

## 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 bilinmemekteydi. 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 bilinmemekteydi. 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 Maddenin Özellikleri

Genetik materyal birçok özellik ve fonksiyona sahiptir; replikasyon, bilgi depolama, depolanmış bilginin ekspresyonu ve mutasyonlar yoluyla varyasyonlar oluşturma.

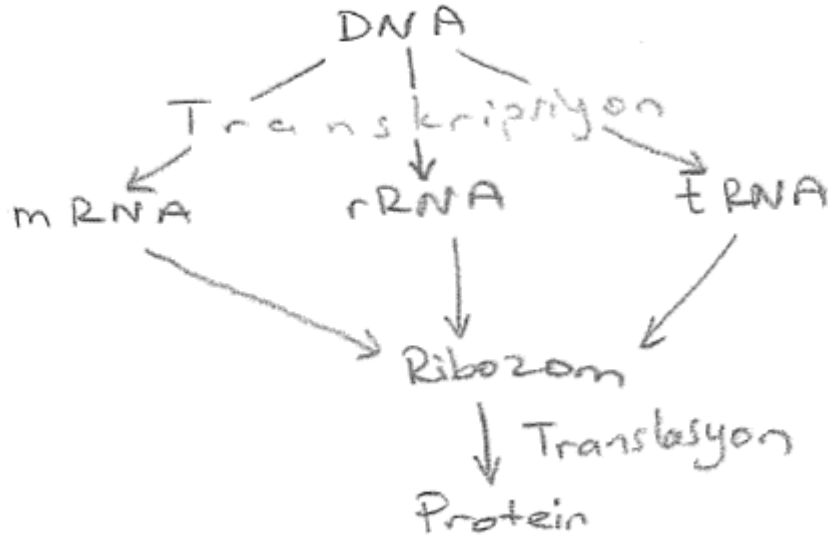
**Replikasyon**, hücre bölünmesi sırasında genetik bilginin eşit dağılmasını sağlar (mitoz). Eşeyli üremede ise, iki bireyden gelen gametlerin birleşmesiyle oluşacak yeni bireyin ataları ile aynı miktarda genetik bilgiye sahip olmasını sağlamak için replikasyon sonrasında genetik bilgi yarıya indirilir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

**Depolama**, ekspresyonu gerçekleşmeyen 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 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 populasyonda yayılacaktır.



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

## 2.2 Genetik Materyal Tartışmaları (1900-1944)

Kalıtım düşüncesi var olduğundan 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.

## 2.3 DNA'nın Genetik Materyal Olduğunu Gösteren Deneysel Kanıtlar

### 2.3.1 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.

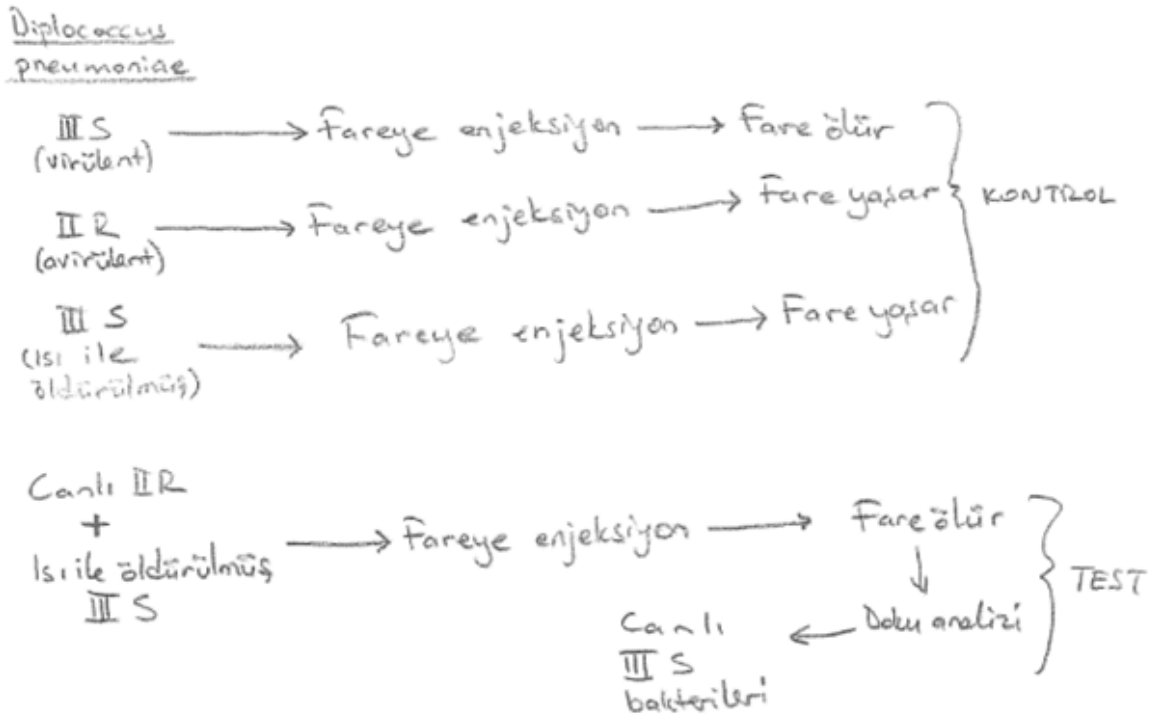
DNA'nın genetik materyal olduğuna ilişkin çalışmalar öncelikle prokaryotik organizmalar olan bakteriler ve bakterileri enfekte eden virüsler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu tercihin bazı nedenleri vardır: Her şeyden önce saatler içinde

hayat döngülerini tamamladıkları için hızlı gelişir ve çoğalırlar. Deneysel olarak manipüle edilebilirler, mutasyonlar kolayca uyarılabilir ve seçilebilir. Bu nedenlerle bu tip deneyler için idealdirler.

### 2.3.1.1 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 (IIS) farelerin zatürreden öldüğünü belirlemiştir. IIS suşuna ait bakterileri kaynatarak öldürdükten sonra farelere enjekte ettiğinde farelerin hasta olmadığını belirlemiştir. Daha sonra sıcaklıkla öldürülmüş IIS bakterileriyle canlı avirüent IIR bakterilerini karıştırmış ve fareye enjekte etmiştir. Ölmeyeceği beklentisinin aksine farenin hastalandığı ve öldüğü görülmüştür (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Griffith'in transformasyon deneyi.

Bu sonucun deneysel bir hatadan mı kaynaklandığını belirlemek üzere ölen farelerin dokularından bakterileri izole etmiş ve bu bakterilerin orijinal IIS bakterileri ile aynı olduğunu görmüştür. Sonuç olarak, "sıcaklıkla öldürülmüş IIS bakterilerinin, avirü lent IIR bakterilerini IIS virü lent formuna dönüştürdüğü nü" 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.

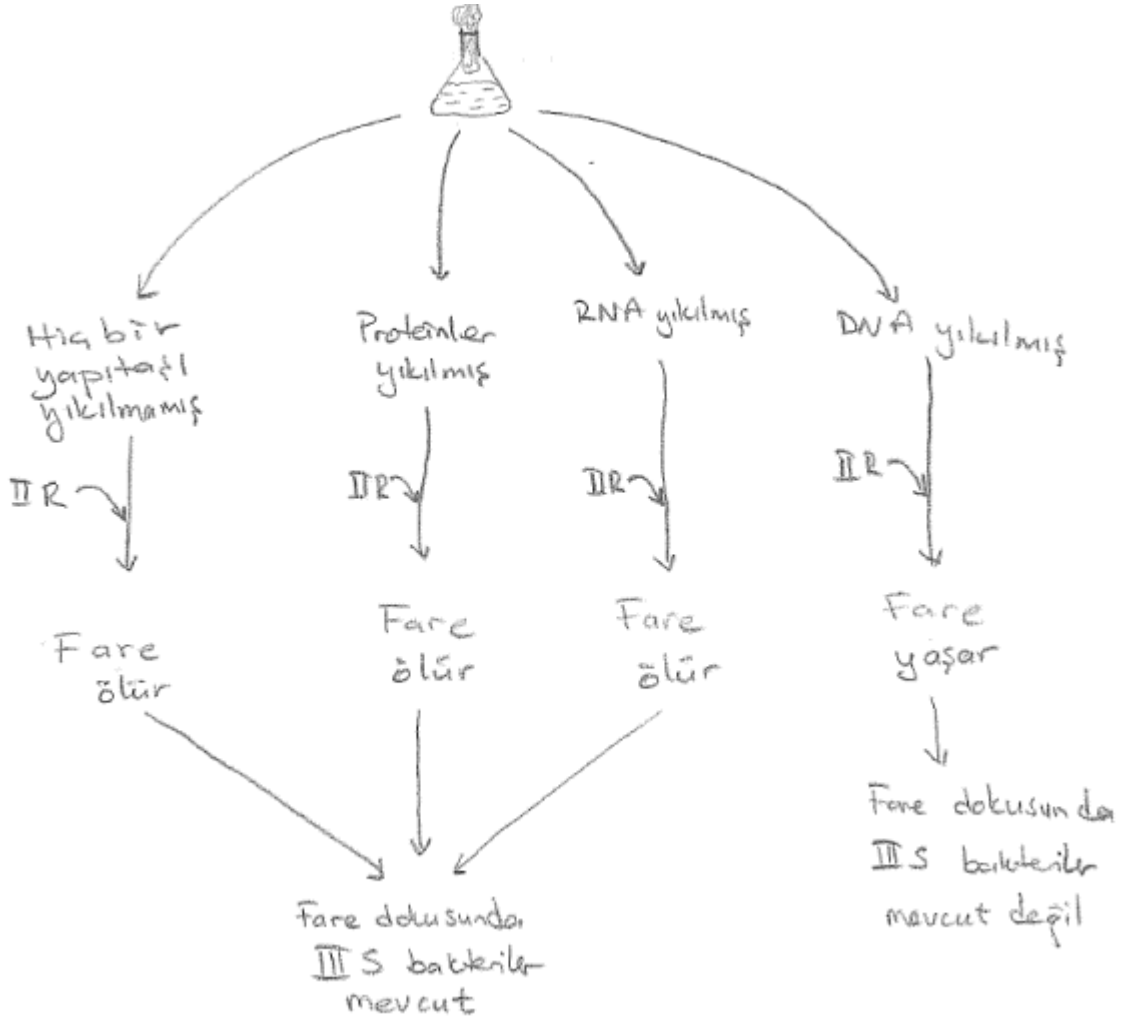
Griffith, çalışmalarının sonucunu tam doğrulukta ifade edemediyse de diğer araştırmacılara önemli bir birikim sunmuştur. Takip eden çalışmalarda transformasyonun farelere enjeksiyon yapılmaksızın *in vitro*da (test tüpünde) de gerçekleştiği, transformasyon için tam hücrelere ihtiyaç olmadığı, hücresel 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 2.3). 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 IIIS tipi polisakkarit kapsül üretimini sağladığı sonucuna ulaştılar. Ayrıca transforme olan bu hücrelerin virüent özelliklerini nesiller boyu devam ettirdiklerini belirlediler ve transformasyonun kalıtlanabilir olduğunu ve transformasyon sürecinin genetik bilgiyi etkilediği sonucuna vardılar. Bakterilerde birçok karakter transforme olabilmektedir.



Şekil 2.3: Avery ve arkadaşlarının DNA'nın, transformasyona neden olan molekül olduğunu gösteren deney düzeneği.

### 2.3.1.2 Hershey-Chase deneyi

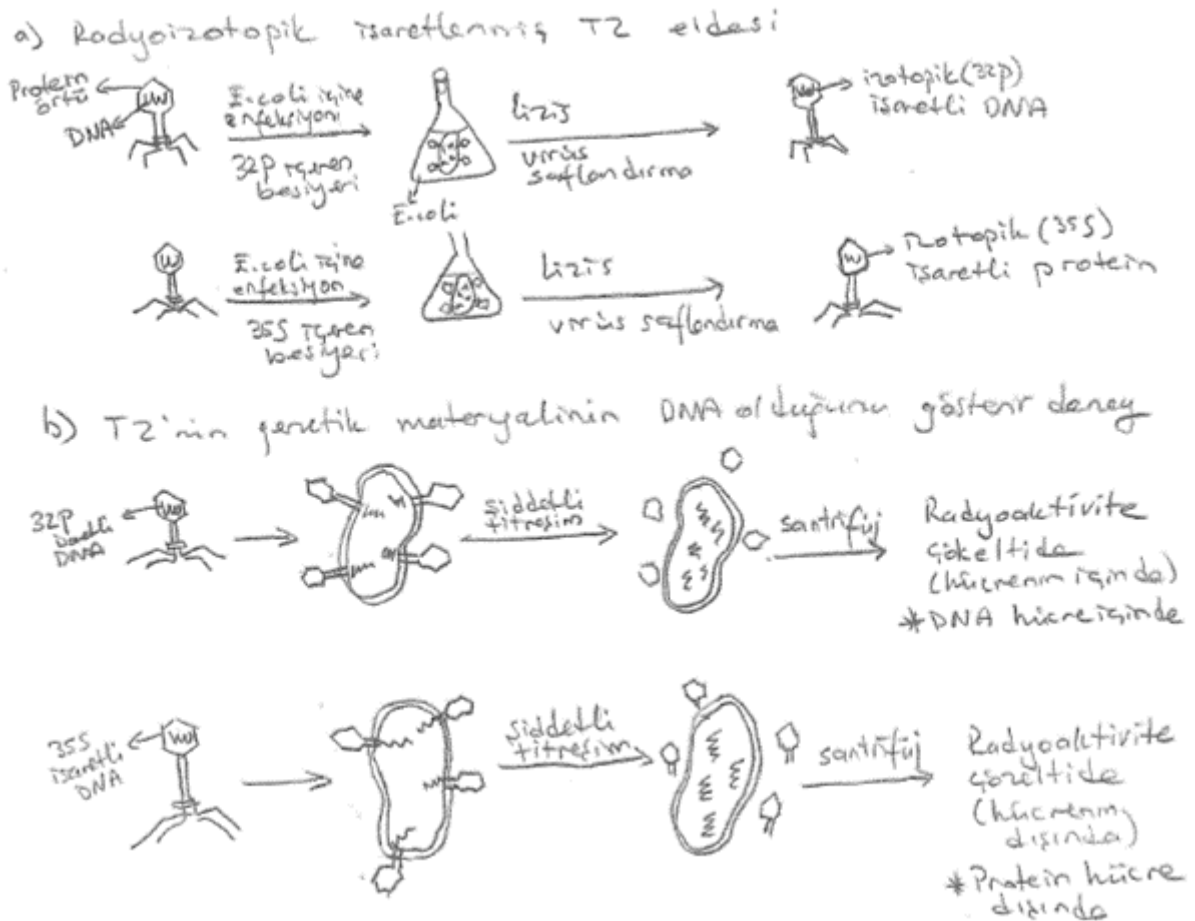
DNA'nın genetik materyal olduğunu destekleyici ikinci önemli kanıt bakteriyofaj T2 ile yapılan çalışmalardan sağlandı. Bu virüs bakteriyofaj veya kısaca faj olarak adlandırılır, Escherichia coli bakterisini konak olarak kullanırlar. Virüs parçacığı öz kısmında bulunan bir DNA ve bu DNA'yı saran protein 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 iplikçisi 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 kükürt içerir, fosfat içermez (normal şartlarda!). Eğer iki grup E. coli hücresi (kültür) ayrı ayrı üretilirken kültürlerden birinin bulunduğu ortama (besin ortamına)  $^{32}\text{P}$ , diğer kültürün bulunduğu ortama da  $^{35}\text{S}$  konulursa ve sonra her iki kültür de T2 ile enfekte edilirse, üretilen virüslerin bir grubunun DNA'sı  $^{32}\text{P}$  ile diğer grup virüsün de proteini  $^{35}\text{S}$  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 çözültideki radyoizotoplar takip edilmiştir (Şekil 2.4).



$^{32}\text{P}$  ile DNA'sı işaretlenen T2 ile enfekte edilen kültürde eğer radyoaktivite hücrelerin oluşturduğu çökelti içinde ise DNA hücreye girmiş, çözültide ise girmemiş demektir. Deney sonuçları radyoaktivitenin çökeltide olduğunu göstermiştir, dolayısıyla

viral DNA hücreye girmiştir. Öbür yandan <sup>35</sup>S ile işaretlenmiş T2 ile enfekte edilen kültürde eğer radyoaktivite çökeltide ise viral proteinler hücreye girmiş, çözültide ise girmemiş demektir. Deney sonuçları radyoaktivitenin çözültide 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  $\phi$ X174 DNA'sını saflandırmışlar, bu saf virüs DNA'sını, hücre duvarı enzimatik olarak parçalanmış *E. coli* (protoplast) hücreleri ile karıştırmışlardır. Bu hücrelerde tam  $\phi$ X174 virüs parçacıkları üretilmiştir. Sadece DNA'dan başlayarak tam bir virüs parçacığının oluşması virüsün bütün genetik bilgisinin DNA üzerinde olduğunu göstermiştir.

### 2.3.2 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  $\beta$  globin geni (DNA) döllenmiş fare yumurtasına enjekte edilmiş ve gelişen fare normalde sahip olmadığı  $\beta$  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.

### 2.3.3 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 2.5).

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.

Yine 1965 ile 1966'da Pace ve Spiegelma Q $\beta$  fajının RNA'sının *in vitro*da replike edilebileceğini gösterdiler. Bu replikasyon Q $\beta$  RNA replikaz denilen bir enzimin varlığına bağlıdır. *In vitro*'da çoğaltılan Q $\beta$  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.

Şekil 2.5: a) Tütün mozaik virüsünün şematik yapısı, b) Frankel-Conrad ve Singer tarafından gerçekleştirilen RNA'nın TMV'nün genetik materyali olduğunu gösteren deneyin ana hatları.