kapalı olması gen ekspresyonunun düzenlenmesinde aktif bir rol alır.

Memelilerin dişilerinde X kromozomu inaktivasyonunda X kromozomlardan biri rasgele inaktive edilir, yani heterokromatin haline getirilir. Dolayısıyla bu hücrelerden köken alan vücut hücrelerinde sadece inaktive edilmeyen X kromozomu üzerindeki genin ekspresyonu sonucu bir fenotip oluşur. Dişi kedilerde derilerindeki turuncu-siyah tüylenme, embriyonik gelişim sırasında vücut hücrelerindeki farklı X kromozomlarının inaktivasyonu sonucu oluşur. İnaktive edilmiş bir kromozom (taşıdığı DNA değişmeden kalır) o hücrenin soyundan gelen bütün hücrelerde aynı (inaktif formda) kalır. Bu olay **epigenetik kalıtım** olarak adlandırılır ve gen fonksiyonunda, DNA baz dizisindeki herhangi bir değişiklikten kaynaklanmayan değişiklikleri ifade eder. (DNA dizisinde herhangi bir değişiklik olmaksızın ortaya çıkan kalıtlanabilir fenotipik değişiklikleri inceleyen alan *epigenetik* olarak adlandırılır.)

Epigenetik kalıtıma **atasal izleme** (imprinting) de örnek olarak verilebilir. Memelilerde bazı otozomal genler hemizigot (Normalde otozomal genler hemizigot olmaz!). Bu genlerden atalardan birinden gelen gen epigenetik olarak inaktive edilir.

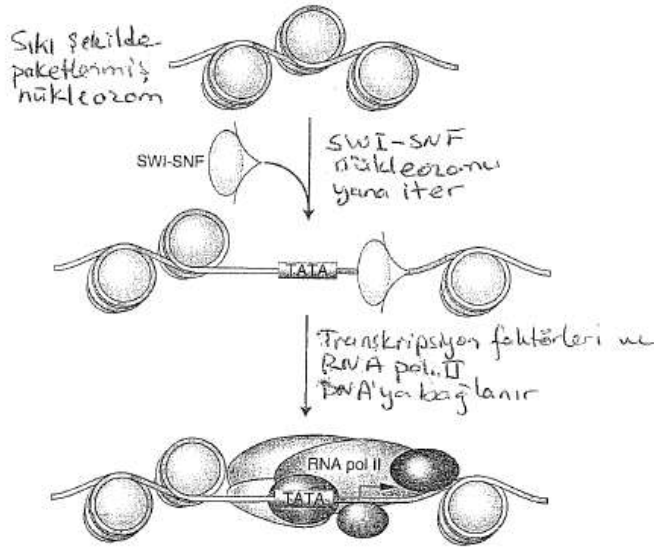
Diğer bazı durumlarda heterokromatin bölgelerine yakın bölgelerdeki genlerin sonradan heterokromatin şeklinde sarıldığı, bir bakıma heterokromatin bölgesinin çevreye yayıldığı bilinir. Bu olay **pozisyon etkisi düzensizliği** olarak bilinir.

Atasal izleme, X-kromozomu inaktivasyonu ve pozisyon etkisi düzensizliği olayları, DNA dizisinde değişiklik olmaksızın, gen ekspresyonunun azaltılabileceğini veya susturulabileceğini göstermektedir. Bu durum (epigenetik kalıtım şekli), nükleozom organizasyonunun, gen ekspresyonunun düzenlenmesinde, dolayısıyla gelişme ve metabolizmada dinamik bir rolünün olduğunu göstermektedir.

Aktif gen ekspresyonu yapılan ve yapılmayan hücrelerde yapılan araştırmalarda, bir gen bölgesinde, özellikle düzenleyici bölgede, nükleozom pozisyonunun değiştiği belirlenmiştir. Sonuçta nükleozomlar, dinamik yapılar olup organizmanın hayatı boyunca farklı zamanlarda pozisyonları değişebilir. TATA kutusu ve çevresi nükleozom içinde sarılı iken RNA polimeraz II bağlanamaz. Nükleozom başka bir bölgeye yer değiştirince ilgili gen aktive edilir. Nükleozom pozisyonundaki bu değişim **kromatin yeniden modellenmesi** olarak adlandırılır. SWI-SNF adı verilen bir proteinin, belli hücresel şartlarda, nükleozomu iterek bir gene ait kontrol bölgelerinin açığa çıkmasını sağladığı belirlenmiştir (Şekil 8.11). Kromatin yeniden modellenmesi ökaryotik gen ekspresyonunun düzenlenmesinde önemli bir kontrol noktasıdır.

8.2.4 Hayvanlarda gen ekspresyonunun steroid hormonlarla düzenlenmesi

Hormonlar hücrenin bulunduğu çevrenin sabit tutulmasında rol alan kimyasallar olup çeşitli sinyallerle uyarılan hücreler tarafından salgılanıp kan dolaşımı ile ulaştıkları hedef hücreyi uyarırlar. Gen ekspresyonunun düzenlenmesi ile steroid hormonlar arasındaki ilişki iyi bir şekilde anlaşılmıştır. Bu hormonlar mantarlardan insanlara kadar birçok organizmada fizyolojik düzenlenmede ve gelişmede önemlidirler.



Şekil 8.11: Kromatin yeniden modelleme mekanizması

Steroid hormonlara hidrokortizon, aldosteron, testosteron ve progesteron örnek verilebilir. Bu hormonların hücre içi reseptörlere bağlanarak bazı proteinlerin sentezini indükledikleri bilinmektedir. Bu hormonların reseptörleri organizmanın belli dokularındaki belli hücrelerde mevcut olup diğer dokularda mevcut değildir (Tablo 8.1). Dolayısıyla hormonun etkisi doku spesifiktir, hormonun reseptörüne sahip olan dokularda etkilidir. Bu hormonlar hücreye girdiğinde genellikle transkripsiyonu artırarak protein sentezini indükler ancak bazı durumlarda mRNA'nın ömrünü uzatarak da bu etkiyi gösterebilmektedir.

Tablo 8.1: Bazı steroid hormonlar, etkili oldukları doku ve indükledikleri proteinler.

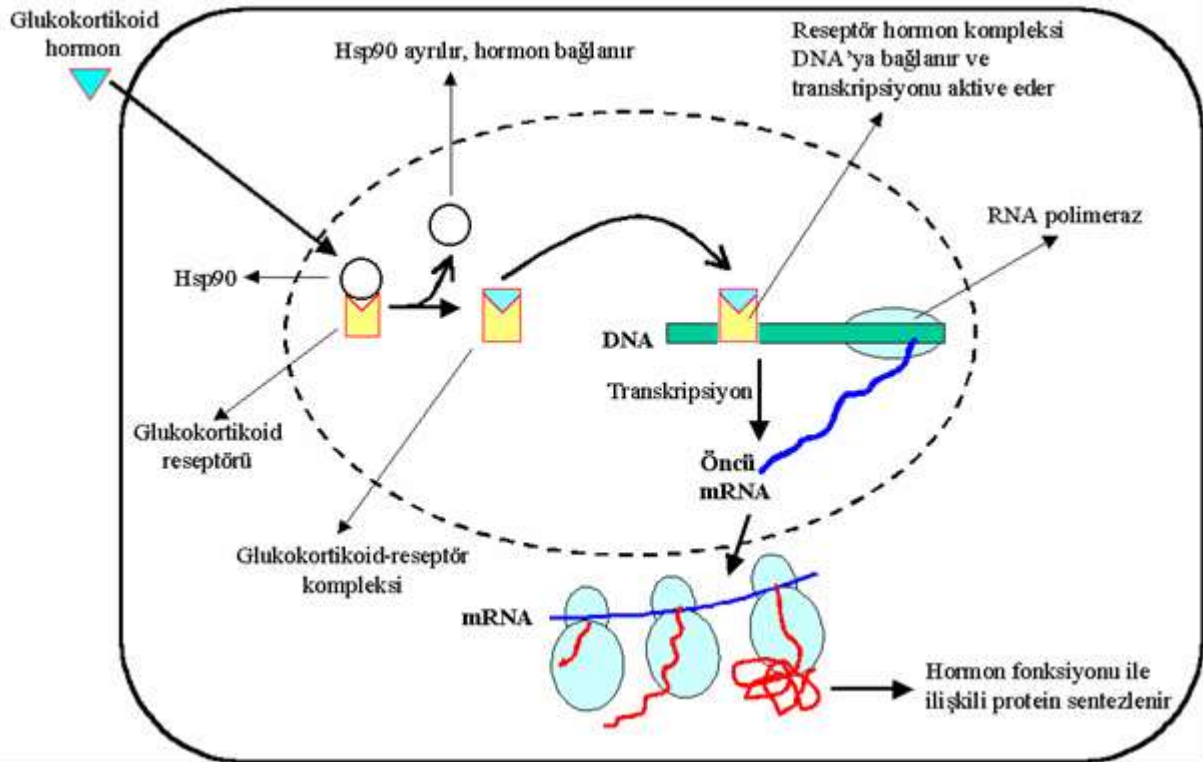
Hormon	Doku	İndüklenen protein
Östrojen	Ovidukt (tavuk)	Ovalbumin, Lizozim
	Pituitar bez (fare)	Prolaktin
Glukokortikoidler	Karaciğer (fare)	Trozin aminotransferaz
	Pituitar bez (fare)	Gelişme hormonu
Testosteron	Karaciğer (fare)	α -Globin

Memeli hücreleri 10 000 ila 100 000 steroid reseptör molekülü taşırlar. Bu protein molekülleri ilgili hormona karşı oldukça duyarlıdırlar. Bütün steroid hormonlar benzer şekilde çalışır. Sözelimi glukokortikoid hormon reseptörü hücrede (fonksiyonel formda sadece çekirdekte) Hsp90 adlı bir proteinle kompleks oluşturmuş şekilde bulunur. Glukokortikoid hormon hücreye girdiğinde Hsp90'ı reseptörden ayırarak, bu reseptöre bağlanır (Şekil 8.12).

Reseptör ile glukokortikoidin birleşmesi sonucu hormon reseptör kompleksi oluşur. Daha sonra bu kompleks reseptör kısmı ile spesifik bir düzenleyici DNA bölgesine bağlanır. İlgili geni aktive eder veya transkripsiyonunu durdurur. Steroid hormonun eklenmesinden birkaç dakika sonra yeni mRNA molekülleri oluşur ve ilgili protein sen-

tezlenir. Steroid hormon reseptörlerinin DNA'ya bağlanan kısmı genellikle çinko-parmak deseni (zinc-finger motif) gösterir.

Steroid hormonlarla düzenlenebilen bütün genlerin bulunduğu DNA bölgesinde steroid reseptör kompleksinin bağlandığı özel bir bölge mevcuttur. Bu bölge steroid hormon respons (tepki) elementi (HRE) olarak adlandırılır. Farklı tip steroid HRE dizileri mevcuttur. Sözelimi GRE glukokortikoid hormon respons (tepki) elementi; ERE, estrojen hormon respons (tepki) elementi gibi. HRE bölgeleri, genlerin güçlendirici bölgelerinde çoğunlukla çoklu kopyalar şeklinde bulunurlar. HRE bölgesine hormon reseptör kompleksi bağlandıktan sonra nasıl bir mekanizma ile transkripsiyonun kontrol edildiği tam olarak bilinmez ancak farklı HRE bölgelerinin (GRE, ERE...) birbirleri ile ve transkripsiyon faktörleri ile etkileşimi sonucu bir düzenlenme biçiminin oluştuğu düşünülmektedir.



Şekil 8.12: Memeli hücrelerinde steroid hormon glikokortikoidin gen ekspresyonunun düzenlenmesindeki rolü.

Aynı steroid hormon reseptörüne sahip olmasına rağmen, bazı hücrelerde bu hormonlar farklı gen gruplarını aktive ederler. Bu nasıl gerçekleşir? Promotor elementlerine ve güçlendiricilere sadece steroid-reseptör kompleksi değil diğer birçok düzenleyici protein de bağlanır. Belli bir hücredeki steroid hormonun etkisi diğer düzenleyici proteinlerin durumuna da bağlıdır. Bu nedenle aynı steroid hormon reseptörüne sahip hücrelerde bu hormonlar farklı genlerin ekspresyonunu aktive edebilir.

8.2.5 Ökaryotlarda gen düzenlenmesine genel bakış

Bu bölümde ökaryotlarda gen düzenlenmesi ile ilgili az sayıda mekanizma örnek olarak verilmiştir. Gerçekte bugün için bilinen çok daha fazla sayıda mekanizma mevcuttur. Ökaryotlarda her şeyden önce genler operonlar şeklinde organize olmamıştır. Fakat yine de genlerin ekspresyonu koordineli şekilde gerçekleştirilir.

Ökaryotlarda gen ekspresyonunun düzenlenmesi iki kategoride incelenmek durumundadır: Kısa dönem düzenlenmesi ve uzun dönem düzenlenmesi. **Kısa dönem düzenlenme** transkripsiyonun kontrolü, kromatin yeniden modelleme, öncü RNA işleme, olgun mRNA'nın transportu, mRNA translasyonu, mRNA'nın yıkımı ve protein son ürünün yıkımı seviyelerinde olabilir. **Uzun dönem düzenlenme** ise gelişme ve farklılaşmanın olduğu süreçler boyunca gen ekspresyonunun düzenlenmesini içine alır. Klasik deneylerle farklılaşan ve gelişen hücrelerde bir DNA kaybı olmadığı, genlerin farklı aktiviteleri ile gelişme ve farklılaşmanın gerçekleştirildiği belirlenmiştir. Dolayısıyla gelişme ve farklılaşma sırasında gen ekspresyonu kısa dönem düzenlenme yöntemleri ile düzenleniyor olmalı, fakat olaylar daha kompleks olmalıdır. Her bir gelişme sürecinde çok fazla sayıda genin düzenlenmesi ve farklılaşan diğer dokularla iletişim kurulması gerekir. Ayrıca bu olaylar sırasında genlerin aktivasyon ve baskılanma zamanlarının ayarlanması gerekir. Örnek, bir hücrenin yapı ve fonksiyonu çok önceden belirlenir, bu belirlenme gelişmenin ileri safhalarına kadar gözlenebilir değildir. Bu tip erken belirleme olayları, genlerin sonradan aktive olmak üzere bir şekilde programlanmasıyla gerçekleştirilir. *Drosophila*'da bazı ilerlemeler sağlandıysa bile ne önceden programlanma olayının esası, ne de gelişme sürecinin zamanlama mekanizmaları omurgalılarda bu gün için iyi bir şekilde anlaşılabilir değildir.

9 REKOMBİNANT DNA VE İNSAN GENOM PROJESİ

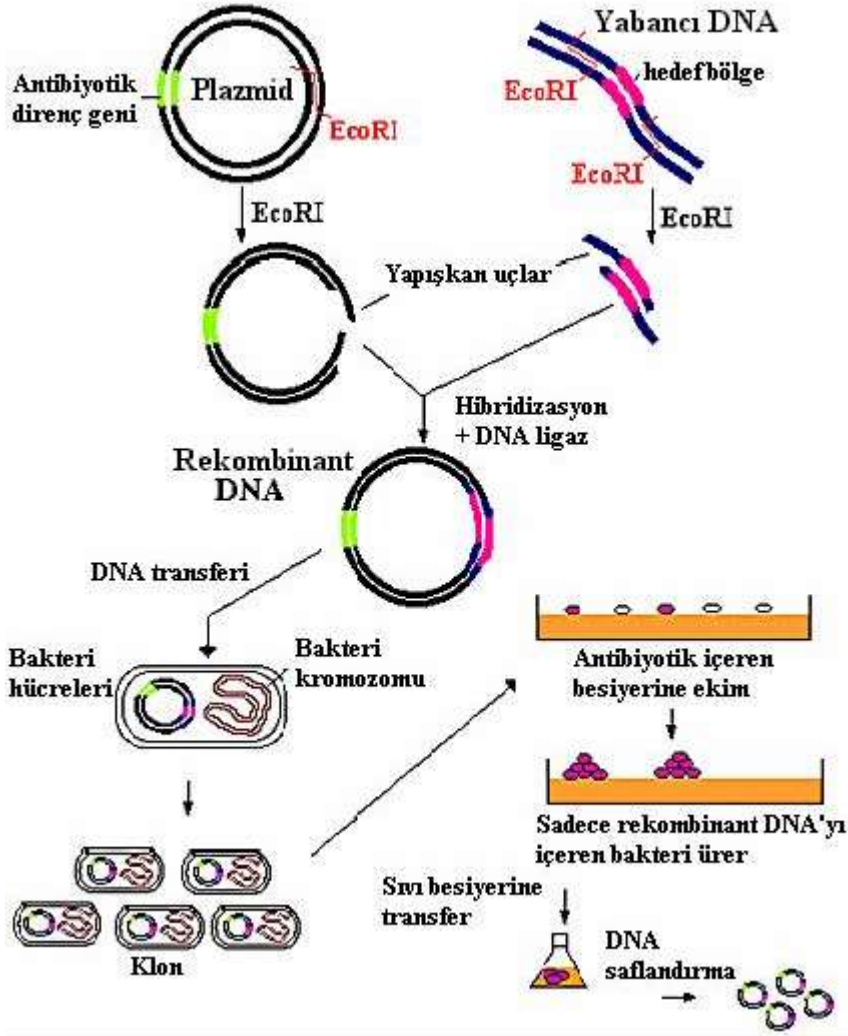
9.1 Rekombinant DNA Teknolojisi

Moleküler genetik araştırma tekniklerinin gelişmesi araştırmacılara, farklı kaynaklardan yani farklı organizmalardan gelen DNA moleküllerinin *in vitro*'da birleştirilebilme yeteneğini sağlamıştır. Farklı kaynaklardan gelen DNA moleküllerinin birleştirilmesiyle oluşturulan DNA moleküllerine **rekombinant DNA** denir. Rekombinant DNA üzerinde restriksiyon endonükleaz analizleri, DNA dizileme ve yönlendirilmiş mutasyon gibi genetik analiz ve manipulasyonlar gerçekleştirilebilir. Rekombinant DNA elde etmek ve rekombinant DNA üzerinde genetik manipulasyonlar yapmak için kullanılan tekniklerin tamamına **rekombinant DNA teknolojisi** denir. Rekombinant DNA teknolojisi **genetik mühendisliği** olarak da adlandırılır.

Bir genomun belli bir bölgesi (sözgelimi bir gen bölgesi) üzerine moleküler genetik araştırmalar yapılmak istendiğinde bir bütün olarak genomla beraber bu bölgenin analizi muhtemelen mümkün olmayacaktır. Bunun nedeni organizmaya ait tam bir gen seti içinde ilgili gene veya DNA bölgesine doğrudan müdahalenin zorluğu ve diploit bir organizmada ilgili gen bölgesinin interfazdaki bir hücrede sadece iki kopyasının bulunmasıdır. Bunun yerine ilgili gen bölgesinin genomdan ayrılıp daha küçük olan ve bir hücrede çok sayıda temsil edilen plazmid veya virüs gibi bir vektör DNA molekülüne bağlanarak incelenmesi daha kolay ve etkili olacaktır. Bir hedef DNA bölgesinin bir vektör ile birleştirilerek özel konak hücreler içinde çok sayıda kopyasını elde etme işlemine **gen klonlama** denir. Şekil 9.1'de genomik DNA'dan tipik bir gen klonlamanın basamakları özetlenmiştir.

Klonlanan gen bölgesi üzerinde bir çok analiz yapmak mümkündür. Bunlardan bazıları aşağıda özetlenmiştir.

1. Klonlanan DNA molekülü restriksiyon endonükleaz tanıma bölgelerinin sayısı ve konumları bakımından analiz edilebilir. Bunun sonucu olarak o bölge için spesifik problemler elde edilebilir. (Restriksiyon endonükleazlar, DNA'yı özel bir diziyeye bağlanarak iç kısımlardan kesen enzimlerdir)
2. İlgili DNA bölgesindeki genlerin transkripsiyon ve düzenlenme mekanizmaları incelenebilir.
3. İlgili DNA bölgesinin nükleotit dizisi belirlenebilir. DNA bölgelerinin nükleotit dizilerinin belirlenmesiyle, ilgili DNA molekülü üzerindeki gen bölgeleri, düzenleyici elementler ve hurda DNA bölgelerinin nükleotit dizileri belirlenebilir.
4. Klonlanan genin baz dizisi yönlendirilmiş mutasyon yöntemiyle değiştirilebilir.



Şekil 9.1: Genomik DNA'dan bir gen bölgesinin klonlanmasının temel basamakları.

Rekombinant DNA teknolojisinde ve genel olarak moleküler genetikte çok önemli ilerlemelere neden olan diğer bir teknik de **polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)**'dur. PCR her iki ucundaki nükleotit dizisi bilinen veya büyük oranda tahmin edilebilen bir DNA bölgesinin milyarlarca sayıda çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlar. Bu yöntem uygulanarak çok yetersiz miktarda mevcut olan DNA örneklerinin amplifikasyonu veya büyük bir DNA molekülünün belli bir bölgesinin amplifikasyonu sağlanabilmektedir. Ayrıca teknik birçok diğer rekombinant DNA işlemlerine uygulanabilmektedir.

Rekombinant DNA teknolojisinin birçok uygulama alanı vardır. Bunlardan bazıları aşağıda belirtilmektedir:

1. Biyolojik mekanizmaların ve süreçlerin analizi.
2. İnsan genetik hastalıklarının DNA analizleriyle tanısı (restriksiyon fragment boyu farklılıkları -RFLP-, tek nükleotit farklılığı -SNP- gibi yöntemlerle).
3. İnsan genlerinin izolasyonu.
4. İnsan ve diğer hedef organizmaların genomlarının nükleotit dizilerinin belirlenmesi.

5. DNA tipleme veya DNA parmak izi yöntemiyle polisiye olaylarda ve hukuki davalarda kanıt sağlama (RFLP ve değişken sayıda peş peşe tekrarlar –VNTR- gibi yöntemlerle).
6. Gen tedavi yöntemlerinin geliştirilmesi.
7. Ticari ürünlerin üretimi (İnsan gelişme hormonu ve insülini, rekombinat aşılar, genetik yapısı değiştirilmiş bakteriler yardımıyla endüstriyel enzim üretimi, zararlı atıkların işlenmesi ve bitkileri donma hasarından koruma gibi).
8. Transgenik bitkiler ve hayvanlar elde etme.

Bunların her biri ayrıca incelenmesi gereken konular olup burada sadece genomik ve fonksiyonel genomik araştırmalar anlatılacaktır.

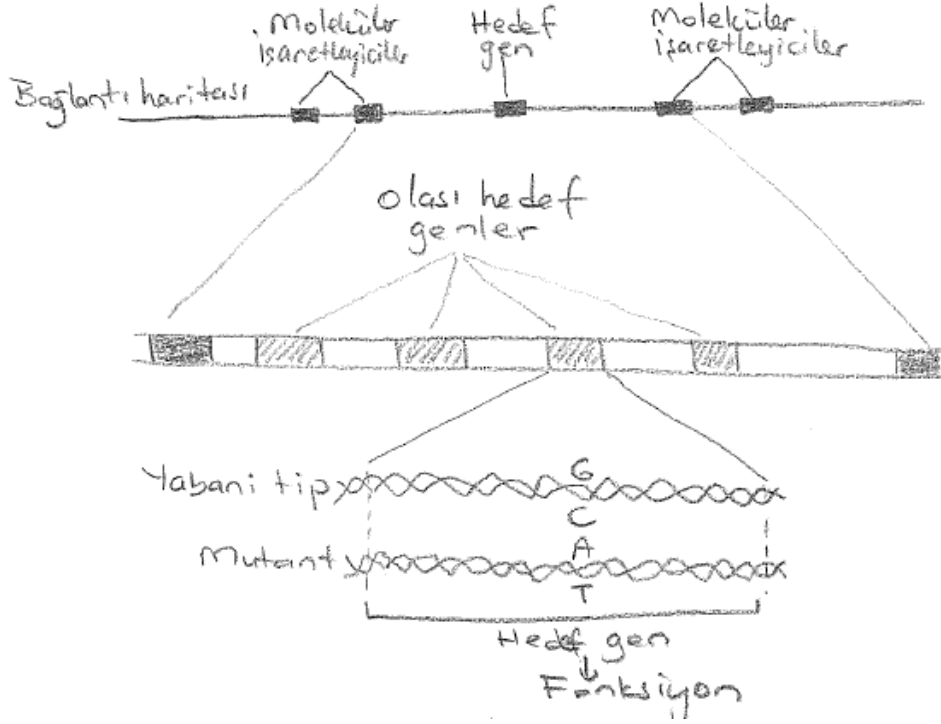
9.2 Genomik

Bazen bilim, beklenenin çok üzerinde bir hızla gelişebilmektedir. Birçok kıdemli genetikçi, ilk çalışmalarına bazı fenotipik analizlerle başladılar. O zamanlar bir organizmanın genomunun fiziksel ayrıntılarının bir bütün olarak belirlenmesi hayal bile edilemezdi. 1970'lere geldiğinde gen klonlama, dizileme ve manipülasyon tekniklerini içeren rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesiyle, genlerin moleküler seviyede analizini yapmak mümkün oldu. Bu tarihlerden sonra büyük hayaller olarak bir organizmanın, tabii ki öncelikle insan genomunun tamamının nükleotit dizisinin belirlenmesi düşüncesi gelişmeye başladı. Çok geçmeden 1990'lı yıllarda insan ve diğer bazı organizmaların genomunun tamamının dizilenmesi için genom projeleri uygulamaya konuldu.

Bir genomun tamamını çalışmayı hedef alan araştırma alanı **genomik** olarak adlandırılır. Genom araştırmalarının geliştirilmesi ve hızla tamamlanmasında, DNA dizileme tekniklerinin geliştirilmesi ve otomasyonunun katkısı çok büyük olmuştur. Büyük genomlar daha küçük ve üst üste gelen DNA segmentleri halinde klonlanıp baz (nükleotit) dizisi belirlenir. Sonra hedef gen bölgeleri belirlenerek bu genlerin fonksiyonları analiz edilir (Şekil 9.2).

Şüphesiz bu tip çalışmaların ilk basamağını, belli bir hedef genomun tam baz dizisinin belirlenmesi oluşturur. İnsan genom projesi 1990 yılında başladığında 15 yıllık bir sürede tamamlanacağı düşünülmesine rağmen, 13 yılda tamamlanmıştır. Bu gün için geliştirilmiş olan etkili yeni nesil (next generation) dizileme teknikleriyle tam genom dizileme hızı olağanüstü artmıştır. Geliştirilen son tekniklerle bir insan genomunun tam dizisi 5 saat 2 dakika gibi rekor bir sürede tamalanabilmektedir (Bu örnekte kullanılan teknoloji Oxford Nanopore Technologies).

İnsan genomunun kaba dizisi 2001 yılında tamamlanmıştır. Bir kaba dizi, genomun tam dizisini içerir. Ancak bu dizi içerisinde bazı hataların olması muhtemeldir ve bazı problemliler bölgeler mevcut olabilmektedir. Bu kaba dizi sonradan son kalite diziyeye dönüştürülür. Son kalite dizide hata oranları en aza indirilmiş durumdadır.



Şekil 9.2: Genomik analizlerin genel seyri.

9.2.1 İnsan genomundan çıkarılan bilgiler

Bu gün için elde edilen genomik bilgi birikiminde bütün bilgilerin ve sonuçlarının tartışılması süphesiz çok daha hacimli olacaktır. Dolayısıyla burada bir genomdan elde edilen bilgiler geniş bir şekilde sunulamayacaktır. İnsan genomundan elde edilen bilgiler verilecektir. Daha ayrıntılı bilgilere bölümün sonunda verilmiş ağ (web) kaynaklarından ulaşılabilir.

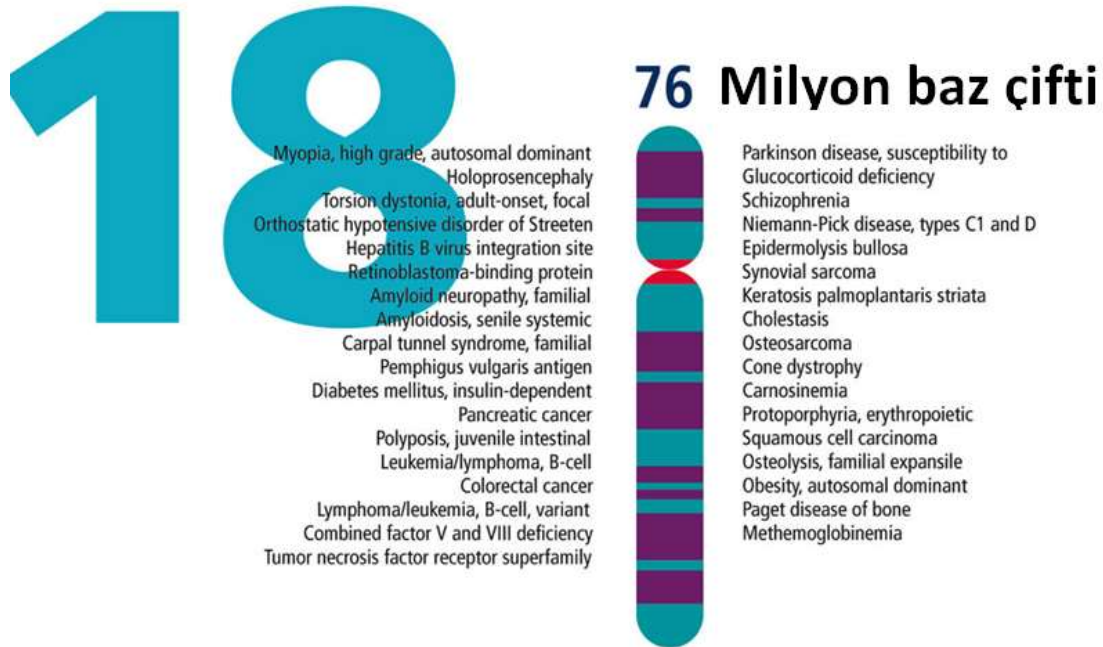
İnsan genomu 3×10^9 bp büyüklüğündedir ve yaklaşık %45'i tekrar dizileri olup bunlar transposibil elementlerin kalıntılarıdır. Yapılan analizler, bu dizilerin ilkel transposibil elementlerden (özellikle retrotranspozonlardan) köken aldıklarını, zamanla mutasyonların birikmesine bağlı olarak hareket yeteneklerini kayb ettiklerini göstermektedir. İnsan genomunu oluşturan 24 kromozomun büyüklükleri ve taşıdıkları gen sayıları Tablo 9.1'de verilmiştir. Şekil 9.3'de 18. kromozomu ve taşıdığı bazı genetik bozukluklara neden olan mutant genler gösterilmektedir.

Genomun çok küçük bir parçası protein kodlayan genlerden yani eksonlardan meydana gelmiştir. Bu oran yaklaşık %3'tür. Eksonlar küçük diziler (~150 bp) şeklinde, büyük diziler (1000 bp->100 000 bp) şeklinde bulunan intronlar arasında yer alır. Transkriptler ortalama 10 eksondan oluşur, ancak çok daha fazla sayıda ekson içeren gen bölgeleri de vardır. Gen sayısının 20 bin ile 25 bin arasında olduğunu son yapılan biyoinformatik analizleri göstermektedir. İnsanda yaklaşık 25 000 gen varken bir nematod solucanda 18 bin, *Drosophila*'da 13 bin, *Saccharomyces*'de 6 bin ve verem etkeni *Mycobacterium* bakterisinde 4 bin gen vardır. Kompleksliği ile oranlandığında insandaki gen sayısının az olduğu görülmektedir. Ancak belli bir gen bölgesinin farklı şekilde splaylanmasıyla (farklı pozisyonların intron olarak algılanmasıyla, alternatif splaylama) belli bir gen bölgesinden farklı özelliklerde proteinlerin sentezlenmesi mümkün

olabilmektedir. Yapılan en son cDNA analizleri, protein kodlayan genlerin % 60'ının iki veya daha fazla splay varyantının olduğunu göstermektedir. Dolayısıyla, insan genomu, sahip olduğu protein kodlayan gen sayısının üç katı kadar protein kodlama kapasitesine sahiptir.

Tablo 9.1: Kromozomların taşıdığı gen sayıları [Wellcome News Supplement Q1:13-23 (2001)] ve baz çifti olarak büyüklükleri [Nature 409:860-921 (2001)].

Kromozom	Gen Sayısı	Baz Çifti	Kromozom	Gen Sayısı	Baz Çifti
Kromozom 1	2968	279 x 106	Kromozom 13	748	118 x 106
Kromozom 2	2288	251 x 106	Kromozom 14	1098	107 x 106
Kromozom 3	2032	221 x 106	Kromozom 15	1122	100 x 106
Kromozom 4	1297	197 x 106	Kromozom 16	1098	104 x 106
Kromozom 5	1643	198 x 106	Kromozom 17	1576	88 x 106
Kromozom 6	1963	176 x 106	Kromozom 18	766	86 x 106
Kromozom 7	1443	163 x 106	Kromozom 19	1454	72 x 106
Kromozom 8	1127	148 x 106	Kromozom 20	927	66 x 106
Kromozom 9	1299	140 x 106	Kromozom 21	303	45 x 106
Kromozom 10	1440	143 x 106	Kromozom 22	288	48 x 106
Kromozom 11	2093	148 x 106	Kromozom X	1184	163 x 106
Kromozom 12	1652	142 x 106	Kromozom Y	231	51 x 106



Şekil 9.3: İnsan 18. kromozomundaki bazı genetik bozukluklara neden olan genler ve pozisyonları. (<https://public.ornl.gov/site/gallery/originals/Chrom18.jpg> web kaynağından alınmıştır. 12.02.2012).

Proteinler yapısal ve fonksiyonel özelliklerine göre familyalar şeklinde gruplandırılabilir. Benzer familyalara ait protein sayısı, genomları belirlenmiş diğer omurgasızlarla karşılaştırıldığında insanlarda daha fazladır. Yine proteinler farklı veya koordine

görevler yapan modüler domain denilen alt yapılara sahiptirler. İnsan proteinleriyle diğer organizmalara ait proteinler karşılaştırıldığında, insan proteinlerinin daha fazla modüler domainlerden oluştuğu görülmektedir. Proteinlerin yapısal benzerliklerinden faydalanarak fonksiyonlarının belirlenmesine yönelik çalışmalar devam etmektedir. Fonksiyonel yapıların nisbi olarak karşılaştırılabilmesi mümkünse de bu gün için birincil amino asit dizilerinin karşılaştırılarak fonksiyonların belirlenmesi çalışmalarında kat edilmesi gereken önemli bir yol vardır. Bütün protein familyalarının üç boyutlu yapılarının ayrıntılarını araştıran alan **yapısal genomik** olarak adlandırılır.

Genetikçiler, yaklaşık son 50 yıldır gen ürünlerinin ekspresyonu ve etkileşimleri üzerine çalışmaktadır. Fakat bu çalışmalar bir defasında bir veya bir kaç gen ile yürütülmekte idi. Genomik sayesinde bugün bir veya birkaç genin değil, bir organizmaya ait bir çok genin veya tamamının ekspresyon ve etkileşimlerini bir anda incelemek mümkün olmuştur. Gen ürünlerinin ekspresyonu ve etkileşimini araştırmak için uygulanan bu küresel (bütün olarak hücreyi kapsayan) çalışmalar **fonksiyonel genomik** olarak adlandırılmaktadır. Fonksiyonel genomik araştırmalarla ilgili diğer bazı kavramlar da vardır. Bunlar kısaca tanımlanmıştır:

Transkriptom: Transkriptlerin dizilerini ve ekspresyon şekillerini (nerede, ne zaman, ne kadar ekspresyonu yapılacak?) ifade eder.

Proteom: Proteinlerin dizilerini ve ekspresyon şekillerini (nerede, ne zaman, ne kadar ekspresyonu yapılacak?) ifade eder.

İnteraktom: Protein ve DNA segmentleri arasındaki, proteinlerle RNA segmentleri ve proteinlerle proteinler arasındaki bütün fiziksel etkileşimleri ifade eder.

Fenom: Genomdaki her bir genin etkileşimi ile oluşturulmuş bütün fenotiplerin tanımlanması çalışmalarıdır.

Transkriptom ve interaktomlar mikrosıra (microarray) denilen bir teknikle belirlenir. Bu teknikte mümkün olan bütün genlerin belli bölgeleri olan oligonükleotitler bir mikroyonga (mikroçip) üzerine tuturulur, böylece bir DNA mikroyonga elde edilir. Sonra hedef hücrelerden elde edilmiş bütün RNA moleküllerini içeren karışım bu mikroyonga eklenir. RNA moleküllerinin hangi oligonükleotitlerle hibritleştiği bilgisayar ortamlarda belirlenip analiz edilir. DNA moleküllerinin prob olarak kullanıldığı bu teknik **DNA mikrosıra (mikroarray)** olarak adlandırılır. Ayrıca yeni nesil dizileme teknikleri belli bir anda bir veya bir grup hücrede mevcut mRNA moleküllerinin dizilerinin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Bu teknikle bütün farklı mRNA moleküllerinin sayıları da doğrudan belirlenebilmektedir.

Biyolojik sistemlerin işleyişini, genomik verileri bilgisayar yazılımlarıyla ve matematiksel yaklaşımlarla modelleyerek bir bütün olarak inceleyen alan ise **sistemler biyolojisi** olarak adlandırılır.

Bu özetlerin ötesinde, insan genom projesinin ve diğer organizmaların genom projelerinin tarihi gelişimi, hedefleri, sonuçları ve toplumsal etkileri hakkında daha ayrıntılı bilgilere aşağıdaki kaynaklardan ve burada sözü edilmeyen diğer bir çok kaynaktan ulaşılabilir.

İnsan genom projesi güncel bilgiler için <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/> ağ kaynağından ve diğer ağ kaynaklarından ayrıntılı bilgiye ulaşılabilir.

10 DİNAMİK GENOM: TRANSPOZİBİL ELEMENTLER

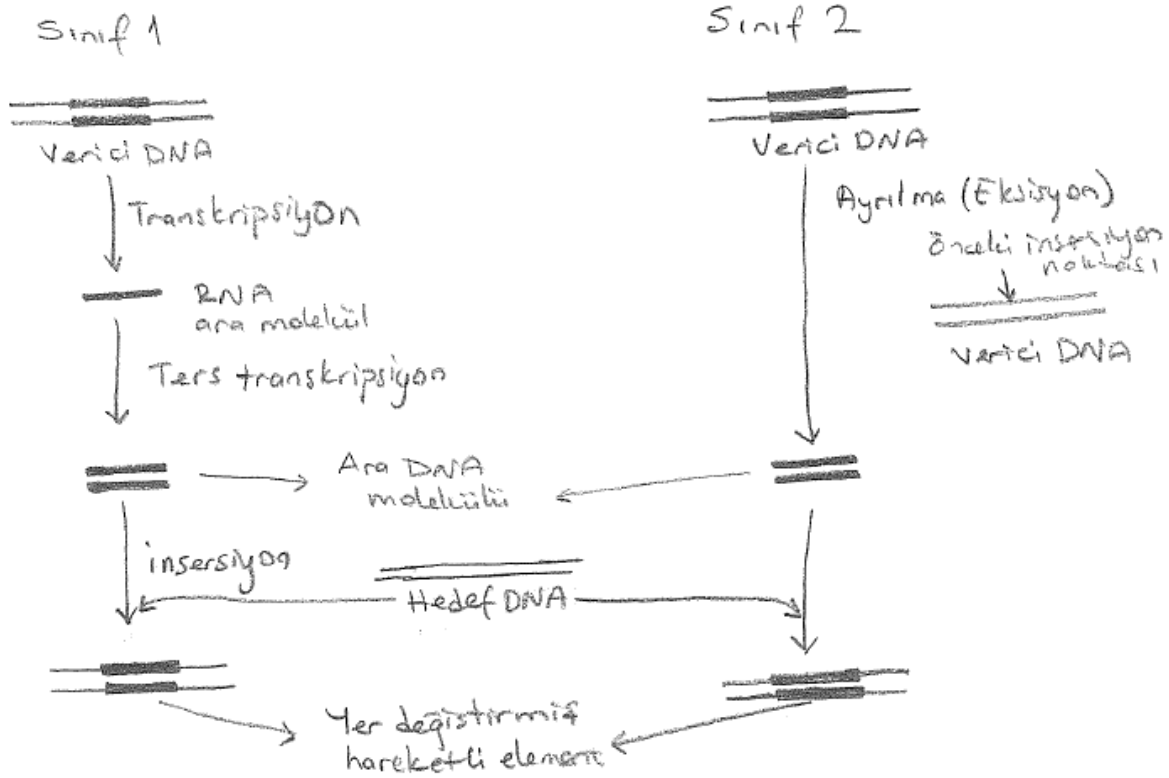
1930'larda genlerin kromozomların belli lokuslarında sabitlenmiş olduğu görüşüne uymayan o zamanın genetik çevrelerini rahatsız edici sonuçlar gözlenmeye başlanmıştı. Gözlemler bazı genetik elementlerin bir lokasyondan diğerine bir şekilde hareket edebildiğini göstermekteydi. Bu gün bu tip hareketli genetik elementlerin doğada oldukça yaygın olduğunu biliyoruz. Bu güne kadar, bu genetik elementler için çok renkli isimler kullanılmıştır: Denetleyici elementler, sıçrayan genler, hareketli genetik elementler ve transpozonlar. Bütün bu tipleri ifade etmek üzere **transpozibil elementler** ve **transpozon** terimleri tercih edilmiştir.

DNA dizileme araştırmalarının sonuçları transpozibil elementlerin çok yaygın olduğunu göstermiştir. İnsan genomunun yaklaşık yarısını oluştururlar (%45). Buna rağmen fonksiyonları hakkında kesinleşmiş bilgilerimiz yoktur.

Ökaryotik transpozibil elementler iki grupta incelenirler, sınıf 1 ve sınıf 2 elementleri (Şekil 10.1). Sınıf 1 elementleri **RNA elementleri** olarak da isimlendirilir. Bu elementler buldukları lokusta RNA'ya dönüştürülürler. Sonra bu RNA molekülleri hücre sitoplazmasında tekrar DNA'ya dönüştürülerek genomda yeni bir bölgeye integre olurlar. Sınıf 1 elementleri **retroelementler** olarak da adlandırılırlar; genomlar içinde oldukça fazla sayıda temsil edilirler. Sayılarının fazla olma nedeni sabit bir lokusta bulunan elementin çok fazla sayıda RNA kopyasının oluşturulmasıdır. Kendileri hareket etmezler kopyaları hareketlidir. Sınıf 2 elementleri bir yerden diğerine bir DNA molekülü olarak yer değiştirdiğinden **DNA elementleri** olarak isimlendirilir. Bir verici bölgeden ayrılırlar ve yeni bir bölgeye integre olurlar. Verici bölgede eğer bir genin içinde yerleşik idiyse ayrılmaları sonrasında o genin yabancı tip forma dönüşü sağlanmış olur. İlk keşfedilen transpozibil element, mısır tanelerinde pigment üretiminden sorumlu bir gen içine yerleşik, bir sınıf 2 DNA elementidir.

10.1 Mısırdaki Ds Elementleri

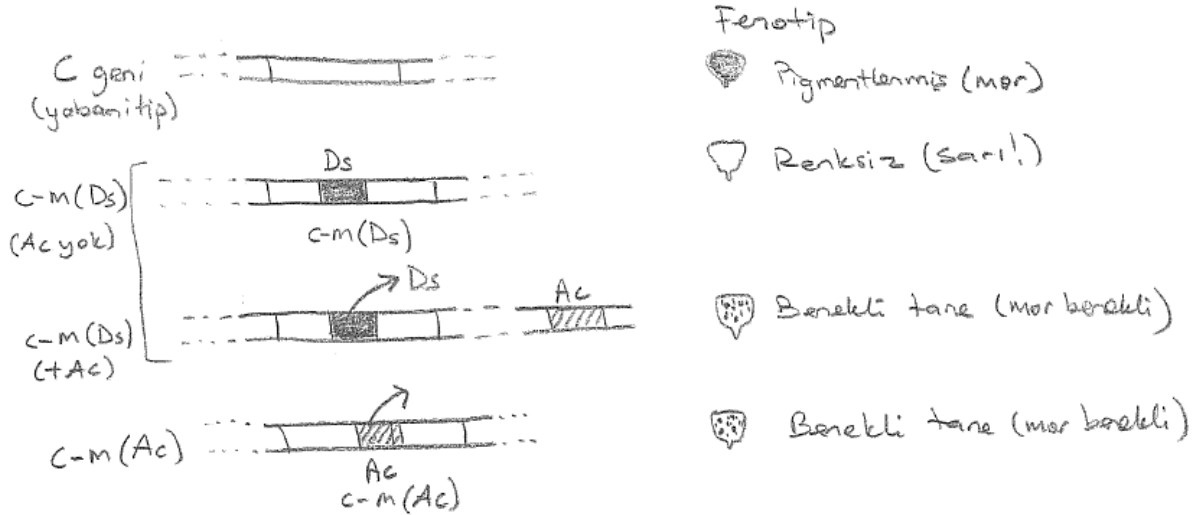
1940'larda Barbara McClintock mısır tanelerindeki pigmentasyon desenlerinin genetik esası üzerinde çalışırken ilk defa transpozibil elementleri tanımlamıştır. Başlangıçta bu günkü açıklıkta bir tanımlama yapılamamışsa da ilk defa bu araştırmayla yeni bir genetik element grubunun varlığı ortaya atılmıştır. İki genetik faktörün 9. kromozomun (mısırın kromozom sayısı 10'dur) kırılmasından sorumlu olduğunu buldu. *Ds* elementi (dissosiation) kırılma bölgesinde yer alır. İkinci bir bağlantısız element kromozomun *Ds* bölgesinden kırılmasını uyarmaktadır. Bu element de *Ac* (Activator) olarak adlandırılmıştır. McClintock bu iki elementin hareketli olduğunu düşünmüş ve yaptığı deneylerde bunu göstermiştir (Şekil 10.2).



Şekil 10.1: Ökaryotlarda görülen sınıf 1 ve sınıf 2 transpozibil elementleri ve yer değiştirme tarzları.

9. kromozomda yabancı tip bir *C* geni mısır tanelerinin pigmentlenmesine neden olur (mor renk). Eğer bu gen içine bir *Ds* elementi yerleşirse gen mutasyona uğrar [*c-m(Ds)*] ve taneler renksiz (pigmentsiz, sarı) olur. *Ac* elementi olmaksızın *Ds* elementi hareket edemez. Eğer *c-m(Ds)* bir suş *Ac* elementine sahipse benekli tanelere sahiptir. Çünkü tanenin (tohum!) gelişimi sırasında bazı hücrelerden *Ac* yardımıyla *Ds* elementi *C* geninden ayrılmıştır (eksisyon, transpozisyon), böylece *C* geninin fonksiyonu normale döner. (Tohumun bütün hücrelerinde değil, bazı hücrelerinde!). Diğer bazı benekli suşlarda *C* genine *Ac* elementi integre olmuş durumdadır [*c-m(Ac)*]. Bu suşlarda *Ac* elementi kendikendine hareket edebildiği için bazı hücrelerde *C* geni normal fonksiyonuna döner ve benekler oluşur. *Ds* elementi gibi elementler, *Ac* elementi gibi kendi hareketini yöneten genetik bilgiye sahip bir element olmadan yer değiştiremediklerinden dolayı **otonom olmayan elementler** olarak isimlendirilirler. *Ac* elementi gibi, genom içindeki hareketlerini yönetecek genetik bilgiye sahip elementlere **otonom elementler** denir.

Bu ve benzeri transpozibil elementler sadece mısırdaki değil ökaryotik ve prokaryotik bir çok organizmada tespit edilmiştir. Barbara McClintock transpozibil elementlerin moleküler seviyede tam olarak tanımlanmasından sonra ilk çalışmasından kırk yıl sonra 1983 yılında bu çalışması için Nobel ödülüne layık görülmüştür.



Şekil 10.2: Mısır tanelerinde pigment dağılımına transpozisibil elementlerin etkisi.

10.2 Prokaryotlarda Transpozisibil Elementler

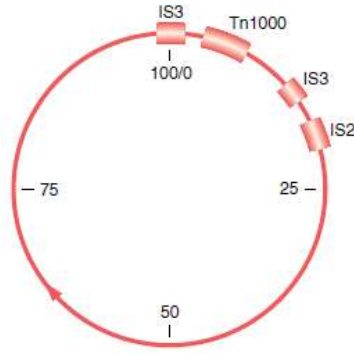
Transpozisibil genetik elementlerin moleküler özellikleri ilk defa bakterilerde anlaşılmıştır. İnsersiyon dizileri veya **insersiyon dizi (IS) elementleri** bir kromozom üzerinde farklı pozisyonlara, veya farklı kromozomlara hareket edebilen (yer değiştirebilen) bakteriyel DNA segmentleridir. IS elementi bir gen içinde yer alırsa kodlayıcı diziyi bozar ve o genin ekspresyonu gerçekleşmez. Büyüklüklerinin ve bazı durumlarda transkripsiyon ve translasyon durdurma sinyallerine sahip olmalarının bir sonucu olarak, bir operonda bulunduğu noktadan aşağıda (downstream) bulunan yapısal genlerin de ekspresyonunu durdurur. IS elementleri ilk defa *Escherichia coli gal* operonunda belirlenmiştir.

İlk IS elementi *E. coli gal* operonundan belirlenmiş ve IS1 adı verilmiştir. 800 bp uzunluğundadır. İkinci bir element IS2 olarak isimlendirildi ve 1350 bp uzunluğundaydı. IS elementleri DNA dizileri bakımından farklı ise de birçok ortak özellikleri vardır: Bu elementler **transpozaz** denilen bir protein kodlar. Bu protein elementin kromozom üzerinde bir noktadan diğerine hareketi için gerekli bir enzimdir. Ayrıca IS elementleri hareket için gerekli olan “kısa ters dönmüş tekrar dizileri” ile başlar ve aynı dizilerle biter.

E. coli genomu IS elementi bakımından zengindir: IS1’in sekiz, IS2’nin beş kopyasını taşır. İyi tanımlanmamış diğer IS tiplerinin de kopyaları genomda mevcuttur. Aynı tip IS elementleri özdeş diziler oldukları için krosing over bölgeleri olarak iş görürler. Sözelmi F plazmitleri ile *E. coli* kromozomu *Hfr* oluşturmak üzere her ikisi üzerinde bulunan aynı IS elementleri arasında meydana gelen tek krosing over ile birleşirler (Şekil 10.3).

10.2.1 Prokaryotik transpozonlar

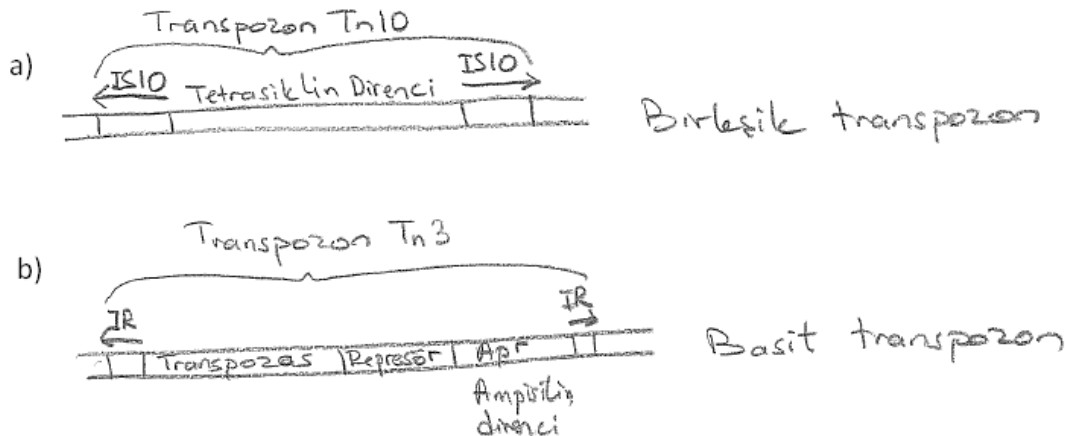
R faktörleri, antibiyotik direncini kodlayan çok sayıda genleri taşıyan plazmitlerdir. Bu R faktörleri F faktörleri gibi konjugasyon ile hızla transfer edilirler. R faktörlerinin bakterilerde çok farklı tip genleri taşıdığı bilinmektedir. Bu plazmitler tarafından bu genler nasıl elde edilir ve hücreden hücreye nasıl taşınırlar?



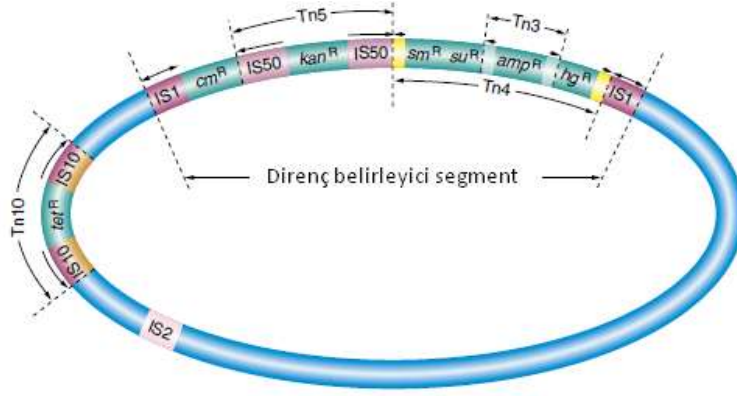
Şekil: 10.3: F faktör plazmitlerinde IS elementlerinin dağılımı. IS2, IS3 ve Tn1000 nisbi harita uzaklıklarına göre yerleştirilmiştir. Ok, F DNA'sının orijini ve konjugal transfer yönünü göstermektedir.

Direnç genleri **transpozon** (Tn) denilen hareketli genetik elementler üzerinde bulunurlar. **Birleşik transpozonlar** her iki ucunda ters yönde yerleşik olan IS elementlerinin arasında kalan bölgede farklı tip genler taşırlar (Şekil 10.4a). Bu IS elementlerinden herhangi biri tarafından kodlanan transpozaz transpozonun tamamının hareketi için yeterlidir. Birleşik transpozonlara Tn10 bir örnek olarak verilebilir. Tn10 tetrasikline direnç sağlayan bir geni ve her iki uca ters yönde iki IS10 elementini taşır. **Basit transpozonlar** her iki uca da IR (ters dönmüş tekrar) dizilerine sahiptir (<50 bp). IS dizilerinin aksine uçlardaki bu IR dizileri transpozaz kodlamazlar ve kendikendilerine hareketli değildir. Bunun yerine basit transpozonlar uçlarda değil iç kısımlarda diğer genlerin yanında kendi transpozazını sentezleyen bir gene de sahiptir. Basit transpozonlara örnek Tn3'tür (Şekil 10.4b).

Transpozonlar, IS elementlerinden daha uzundurlar (birkaç kb). Fazladan protein-kodlayan genler taşırlar. IS elementleri ve transpozonlar prokaryotik genetik elementler olarak tanımlandıysa bile bunlar, ökaryotlarınkiler de dahil olmak üzere bir çok hareketli genetik elementin özelliklerini taşırlar. Bir transpozon bir plazmitten bir bakteri kromozomuna veya bir plazmitten diğer plazmite sıçrayabilir. Bu yer değiştirmeler sırasında çoklu direnç plazmitleri oluşturulur (Şekil 10.5).



Şekil: 10.4: Birleşik ve basit transpozonların yapısal özellikleri. a) Birleşik transpozon Tn10, b) basit transpozon Tn3.



Şekil 10.5: Basit ve birleşik transpozon-direnç genlerini taşıyan bir plazmitin şematik haritası.

Transpozonlar iki farklı mekanizmadan biri ile yer değiştirir. Bu yer değiştirme olayına **transpozisyon** denir. Bu mekanizmalardan biri **replikatif transpozisyon**dur. Burada element replikasyonla bir kopyasını oluşturur, bu kopya yeni bir bölgeye integre olurken orijinal kopya yerinde kalır. Diğer bir mekanizma **konservatif transpozisyon**dur. Bu durumda element bulunduğu bölgeden kopar ve yeni bir bölgeye bağlanır.

10.3 Ökaryotlarda Transpozibil Elementler

Ökaryotik transpozibil elementler yapısal ve hareket şekillerine göre iki sınıfa ayrılırlar: Sınıf 1 retrotranspozonlar ve sınıf 2 DNA transpozonları.

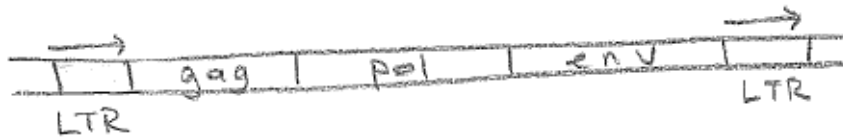
10.3.1 Retrotranspozonlar

Mayalarda *HIS4*, histidin metabolizmasında görev alan enzimleri kodlayan bir gen bölgesidir. 1500 civarındaki maya *HIS4* mutanı arasında ikisinin kararsız mutantlar oldukları ve His⁺'den His⁻'ya dönüşebilmekte oldukları belirlenmiştir. Bu mutantlar incelendiğinde *HIS4* geni içinde büyük bir DNA segmentinin bulunduğu belirlenmiştir. Yapılan incelemelerde bu DNA bölgesinin prokaryotik IS elementleri veya transpozonlara değil maya genomunda 35 kopya şeklinde bulunan **Ty** elementlerine benzerlik gösterdiği ortaya çıkmıştır. Yapılan moleküler seviyedeki araştırmalar bu DNA segmentinin bir hayvansal RNA virüsü olan retrovirüslere benzediğini göstermiştir.

Retrovirüsler tek zincirli bir RNA genomu taşıyan, hayvan hücrelerini enfekte eden virüslerdir. RNA molekülü hücreye girdiğinde virüsler **ters transkriptaz** (revers transkriptaz) enzimi ile bir aracı çift zincirli komplementer DNA'ya (cDNA) dönüştürülür. Bu DNA konak genomuna integre olur. Konak genomuna integre olmuş, retrovirüsün RNA'sının komplementeri olan bu DNA molekülüne **provirüs** denir. Provirüsten transkripsiyonla tek zincirli viral RNA genomu ve viral proteinler sentezlenir, yeni virüs parçacıkları monte edilir ve serbest bırakılır. Bu grup virüslerden bazıları enfeksiyonu takiben kanserleşmeye de neden olmaktadır.

Şekil 10.6'da, *HIS4* mutantlarından izole edilmiş *Ty1* elementinin, retrovirüsler ve diğer ökaryotik retrotranspozonlarla yapısal benzerlikleri ve gen içerikleri görülmektedir. Her ikisi de uzun uç tekrarlarıyla (LTR) sonlanır. LTR'ler birkaç yüz baz çifti uzunluğundadır. Retrovirüsler ve ökaryotik retrotranspozonların her ikisi de ortak iki gen içerir: *gag* ve *pol*. Retrovirüsler en azından(!) üç protein kodlarlar: *gag*, *pol* ve *env* genlerinin ürünleri. Bunlardan *gag* gen ürünü RNA genomunun sentezlenmesini yürütür, *pol* gen ürünü ters transkriptazı kodlar, *env* geni ise virüsü çevreleyen yapısal bir proteini kodlar. Env proteini, virüsün diğer hücreleri enfekte etmek üzere içinde bulunduğu hücreden ayrılması için gereklidir. İlginç bir şekilde *Ty1* elementi sadece *gag* ve *pol* genlerini içerir. Bu elementler RNA transkriptlerine dönüştürülebilir (*gag*), bu transkript cDNA'ya dönüştürülebilir (*pol*) fakat hücreden çıkamaz (*env* gerekli). Hücreden ayrılma yerine bu cDNA aynı hücrenin genomuna integre olur. İşte, aracı bir RNA üzerinden genom içinde hareket etmek için gerekli ters transkriptaz aktivitesine sahip transpozibil elementler **retrotranspozonlar** olarak adlandırılır. Ayrıca sınıf 1 transpozibil elementler olarak da adlandırılırlar. *Ty1* gibi uçlarında uzun uç tekrarları taşıyan retrotranspozonlar **LTR-retrotranspozonlar** olarak adlandırılır.

Bir retrovirüs (*M_oMLV*)



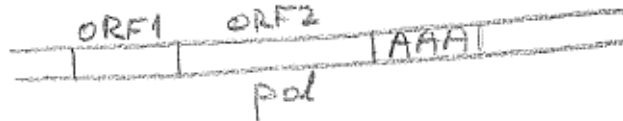
Mayalarda *Ty1*



Drosophila'da *copia*



Bir insan LINE elementi L1



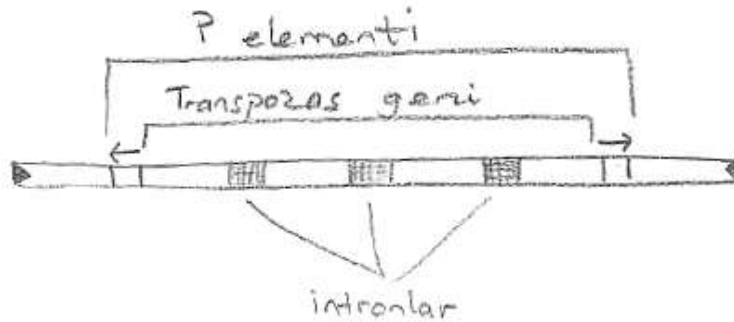
Şekil10.6: Ökaryotlarda bulunan bazı retrotranspozonlarla bir retrovirüsün yapısal karşılaştırması.

Drosophila'da **copia-benzeri elementler** de retrotanspozonlardır. Genoma 10-100 pozisyondan integre olabilmektedirler. *Drosophila*'da kayısı göz rengi (w^a), yabani tip w^+ genine bir copia-benzeri elementin integrasyonu ile oluşur.

10.3.2 DNA Transpozonları

Ökaryotlarda belirlenen bazı hareketli elementler bakterilerdekine benzer bir mekanizmayla yer değiştirirler. IS elementleri ve transpozonlar genom içinde yeni pozisyonlara ya kendileri hareket ederler ya da bir kopyaları. Bu şekilde yer değiştiren elementler sınıf 2 elementleri yada **DNA transpozonları** olarak isimlendirilir. Barbara McClintock tarafından mısırdaki keşfedilen ilk transpozon elementin, bu gün DNA transpozonları olduğunu biliyoruz. Fakat ilk defa moleküler karakterizasyonu yapılan DNA transpozonu *Drosophila*'nın hücre sitoplazmasında yerleşik olan **P elementidir**.

Drosophila melanogaster'in laboratuvar suşları ile doğal suşları arasında gerçekleştirilen çaprazlamalarda **hibrit disgenez** denilen bir olay ortaya çıkmaktadır. M sitotipi (laboratuvar suşu) dişileriyle P sitotipi (doğal suş) erkekleri çaprazlandığında ($\text{♀M} \times \text{P♂}$) yeni nesillerde çok farklı tip mutant fenotipler ortaya çıkmaktadır. Fakat ters yönlü çaprazlamada aynı sonuç ortaya çıkmamıştır ($\text{♂M} \times \text{P♀}$). Yapılan moleküler seviyedeki araştırmalarda hibrit disgeneze, P elementlerinin bazı genlere integre olmasıyla meydana gelen mutasyonların neden olduğu belirlenmiştir. Bu P elementlerinin doğal popülasyonlarda her bir genomda 30-40 kopya şeklinde bulunduğu ancak laboratuvar suşlarında bulunmadığı belirlenmiştir. P elementleri 0.5-2.9 kb aralığında farklı büyüklüklere sahip DNA elementleridir. Bu büyüklük farkının nedeni elementin orta kısmında bulunan bölgelerin silinmesinden kaynaklanır. Bütün bir P elementi bakteriyel transpozonlara benzer: Uçlarda kısa (31 bp) ters dönmüş tekrarlar vardır ve bir transpozon proteini kodlarlar. Bu ökaryotik elementlerin ilave bir özelliği üç intron ve dört ekson içerir (Şekil 10.7).



Şekil 10.7: P elementinin yapısı. 2.9 kb üç intron taşıyan bir gen ve her iki uca 31 bp ters dönmüş diziler vardır.

$\text{♀M} \times \text{P♂}$ çaprazlamasından oluşan yeni nesillerde hibrit disgenez nasıl meydana gelir? P elementleri, transpozon yanında transpozisyonu engelleyen bir de baskılayıcı protein kodlarlar. Dolayısıyla P suşlarında baskılayıcı protein varlığından dolayı sıklıkla transpozisyon gerçekleşmez. M suşlarında ise ne bir P elementi ve dolayısıyla ne de bir baskılayıcı protein kodlanır. Bu tip bir çaprazlamada, F1 bireyleri, sitoplazmalarını annelerinden aldığından baskılayıcı proteinleri yoktur. Babalarından aldıkları P elementle-

ri bu nedenle daha sıklıkla yeni genom bölgelerine hareket ederler ve farklı sayıda geni mutasyona uğratırlar. Sonuçta hibrit disgenez oluşur. ♂M x P♀ çaprazlamasında zigotun sitoplazmasında hem P elementi hem de baskılayıcı protein vardır. P elementi sıklıkla yer değiştiremez ve hibrit disgenez meydana gelmez.

P elementi laboratuvar suşlarında niçin yoktur? Bu sorunun cevabıyla ilgili şöyle bir spekülasyon yapılmaktadır: Morgan ve öğrencileri *Drosophila melanogaster* laboratuvar suşunu izole ettiğinde bu organizmanın genomunda P elementi yoktu. Daha sonra doğal populasyonlarda bu element bir şekilde yaygınlaştı.

Mısır *Ac* ve *Ds* elementleri de DNA transpozonlardır. Bu elementlerin uç kısımlarında terminal (uç) ters dönmüş tekrarları vardır. Otonom olmayan *Ds* elementi bir transpozaz kodlamaz, dolayısıyla otonom olarak yer değiştiremez. *Ac* elementi ise aynı zamanda bir transpozaz kodlar, otonom olarak yer değiştirebilir. Genomda bir *Ac* varken bu genomda yer alan *Ds* elementlerinin de hareketini sağlayacak transpozaz üretilir, böylece *Ds* elementi de yer değiştirir.

Transpozazlar, farklı DNA transpozon aileleri için özgüdürler. Farklı ailelere ait transpozazlar sadece kendi ailesinden elementlerin hareketini sağlayabilir. Bunun nedeni her ailenin uç tekrar dizilerinin diğer ailelerinkinden farklı olmasıdır.

Mantarlar gibi bazı organizmalar DNA transpozonlarına sahip olmasalar da birçok bitki ve hayvan türünde P ve *Ac* elementlerine benzer DNA transpozonları izole edilmiştir. Sözgelimi aslanağzı bitkisinde petallerin beneklenmesine neden olan *Tam3* elementi gibi.



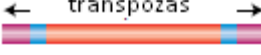

10.4 Dinamik Genom: Beklentinin Üzerinde Transposibil Element

Transposibil elementler moleküler seviyede karakterize edildikten sonra, bu elementlerin, genomda en az birkaç veya birkaç yüz kopyasının bulunduğu belirlenmiştir. Aktif olmayan elementlerin kalıntıları da genomlarda belirlenmektedir. Aktif olanlar genomda belli sıklıkla yer değiştirerek durağan bir genom yerine dinamik bir genom oluşturmaktadır.

Bir organizmanın DNA içeriği (haploit genom DNA içeriği) **C-değeri** olarak bilinir. C değerinin büyüklüğünün organizmanın kompleksliği ile doğru orantılı olmadığı uzun zamandır bilinmektedir. Bu olaya **C değeri açmazı** denmektedir. Sözgelimi semenderlerin genomları insan genomundan 20 kat daha büyüktür. Yine arpa bitkisinin genomu, yakın akrabası olan pirinç bitkisinininkinden 10 kat daha büyüktür. C değeri açmazının nedeni nedir? Yapılan çalışmalar sonucunda, organizmaların genomlarında binlerce, hatta yüz binlerce defa tekrarlayan dizilerin var olduğu ve bunların ökaryotik genomların büyük bir kısmını oluşturduğu anlaşılmıştır. Çok sayıdaki organizmaya ait genom projelerinin sonuçları, farklı tip tekrarlayan dizilerin var olduğunu göstermiştir. Bu dizilerden bazıları DNA transpozonlarına ve retrotranspozonlara benzerdir ve özellikle bitkilerde ve böceklerde mutasyonlara neden olmaktadır. C değeri artışına bu tekrarlar neden olmaktadır.

İnsan genomunun hemen hemen yarısı transposibil elementlerin türevleridir. Bu elementlerin çok büyük bir kısmı iki tip retrotranspozondan meydana gelir: Uzun ayrılmış çekirdek elementleri (LINE) ve kısa ayrılmış çekirdek elementleri (SINE). LINE'ler

kendilerinin kodladığı ters transkriptaz enzimi yardımıyla hareket edebilirler, fakat LTR gibi bazı retrovirüs yapılarına sahip değildirler. SINE dizileri otonom olmayan LINE'ler olarak tanımlanabilirler. Çünkü LINE'lere yapısal olarak benzerler ancak kendi ters transkriptazlarını sentezleyemezler. Muhtemelen aynı genomda yer alan LINE'ler tarafından kodlanan ters transkriptaz yardımıyla hareket edebilirler (Şekil 10.8).

Element	Transpozisyon	Yapı	Büyüklik	Kopya sayısı	Genomdaki Oranı
LINE'ler	Otonom		1-5 kb	20 000-40 000	%21
SINE'ler	Otonom değil		100-300 bp	1 500 000	%13
DNA Transpozonları	Otonom		2-3 kb	300 000	%3
	Otonom değil		80-3000 bp		

Şekil 10.8: İnsan genomunda belirlenmiş genel transpozibil element sınıfları.

İnsan genomundaki en bol SINE *Alu* olarak adlandırılır. Bu isimlendirmenin nedeni, dizinin *AluI* restriksiyon endonükleazının tanıma bölgesini taşımalarıdır. İnsan genomu, genler arasında veya intronlar içine dağılmış bir milyonun üzerinde tam veya kısmi *Alu* dizisi (SINE) taşır. Bu *Alu* dizileri insan genomunun % 10'undan fazlasını oluşturur. Bu diziler bazı hücrel komplekslerin yapısına katılan 7SL RNA ile benzerlik gösterir. Muhtemelen bu RNA'nın ters transkripsiyonu sonucu oluşmuşlardır. İnsan genomu, sahip olduğu protein kodlayan bütün gen bölgelerinin büyüklüğünün 20 katı kadar transpozibil element türevi taşımaktadır.

Hayvan ve bitkiler, genomlarındaki bu kadar çok sayıda DNA insersiyonları ve hareketli elementlerle nasıl başa çıkabiliyorlar? Fonksiyonel gen bölgelerindeki hareketli elementlerin intronlar içinde olduğunu biliyoruz. İtronlar olgun mRNA oluşurken uzaklaştırıldığından, protein yapısını olumsuz etkilemez. Eğer bir hareketli element bir ekson içine integre olursa, ilgili genin esasi bir gen olup olmamasına bağlı olarak ilgili bireyler **negatif seçim** sonucu yok olurlar ve populasyondan (gen havuzundan) uzaklaştırılırlar. Buna rağmen insan ve diğer organizma genomlarında bulunan çok sayıda hareketli element inaktiftir ve kopya sayısını artıramaz. Diğer bazıları hala hareket edebilme yeteneğindedir, fakat bunlar **konak düzenleyici mekanizmaları** tarafından inaktive edilirler, susturulurlar. Yine de az sayıda hareketli element konak düzenleyici sisteminden kaçarak mutasyonlara neden olabilmektedir. Üç farklı LINE, faktör VIII genine (kan pıhtılaşması!) integre olarak hemofili A'ya neden olmaktadır. En az 11 farklı *Alu* integrasyonu farklı tip insan genetik hastalıklarının oluşumuna neden olmaktadır. Bunlardan bazıları şunlardır: Hemofili B (faktör IX genine), nörofibromatoz (*NF1* genine) ve meme kanseri (*BRCA2* genine).

10.5 Genomik Savaş Alanı

Transposibil elementlerin bitkiler ve hayvanlarda çok farklı tip mutasyonlara neden olduğunu gördük. Öyleyse konak düzenlenmesinin yenilerek, sesiz elementlerin yeniden aktive olduğu bazı zamanların olması gerekir. Öbür taraftan bakıldığında eğer konak düzenlenmesi tam olarak başarılı olsalardı, transposibil elementler varlıklarını daha fazla sürdürmezlerdi; susturulurlar, hareket edemezler ve tedrici olarak tamamen tanınmaz dizilere dönüşürlerdi. Gerçekte transposibil elementlerin çoğalma eğilimi ile konağın susturma ve yok etme çabaları arasında sürekli bir mücadelenin sürdüğü anlaşılmaktadır.

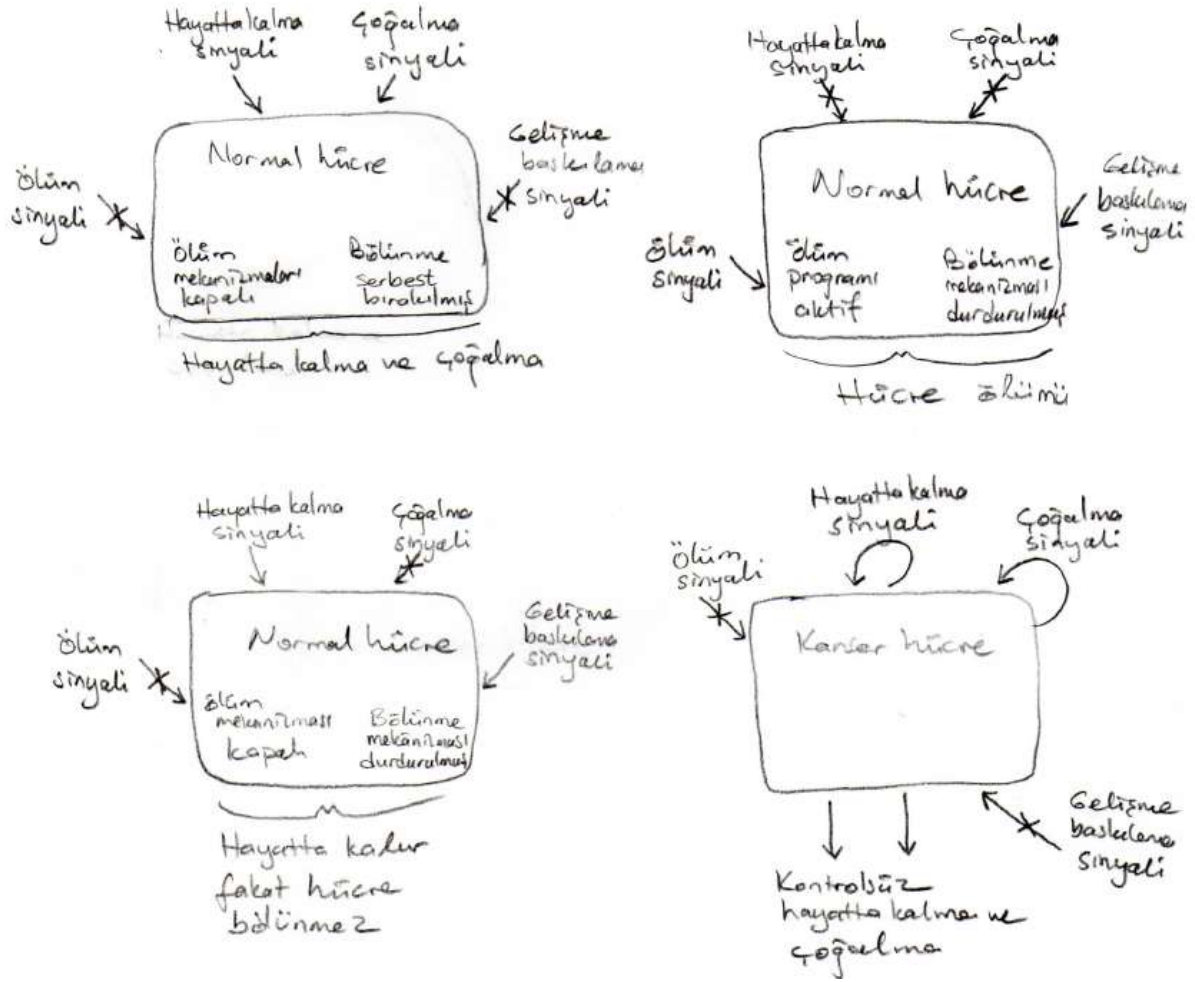
Bu bağlamda, bazılarımız, genomumuzun hemen hemen yarısının transposibil elementlerden meydana gelmesinden kaygı duyabiliriz. Gerçekte böyle bir kaygıya gerek yoktur. İnsan ve diğer bütün organizmalar transposibil elementleriyle bir arada varlıklarını sürdürmüşler, her ikisinin birlikte hayatta kalabileceği bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Transposibil elementleriyle birlikte-varolma mekanizmaları geliştiremeyen organizmalar büyük olasılıkla yok olmuşlardır.

11 HÜCRE SAYISININ GENETİK DÜZENLENMESİ: NORMAL VE KANSER HÜCRELER

Somatik hücre sayısının düzenlenmesi, olağanüstü bir homeostasis örneğidir. Çok karmaşık mekanizmalar, bir organizmanın fizyolojisini normal sınırlar içinde tutmaktadır. Belli tipteki bir hücre sayısı gerekli olan sınırı aşarsa bu tip hücrelerin çoğalması durdurulur, fazla hücreler ölür. Belli tip hücrelerin sayısı olması gereken sınırın altında ise hücre çoğalması uyarılır, hücre ölümü durdurulur. Dolayısıyla hücre çoğalması ve hücre ölümü normal şartlarda dikkatli bir şekilde dengelenir. Bu süreçleri idare eden mekanizmalardaki mutasyonlar sonucu bu homeostatik mekanizmalar kontrol dışına çıkarsa ne olur? İnsanların da dahil olduğu bir çok organizmada sonuç yıkıcıdır: Aynı somatik hücre içinde mutasyonların birikmesiyle hücre çoğalmasının hızlanması ve hücre ölümünün engellenmesi kanserin altında yatan nedendir. Bu bölümde tümör oluşumu ve kansere neden olan yanlış gen düzenlenmelerinin altında yatan genetik nedenler incelenecektir.

Hücre sayısının kontrolü hücre çoğalmasını ve hücre ölümünü kontrol eden mekanizmalar arasındaki gidiş-gelişlerle sağlanır. Hücre çoğalması **mitotik döngü** ile kontrol edilirken hücre ölümü **programlanmış hücre ölümü** veya **apoptosis** denilen mekanizmalarla kontrol edilir (Şekil 11.1). Her iki mekanizmada da sıralı (peşpeşe gerçekleşen) biyokimyasal olaylar meydana gelir. Bu sıradaki bir olayın meydana gelebilmesi, bir önceki olayın tamamlanmış olmasına bağlıdır. Hücre döngüsünde bir **güvenlik mekanizması** bir olayı kendisinden önceki olayın tamamlanmasına kadar bekletir ve dolayısıyla bu süre içinde döngünün ilerlemesini durdurur. Benzer şekilde **yaşam kalım faktörleri** (survival faktörleri) ölüm metabolizmasının ilerlemesini engeller. Çok hücreli hayvanlarda karar verici süreçlere topyekün bir katılım vardır. Bu katılım farklı **sinyal iletim yollarıyla** hücreye ve ilgili mekanizmaya iletilir. Bu sinyaller mevcut hücrenin kendi iç çevresinden gelebilir veya hücrenin dışından gelebilir. Çok hücreli bir organizmanın belli bir hücresi kararları tek başına değil çevreden gelen bu sinyalleri de değerlendirerek verir. Çevreden gelen sinyaller aynı doku veya organdaki diğer hücrelerden ve uzak vücut bölgelerinden gelmektedir. Bu sinyallerden bir kısmı organizmanın dış çevresini algılayan özel hücre gruplarından gönderilir. Sonuçta belli bir hücre bir mekanizmayı uyarırken veya durdururken topyekün vücut hücrelerinden gelen sinyalleri değerlendirerek dengeli bir fizyolojik durumun oluşması için uygun bir davranış şeklini gerçekleştirir. Hücrede bulunan sensör moleküller (reseptör proteinler) hücrenin yakın çevresindeki sinyal proteinleriyle etkileşir. Bu protein sinyaller ve bunların sensörleri, hücre döngüsü veya apoptosis düzeneği ile bağlantılandırılmıştır. Bu sinyaller bir metabolik yol üzerinde ivmelendirici veya durdurucu olarak iş görmektedir.

Kanserin genetik temeli hücre sayısını düzenleyen homeostatik mekanizmaların mutasyonlarla aksamasına dayanır. **Kanser** kötü huylu (malignant) tümörlerdir, kontrolsüz bir şekilde büyürler. İlerledikçe vücuda yayılma yani metastas yeteneği kazanırlar.



Şekil 11.1: Normal ve kanser hücrelerde hücre sayısının düzenlenme mekanizmalarının özeti. a) Normal hücrelerin hayatta kalması ve çoğalması için gerekli doğru dış (hücre dışı!) sinyaller. b) Normal hücrelerin ölümü veya çoğalmanın baskılanması için gerekli doğru dış sinyaller. c) Normal hücrelerin çoğalmaksızın hayatta kalmaları için gerekli doğru dış sinyaller. d) Kanser hücrelerinde kendikendine hayatta kalma ve çoğalma sinyalleri.

Kanserin genetik temeli olduğunu söylediğimizde standart genetik analizlerden kastettiğimizden farklı bir şey ifade ederiz. Standart genetik analizlerde belli allellerin atalardan yavrulara aktarımını kast ederiz. Bazı kanserler kalıtnabilir forma sahipse de çoğu durumda kanser oluşumu yayılcıdır (yani bireyde oluşur ebeveynlerden alınmaz, yavrulara geçmez). Belli tip bir kanser bir ailenin bir bireyinde oluşur fakat bu kişinin akrabalarında oluşmaz. Mutasyonlar bu kişinin (erken gelişme safhalarında vücut ve eşey hatları ayrıldıktan sonra) somatik bir hücre hattında sonradan ortaya çıkar. Zaman içinde çok sayıda somatik mutasyon vücut hücrelerinde birikir, çok sayıda genin fonksiyonunu değiştirir veya durdurur, sonunda kanserli bir hücre üretilir. Bu hücrenin yavru hücreleri (mitoz!) kanserli bir hücre klonuna dönüşür. Bu klonlar **birincil tümör** olarak bilinir. Eğer bu hücreler denetlenmezse bu tümör gelişmeye devam edecek ve vücuttaki diğer doku ve organları işgal edecektir.

Kanserlerin çoğunun somatik mutasyonal olaylar olduğu düşünülürken kanseri standart genetik analizlerle çalışamayacağımız ortaya çıkar. Bunun yerine mutasyonal değişiklikleri keşfetmek ve bu değişikliklerin hücresel metabolik yolları nasıl etkilediğini anlamak üzere diğer yaklaşımlar uygulamamız gerekmektedir. Kanser oluşumu için çok sayıda metabolik yolun mevcut olduğunu, ancak bu yolların tamamının normal hücre döngüsü düzenlenişine ve apoptosise duyarız hücrelerin yaratılmasına neden olduğunu göreceğiz.

Hücreler sinyal iletim yollarındaki anahtar hedef proteinlerin aktivitesini modüle ederler. Bu modülasyon nispeten küçük modifikasyonlarla gerçekleştirilir (allosterik efektörlerle protein kompleksleri oluşturmak, fosfat bağlamak ve fosfat koparmak gibi). Genetiğin çoğu, aynı zamanda hücre biyolojisinin çoğu bu modülasyonlara bağımlıdır. Anahtar düzenleyici proteinler aktif ve inaktif halleri arasında gider-gelirler. Hangi halde bulunacakları topyekün vücuttaki iletişim açısından gelen sinyallerin toplamından belirlenir.

11.1 Kanser: Hatalı Hücre Sayısının Düzenlenişinin Genetik Temelleri

Biyoloji hakkında, normal işleyişi bozan mutasyonların özelliklerini inceleyerek çok büyük bilgilere ulaştık. Bu durum kanser için de doğrudur. Somatik hücrelerin bütün kanserleri hücrede biriken bir seri mutasyon ile ortaya çıkmaktadır. Bu mutasyonların bazıları bir genin aktivitesini değiştirirken diğer tip mutasyonlar aktiviteyi tamamen yok eder. Kanser uyarıcı bu mutasyonlar birkaç temel gruba ayrılır:

1. Hücrenin çoğalma yeteneğini artıranlar,
2. Bir hücrenin apoptosise duyarlılığını azaltanlar ve
3. Hücrelerin genel mutasyon oranlarını ve ömür uzunluğunu artıranlar. Bu durumda hücre çoğalması ve ölümünü uyarımlar da dahil bütün mutasyon tiplerinin uzun ömürlü bir hücrede meydana gelmesi olasıdır.

Kanser tanısı ve tedavisi ile ilgili olarak çok önemli ilerlemeler sağlanmıştır. Bazı başarılar kazanıldıysa bile kanserle savaşta zafer ilan etmek için daha çok uzun bir yol vardır. Kanser genetik ve genomik analizi, keşfedilecek yeni ve önemli boyutlar sunmaktadır.

11.2 Kanser Hücresinin Normal Hücreden Farkı

Kötü huylu tümörler yani **kanser** tek bir hücreden köken almış hücre kümeleridir. Diğer bir ifadeyle malignant hücreler tek bir klonun üyeleridirler. Kanser hücreleri normal komşu hücrelerden bazı fenotipler bakımından farklılık gösterir: Hızlı bölünme oranı, yeni hücre alanları işgal etme, yüksek metabolik oran ve anormal şekil. Sözelimi epitel hücreleri tek tabaka oluşturan, kültür kabı yüzeyine dokunarak çoğalan hücrelerdir; kanser epitel hücreleri ise hızla üst üste tabakalar oluşturacak şekilde çoğalırlar.

Normal hücresel fizyolojiyi düzenleyen etkenlerin değişime uğradığı açıktır. O halde kanserin altında yatan neden nedir? Çok sayıda farklı tip hücre malignant forma dönüşebilmektedir. Bu hücre tiplerinin hepsinde ortak bir dönüşüm şekli var mıdır? Yoksa her biri farklı bir şekilde mi oluşmaktadır? Kanseri daha genel anlamda algılayabiliriz: *Hücrenin kontrolsüz bir şekilde çoğalmasına neden olan çok sayıda mutasyonun bi-*

rikmesinin bir sonucu. Bu çok sayıdaki mutasyonlardan bazıları, ataların eşey hatlarından alınmış olabilir (kalıtlanmış mutasyon!). Fakat büyük çoğunluğu belli bir hücreden köken alan somatik hücre hatlarında yeniden oluşur (kalıtlanmaz!). Yüksek hayvanlarda gelişmiş olan çok hücreli hayatın sürdürülebilirliği, doku ve organ sistemlerinin organize hücreleri tarafından gerçekleştirilen iş birliği ve iletişime bağlıdır. Bir anlamda kanser hücreleri, asosyal ve izole bir hale geçmiştir, kendi dışındaki etkilerden etkilenmeksizin hareket eder. Kanserli hücreler bir bakıma “sağır” hücrelerdir, komşu hücrelerden gelen bölünmeyi durdurma sinyallerini veya kendi kendini yok etme sistemlerini uyarma sinyallerini duymaz.

11.3 Kanser Hücrelerinde Mutasyon

Tümörler bir dizi mutasyonun sonucu ortaya çıkar ve bunun sonucu olarak kontrolsüz çoğalma ve hücre ölümü oluşur. Bir tümör tek bir mutasyon olayı sonucunda değil fakat bir hücredeki çok sayıda mutasyonun sonucu ortaya çıkar. Çok özel durumlarda tek bir mutasyon kanser oluşumunu sağlamak için yeterli olabilmektedir. Sözgelimi bir gende meydana gelen bir mutasyonun Mendel faktörleri gibi yeni nesillere aktararak retinoblastomaya neden olduğunu biliyoruz. Bundan daha az aktarım özelliği gösteren ama daha yaygın olan kanserler de vardır. Kolon kanseri ve astrositomunun (sinir hücreleri kanseri) ilerlemesi için malign hücrelerde çok sayıda farklı tip mutasyonun birikmesinin gerektiği bilinmektedir.

Kanser oluşumunda genlerin nasıl işlev gördüğünü düşündüğümüzde iki genel gen mutasyon tipinden söz etmek mümkündür:

- i. **Onkogen** mutasyonları kanser hücrelerinde baskın bir mutasyondur ve hücreye kanser özelliğini kazandırır (işlev-kazanma = gain-of-function). Tek bir mutant allel kanser özelliğinin kazanılması için yeterlidir. Eğer mutasyon, protein kodlayan DNA bölgesinde ise kodlanan proteinin yapısının değişmesine neden olur. Eğer mutasyon bir düzenleyici elementteyse normal bir proteinin yanlış düzenlenmesine neden olur. Bu genlerin normal, mutasyona uğramamış formlarına **proto-onkogen** denir.
- ii. **Tümör baskılayıcı genler**deki mutasyonlar çekinik mutasyonlardır (işlev kaybetme = loss-of-function). Yani ilgili allelerin her ikisi de düşük aktiviteli veya aktiviteye sahip olmayan ürünler üretmelidir.

Kanser oluşturan mutasyonlarla değişime uğrayan bir çok protein hücrelerarası iletişim ve hücre döngüsü ve apoptosisin düzenlenmesinde görev alan proteinlerdir (Tablo 11.1). Onkogenler haline gelen genlerin kodladığı proteinler hücre döngüsünü pozitif kontrol eden (açan) veya apoptosisi negatif olarak kontrol eden (kapatan) proteinlerdir. Bu proteinler artık uygun (olması gereken) sinyal olmamasına rağmen aktif durumdadır. Sonuç olarak onkogenler ya hücre çoğalması oranını artırarak ya da apoptosisi engelleyerek etkisini gösterir. Öbür yandan tümör baskılayıcı genler hücre döngüsünü durduran veya apoptosisi uyaran proteinleri kodlarlar. Bu genlerdeki mutasyonlarla hücre çoğalmayı durdurucu fren sistemini kaybeder.

Tablo 11.1: Bir genin kodladığı normal proteinin fonksiyonu ve tümör uyarıcı mutasyonların özellikleri.

Yabani tip protein fonksiyonu	Tümör uyarıcı mutasyonların özellikleri
Hücre döngüsünün ilerlemesini uyarır	Onkogen (işlev kazanma)
Hücre döngüsünün ilerlemesini durdurur	Tümör baskılayıcı mutasyonu (işlev kaybetme)
Apoptosisi uyarır	Tümör baskılayıcı mutasyonu (işlev kaybetme)
Apoptosisi baskılar	Onkogen (işlev kazanma)
DNA tamirini uyarır	Tümör baskılayıcı mutasyonu (işlev kaybetme)

Tümör uyarıcı mutasyonlar farklı şekillerde tanımlanabilir. Bir defa genomdaki pozisyonu belirlendiğinde bu bölgeler klonlanabilir. Klonlanmış bu genlerin, malignant duruma geçişe nasıl katkıda bulduklarını öğrenmek üzere araştırmalar yürütülebilir.

11.3.1 Onkogen sınıfları

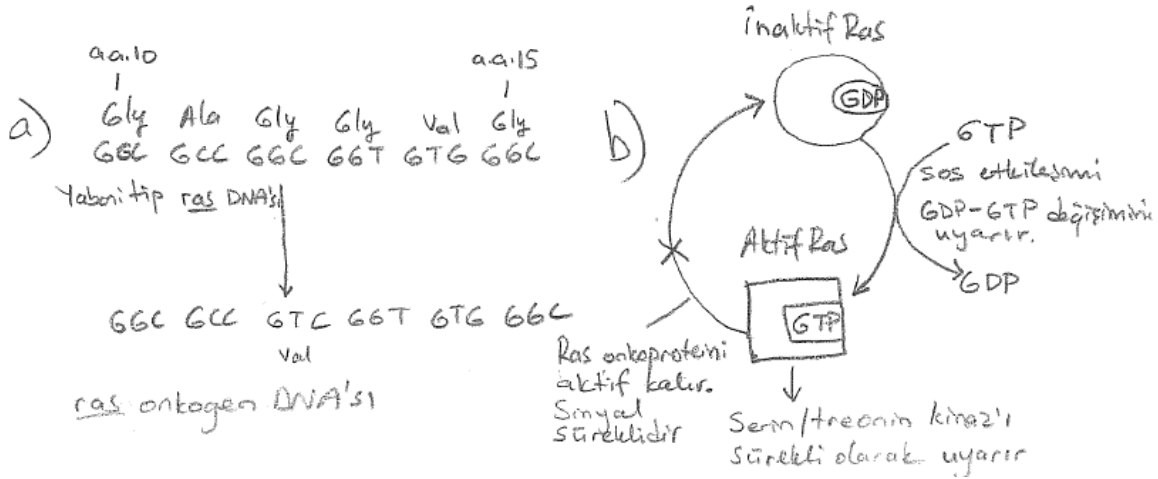
Kabaca yüz civarında onkogen tanımlanmıştır (Tablo 11.2). Onkogenlerin normal formları (proto-onkogenler) nasıl işlev görür? Protoonkogenler uygun düzenleyici sinyallerin varlığında aktiftirler. Bu genlerin son ürünleri hücre döngüsünü uyararak metabolik yolların üyelerindendirler. Bu ürünler, büyüme faktörü reseptörleri, sinyal iletilen proteinler ve transkripsiyon düzenleyicileridir. Diğer protoonkogen ürünleri apoptosis metabolik yolunu baskırlarlar. Her iki tip proto-onkogenlerde meydana gelen mutasyonlar düzenleyici metabolik yolların kontrolden çıkarak sürekli (düzenlenmeksizin) ekspresyonuna neden olur. Bir onkogenin, sürekli olarak ekspresyonu gerçekleştirilen protein ürünü **onkoprotein** olarak adlandırılır. Onkogenlerden sadece bazıları örnek olarak incelenecektir.

Tablo 11.2: İyi karakterize edilmiş bazı genler ve oluşturdukları proteinlerin normal fonksiyonları

Onkogen	Lokasyon	Fonksiyon
Çekirdek transkripsiyon düzenleyicisi		
<i>jun</i>	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü
<i>fos</i>	Çekirdek	Transkripsiyon faktörü
<i>erbA</i>	Çekirdek	Steroid reseptörü
Hücreiçi sinyal iletilen		
<i>abl</i>	Sitoplazma	Protein tirozin kinaz
<i>raf</i>	Sitoplazma	Protein serin kinaz
<i>ras</i>	Sitoplazma	GTP/GDP bağlanma proteini
Mitojen		
<i>sis</i>	Hücre dışı	Salgı gelişme hormonu
Mitojen reseptörleri		
<i>erbB</i>	Transmembran	Reseptör tirozin kinaz
<i>fms</i>	Transmembran	Reseptör tirozin kinaz
Apoptosis baskılayıcısı		
<i>bcl2</i>	Sitoplazma	Kaspaz akış inhibitörü

11.3.1.1 Hücre içi bir sinyal taşıyıcıda nokta mutasyon

Onkogen *ras*, bir sinyal iletim yolundaki tümör uyarıcı bir mutasyonu temsil eder. Proteinin normal formdan onkoproteine dönüşümü protein yapısındaki bir değişiklikten kaynaklanır, *ras* genindeki tek bir nokta mutasyon bu değişiklikten sorumludur. Ras proteininin 12. pozisyonundaki glisin amino asiti tek bir baz çifti değişimi ile valine değişir. Bu onkoprotein sözcüğü insanda prostat kanserinde gözlemlenmektedir (Şekil 11.2). Normal Ras proteinini bir sinyal iletim yolunun G- altbirimidir. Sinyal, bu protein fosforlandığında (G-GTP) (aktif durum) sitoplazmik bir serin/treonin kinaza aktarılır. Sonra fosforlanmış normal Ras proteinini defosforile olarak (G-GDP) (inaktif durum) sinyal durdurulur. Sonuçta *ras* onkogenindeki yanlış anlamlı bir mutasyon onkoprotein oluşumuna neden olur, bu onkoprotein GTP'ye sürekli bağlı kalır ve sinyal almamasına rağmen sinyal iletim yolunu sürekli uyarılmış durumda tutar. Bu sürekli sinyal iletimi hücre çoğalmasını uyarır.

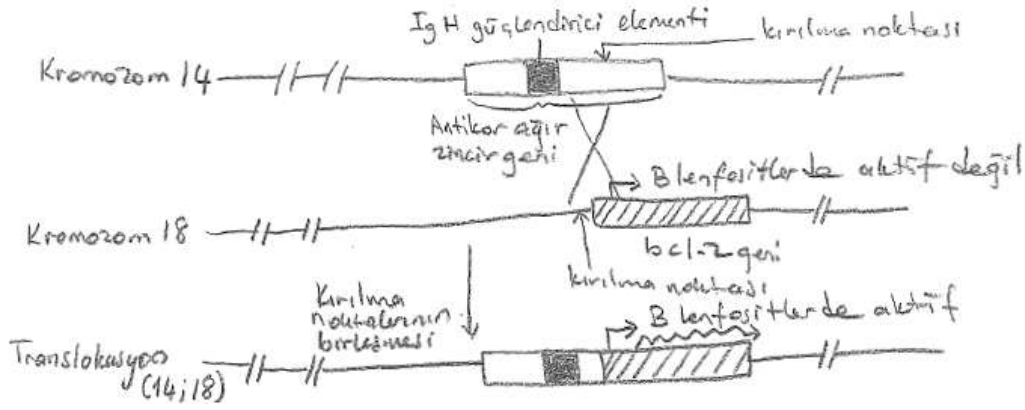


Şekil 11.2: Ras onkoproteini. a) Ras onkoproteini, 12. pozisyonundaki glisin amino asitinin valin amino asitine değişmesine neden olan bir nokta mutasyonun sonucu oluşur. b) Ras onkoproteini GTP'yi GDP'ye hidroliz edemez ve kinazları sürekli olarak uyarır.

11.3.1.2 Bir apoptos baskılayıcının yanlış ekspresyonuna neden olan gen füzyonu

Bazı onkogenler normal proteinlerle özdeş yapıda onkoproteinler üretirler. Bu durumda mutasyon normal bir proteinin sentezlenmesine neden olur, fakat bu protein sentezlenmemesi gereken bir hücrede sentezlenmektedir, yani bu gen doğru bir şekilde düzenlenmemektedir.

Yanlış ekspresyona neden olan çok sayıda onkogen farklı tip B lenfosit tümörlerinde tanımlanabilmektedir ve kromozomal translokasyonla ilişkilidirler. B lenfositler ve onların soyundan gelen plazma hücreleri antikör sentezlenen hücrelerdir. B hücresi onkogenlerindeki translokasyonlarda protein füzyonuna rastlanmamaktadır. Kromozom yeniden düzenlenmeleri yanlış bir dokuda bir genin açılmasına (turn on) neden olur. Foliküler lenfomada hastaların %85'i kromozom 14 ile 18 arasında bir translokasyona sahiptir (Şekil 11.3).



Şekil 11.3: Foliküler lenfomada kromozomal yeniden düzenlenme. *IgH* güçlendirici element kromozom yeniden düzenlenmesi sonucu *bcl-2* geninin yukarısına yerleşir ve ekspresyonu artırır.

Kromozom 14'ün kırılma noktası yakınında bir antikor genine ait transkripsiyonal güçlendirici element vardır. Bu transloke olan güçlendirici element apoptosisi negatif olarak düzenleyen (hücre ölümünün durması!) *bcl-2* geniyle birleşir. Bu "güçlendirici-*bcl-2*" füzyonu, B lenfositlerde büyük miktarlarda Bcl-2 proteininin ekspresyonuna neden olur. Çok miktardaki Bcl-2 bu lenfositlerdeki apoptosisi etkili bir şekilde engeller. Bu B lenfositler alışılmadık bir şekilde uzun ömürlüdürler. Bu uzun ömür hücre çoğalmasını teşvik ederek mutasyonların birikmesine şans verir.

11.3.2 Tümör baskılayıcı gen sınıfı

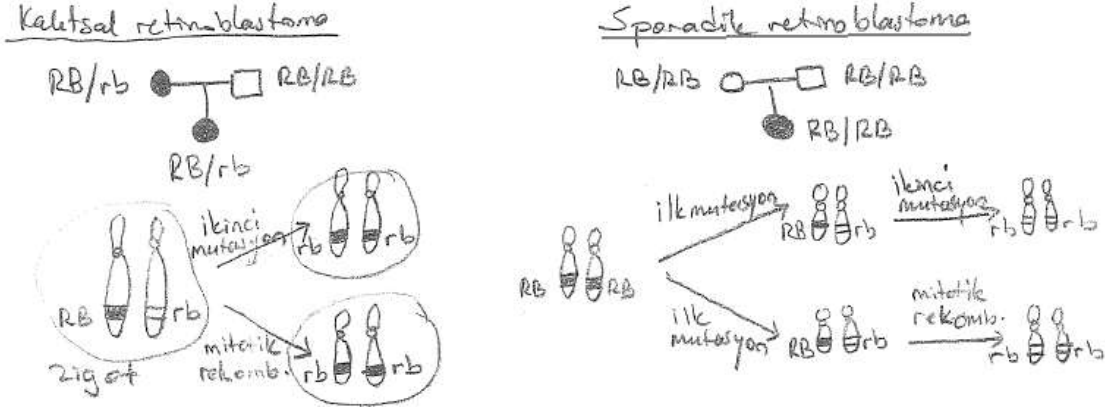
Tümör baskılayıcı genlerin fonksiyonları proto-onkogenlerin fonksiyonunu tamamlayıcı yöndedir. Bazı tümör baskılayıcı genler TGF- β sinyal iletim yolunun veya Rb proteini gibi hücre döngüsünün negatif düzenleyicileridir. Bazıları apoptosisin pozitif düzenleyicisidir. Diğer bazıları hasar görmüş DNA'nın tamirinin kontrolünden sorumlu veya hücre hayat uzunluğunu kontrol eden dolaylı oyuncularındır.

11.3.2.1 Hücre çoğalmasını durduran bir proteinin nakavtı

Retinoblastoma tipik olarak genç çocukları etkileyen bir retina kanseridir. Retinoblastomada Rb proteinini kodlayan gen mutasyona uğramıştır ve fonksiyonel *RB* geni taşımayan retina hücreleri kontrolsüz bir şekilde çoğalır. Kanser hücresele seviyede çekiniktir: *RB* allelerinin her ikisi de hücrede herhangi bir yolla mutasyona uğramalıdır (*rb* mutant allele). Bu çift mutasyon bir hücrede meydana geldiğinde o hücreden köken alan hücreler retinayı istila eder (kontrolsüz bölünür!). Gözlerden sadece birinin bir bölgesinde tümör oluşur. Bu tip retinoblastoma **sporadik retinoblastoma** (yayılmacı retinoblastoma) olarak bilinir (Şekil 11.4).

Bazı hastalar kalıtsal olarak retinoblastoma gösterirler (binoküler retinoblastoma). Bu durumda *RB* allelerinde biri atadan mutant olarak alınır. Bu heterozigot bireylerde ikinci bir mutasyonla veya mitotik krosing over/ayrılmama ile bazı hücrelerdeki her iki allel de mutasyona uğrar ve kontrolsüz olarak çoğalmaya başlar. Bu durumda her iki gözde de tümör görülür ve **kalıtsal retinoblastoma** olarak bilinir (Şekil 11.4).

Rb proteininin yokluğu niçin tümör gelişimini uyarır? Normal hücrelerde Rb proteini bir transkripsiyon faktörüne (E2F) bağlanır. Rb bağlı E2F bazı genlerin ekspresyonunu durdurur. Transkripsiyonu durdurulan bu genlerin ürünleri DNA replikasyonu ve S fazının bazı fonksiyonlarının kontrolü için gereklidir. İnaktif Rb E2F'ye bağlanamaz, dolayısıyla serbest E2F, S-fazını sürekli uyarılabilir durumda tutar. Bu nedenle retinoblastoma hücrelerinde hücre döngüsünün, G1 fazında durdurulması mümkün olmaz.



Şekil 11.4: Kalıtsal ve sporadik retinoblastomaların mutasyonel kökeni.

Bu tip kanser genleri LOH (loss-of heterozygosity), SNP (single nucleotide polymorphism), SSLP (single sequence length polymorphism) veya RFLP (restriction fragment length polymorphism) gibi moleküler tekniklerle belirlenebilmektedir.

11.3.2.2 Çoğalmayı durduran ve apoptosisi uyarıcı bir proteinin nakavtı

p53 diğer bir tümör baskılayıcı gen olarak tanımlanmıştır. *p53* içindeki mutasyonlar çok farklı tip tümörlerle ilişkilidir. İnsan tümörlerinin % 50'sinde fonksiyonel bir *p53* geni mevcut değildir (mutant kopyalar vardır!). Yabani tip *p53* proteini DNA hasarına tepki olarak aktive edilen bir transkripsiyonel düzenleyicidir. Aktive olmuş yabani tip *p53* proteini iki görev yapar: DNA hasarı tamir edilene kadar hücre döngüsünü durdurur ve bazı durumlarda apoptosisi uyarır. Eğer fonksiyonel bir *p53* geni yoksa DNA hasarı tamir edilmeksizin bile hücre döngüsü sürer. Hücre döngüsünün mitozla girmesiyle mutasyon sıklığı (hasarlı DNA'nın yavru hücrelere paylaşılması!), kromozomal yeniden düzenlenme ve aneuploidi oranları artar, böylece hücre çoğalmasını uyarıcı veya apoptosisi baskılayan mutasyonların birikme şansı artar.

Sıfır (Null) mutasyonların insanlarda tümör ilerlemesine önemli katkısının olduğu açıktır. [Null (sıfır) mutasyonlar, bir genin fonksiyonunun tamamen yok olmasına neden olan mutasyonlardır.] Bu sıfır mutasyonlar normalde tümör baskılayıcı genlerde meydana gelir. Bu genler normalde DNA tamir yolunda görevlidirler. Bu genlerdeki mutasyonlar DNA tamirini engeller. Bu mutasyonlar tümör oluşumunu, mutasyon oranlarının artmasına neden olarak, dolaylı bir şekilde etkilerler. Sonuçta hücre döngüsünün programlanmış hücre ölümünün düzenlenmesini bozarak onkogen ve tümör baskılayıcı mutasyonlarının artma şansını artırır. Çok sayıda bu tip tümör baskılayıcı gen mutasyonları tanımlanmıştır. Bunlardan bazıları kalıtlanabilir kanser formlarıyla ilgilidirler. Sözgelimi *BRCA1* ve *BRCA2* mutasyonları ve meme kanseri.

11.4 Kanser tanısı ve tedavisinde genomik yaklaşımlar

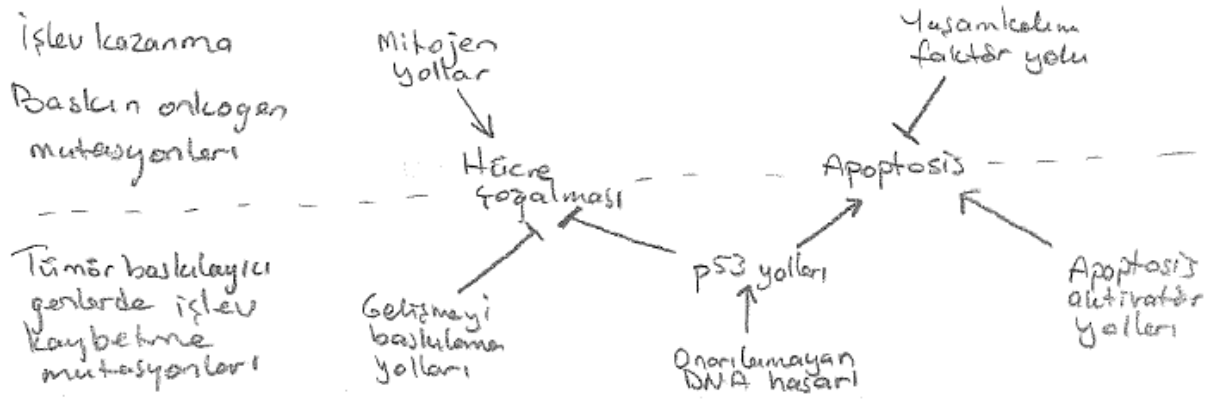
Buraya kadar incelediğimiz kanserin genetik temelleriyle ilgili bilgiler bireysel genlerin analizlerinden elde edilmiştir. Bu gün için kanserin anlaşılması tanısı ve tedavisiyle ilgili araştırmalarda bir bütün olarak genomik düzeyde analizler sürdürülmektedir. Kanserle ilişkili gen bölgelerinin belirlenmesi için, SNP (tek nükleotit polimorfizmi) oligonükleotitleri ile oluşturulmuş SNP yongaları kullanılarak bütün genom taranabilmektedir. Belli bir bireyin kanser hücreleriyle normal hücrelerinden elde edilen SNP yonga sonuçları karşılaştırılarak sözcüğü tümör baskılayıcı genlerdeki mutasyonlar belirlenebilmektedir.

Kanser tanısının temel hedeflerinden biri hastanın hangi tip kanser taşıdığına belirlenmesidir. Bu işlem geleneksel olarak mikroskopik inceleme ile gerçekleştirilir. Fakat mikroskopik görünümü aynı olmasına rağmen moleküler esası çok farklı olan tümörler de vardır. Bu problem genomik yaklaşımlarla aşılabilmektedir. Lenfomalarda lenfositler çok büyük miktarlarda çoğalırlar, kan hücreleri arasındaki denge bozulur ve immün tepki doğru ve etkili bir şekilde gerçekleşemez. Bu lenfomalardan biri DLBCL tipi lenfomadır (DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma). Klinik belirtileri ve histolojik özellikleri aynı olmasına rağmen hastaların yalnız % 40'ı kemoterapiye cevap vererek düzelebilmektedir. Bu hastalarda bütün genom bazında genlerin ekspresyonları incelenmiştir. Bu analizlerde DNA yongaları kullanılarak hastalarda çok sayıda transkript belirlenebilmektedir. Bu tip analizler mikrosıra (microarray) analizi olarak bilinir. Mikrosıra analizleriyle elde edilen sonuçlarda hastalardan %40'luk kemoterapiye cevap verelerin gen ekspresyonu ile diğerlerinin gen ekspresyon modellerinin farklı olduğu görülmüştür. Dolayısıyla klasik yaklaşımlarla aynı gibi tanımlanan bir kanser tipinin gerçekte iki farklı kanser tipi olduğu fonksiyonel genomik analizlerle ortaya çıkmıştır. Kanser tipinden kanser tipine veya malignanlık seviyelerine bağlı olarak oluşturulan farklı tip RNA moleküllerinin son ürünleri olan proteinler, farklı tip kanserlerin önlenmesinde kullanılacak ilaçların hedefi olabilir.

Burada verdiğimiz örnekler çok yüzeyseldir. Gerçekte kanser araştırmalarında, tanı ve tedavisinde fonksiyonel genom araştırmaları çok daha derinlemesine kullanılmaktadır. Gelecekte çok daha ileri gelişmeler sağlanacağı şüphesizdir.

11.5 Kanserın Kompleksliği

Tümör gelişimini uyaran çok sayıda mutasyonun meydana geldiğini biliyoruz. Bu mutasyonlar hücre çoğalması ve apoptosisi yöneten süreçleri değiştirmektedir (Şekil 11.5). Yine de hikaye burada bitmez. Epigenetik izleme gibi diğer tip gen inaktivasyon şekillerinin de tümör uyarıcı lezyonlar oluşturabildiğine dair deliller de vardır. Ayrıca hücre ölümsüzlüğü (kanseri hücrelerinin bir özelliği) için gerekli olan telomeraz enziminin fazla miktarda ekspresyonunun yapıldığına dair deliller de mevcuttur. Malignant tümörler bile çoğalma hızları, diğer dokuları işgal etme ve metastas oluşturma yetenekleri bakımından farklılıklar gösterirler. Şüphesiz olarak malignan safhadan sonra bile, tümör hücrelerinde çok daha fazla mutasyon birikir. Bu, çoğalma ve yayılma gücünü daha fazla teşvik eder. Sonuç olarak tümörün nasıl oluştúđu ve ilerlediğini gerçek ve kapsamlı bir şekilde anlayana kadar almamız gereken önemli bir mesafe vardır.



Şekil 11.5: Tümör oluşumuna katkı sağlayan temel olaylar: hücre çoğalmasının ve hücre ömrünün artırılması (apoptosisin azaltılması).

KAYNAKLAR

1. **Genetics.** P.J. Russel. Harper Collins College Publishers, Fourth Edition, 1996, New York.
2. **Genetics. Problem Solving Guide.** W.R. Wellnitz. WCB Publishers 1995, Dubuque.
3. **Genetik Kavramlar.** W.S. Klug, M.R. Cummings. 8. Baskıdan Çeviri. Çeviri Ed. C. Öner. Palme Yayıncılık, 2009, Ankara.
4. **Human Genetics. The Molecular Revolution.** E.H. McConkey. Jones and Bartlett Publishers, 1993, Boston.
5. **Introduction to Genetic Analysis.** A.J.F. Griffiths, S.R. Wessler, R.C. Lewontin, W.M. Gelbart, D.T. Suzuki, J.H. Miller. W.H. Freeman and Company, Eighth Edition, 2004, New York.
6. **Genetik Analize Giriş.** A.J.F. Griffiths, S.R. Wessler, S.B. Carroll, J. Doebley. 10. Baskıdan Çeviri. Çeviri Ed. E.D. Özsoy. Palme Yayıncılık, 2014, Ankara.
7. **Molecular Biology of the Gene.** J.D. Watson, T.A. Baker, S.P. Bell, A. Gann, M. Levine, R. Losick. Pearson Education, Seventh Edition, 2014, Boston.
8. **Temel Moleküler Biyoloji.** L.A. Allison. 2. Baskıdan Çeviri. Çeviri Ed. A.O. Beldüz. Palme Yayıncılık, 2014, Ankara.
9. **Genomlar 3.** T.A. Brown. 3. Basımdan Çeviri. Çeviri Eds: F. Bardakçı, C. Ülger. Nobel, 2015, Ankara