

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

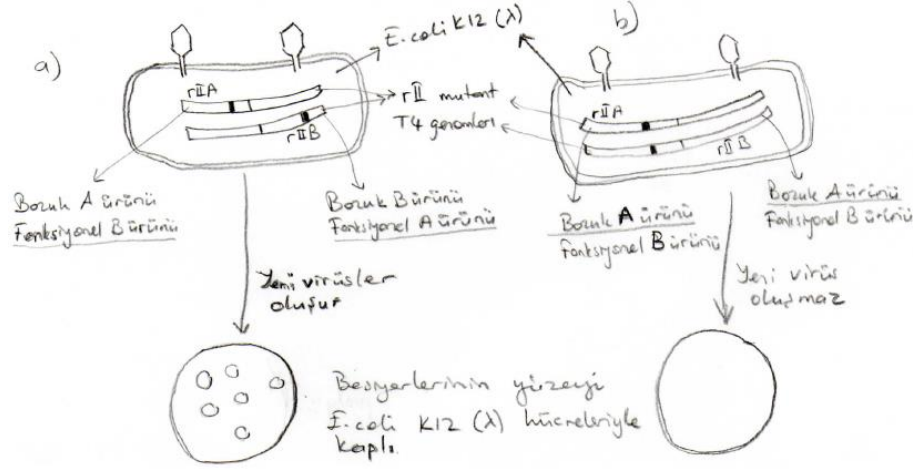
Klasik bakış açısı ile *gen bir fonksiyon birimidir, yani her gen bir fonksiyonu yönetir*. Benzer 1950'li yıllarda bakteriyofaj T4 genomunun *rII* bölgesinin bu klasik bakış açısına uygunluğunu belirlemek üzere deneyler yapmıştır. Bu deneylerde Edward Lewis'in *Drosophila*'da fonksiyonel gen birimlerinin 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 oluşturulamıyorsa 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 uzunluktaadır.



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 konfigürasyonunu 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

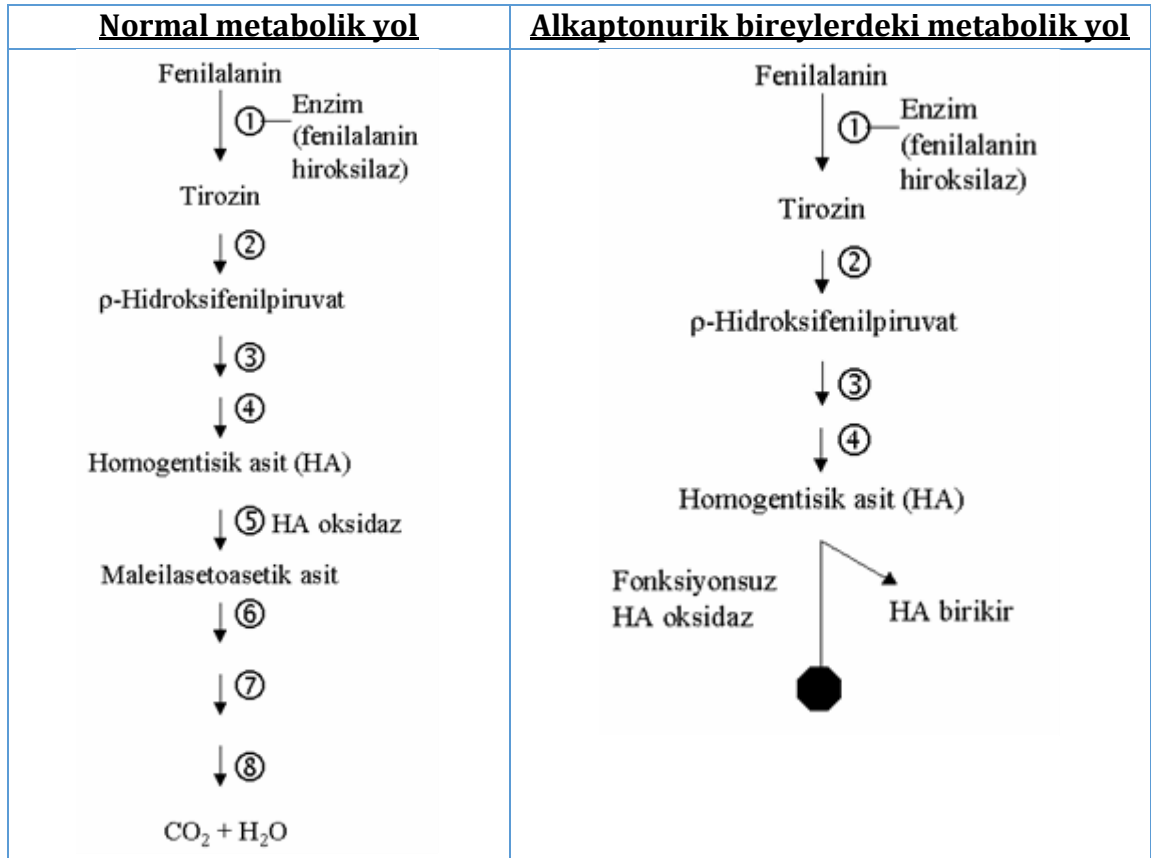
idrarlarında homogentisik asit (HA) bulunduğunu ve HA'in havayla temas ettiğinde siyah renge dönüştüğünü belirlemiştir. Garrod araştırmalarının sonucunda normal insanların HA'yi metabolize ederken alkaptonuriklerin metabolize edemediklerini öne sürmüştür.

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).

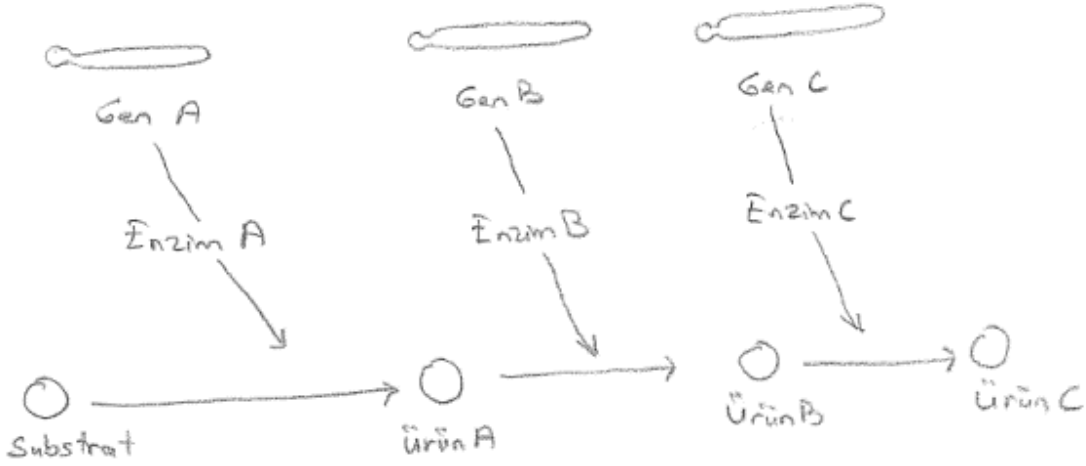
Garrod diğer üç hastalığı daha incelemiş ve bu hastalıkların da birer metabolik yolun bloke edilmesinden kaynaklandığını söylemiş, olayı **içsel metabolizma hatası** olarak adlandırmıştır. Ancak o zamanın bilim çevreleri ve hekimler bu sonuçlara itibar etmemişlerdir.

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.

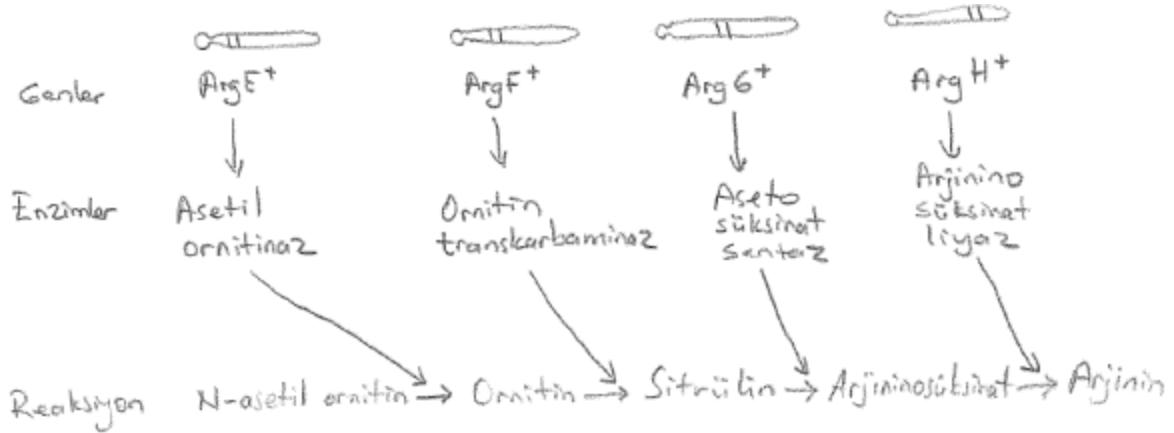


Şekil 1.2: Fenil alaninin metabolize edildiği yol ve alkaptonuriklerde bu yolun durdurulması.



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. Sözelimi ornitin transkarbaminaz mutanti 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 polipeptidin 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.

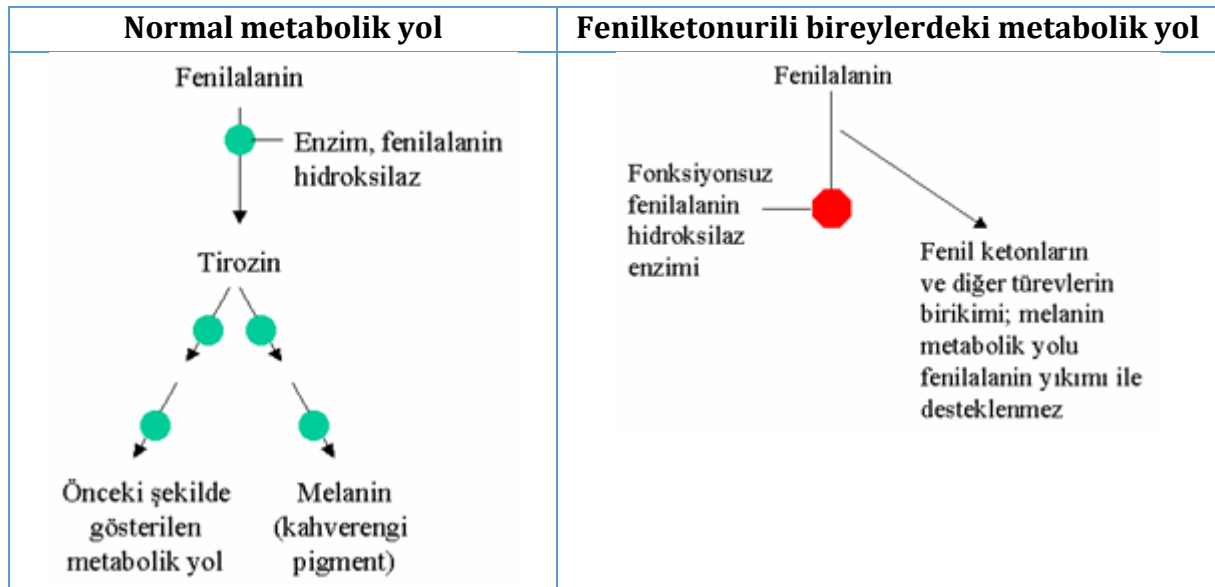
1.3 İnsanlarda Genetik Nedenli Enzim Eksiklikleri

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.

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).

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

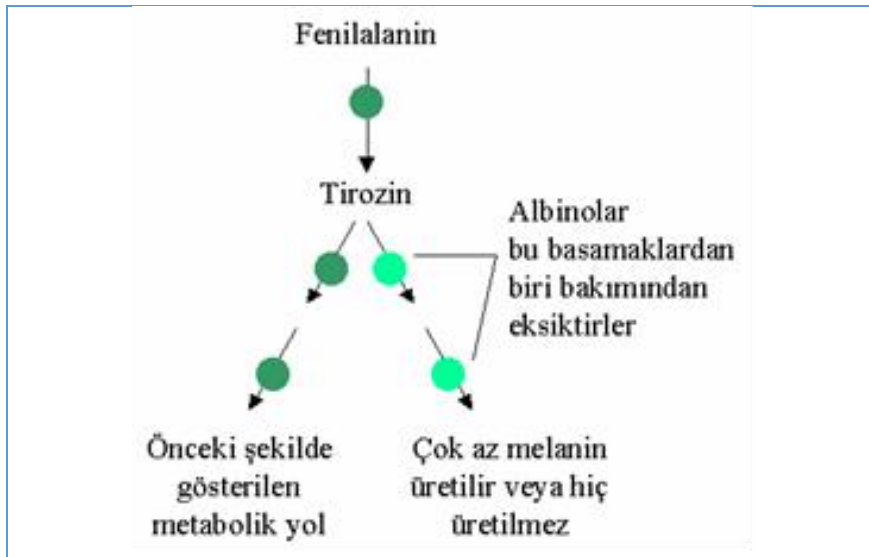


Şekil 1.5: Normal ve fenilketonurik bireylerde fenilalanin-tirozin metabolik yolu.

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 fenilketonurik birey tirozin de sentezleyemez. Bu amino asit protein sentezinde, tiroksin ve adrenalin hormonları ve deri melanin pigmentinin sentezinde kullanılır. Tirozin diyetle de alınır. Ancak fenilketonurik 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.

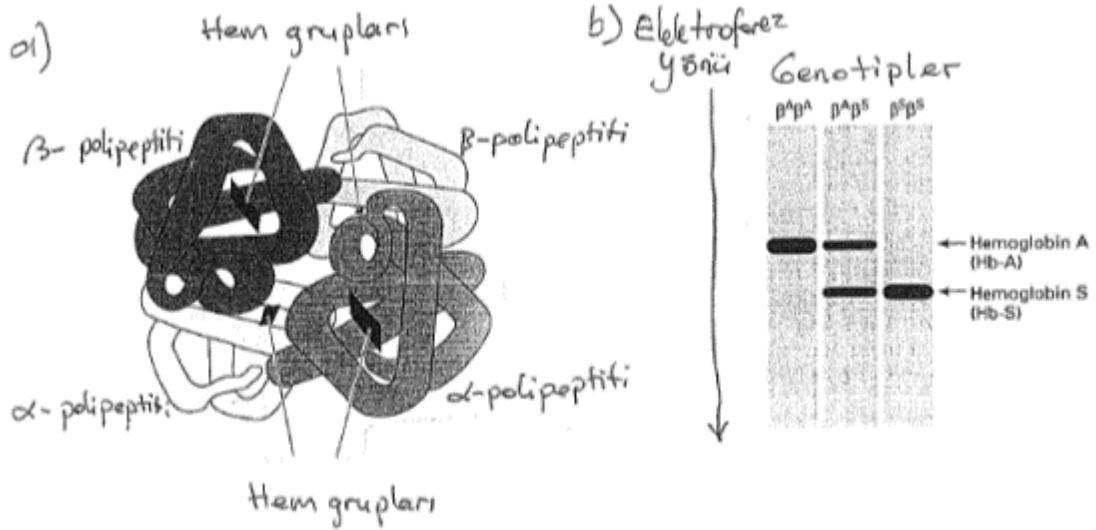
1.4 Protein Yapısının Genler Tarafından Kontrolü

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.

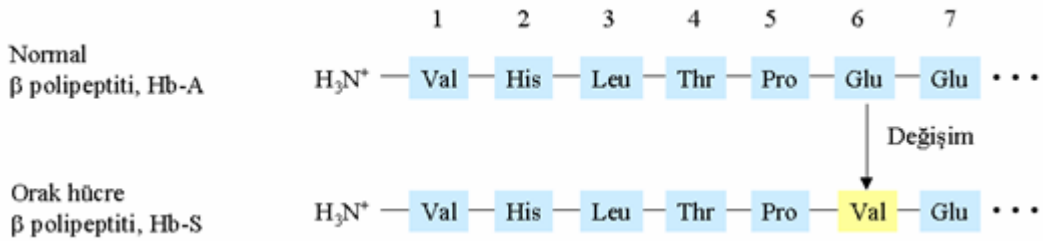
Orak hücre anemisi hemoglobin molekülündeki değişikliklerden kaynaklanır. Hemoglobin iki farklı gen tarafından kodlanır. Genlerden biri tarafından kodlanan iki α polipeptiti ve diğer gen (β -globin geni) tarafından kodlanan iki β -polipeptitinden oluşur (Şekil 1.7a). Bu yapıdaki hemoglobin Hb-A olarak 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.